

Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares

Detection and quantification of genetically modified organisms in food and food ingredients

Fabricio Rochedo Conceição¹ Ângela Nunes Moreira²
Pedro Canisio Binsfeld³

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

O cumprimento da legislação que regulamenta a comercialização de alimentos e ingredientes contendo Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) é totalmente dependente da sensibilidade e confiabilidade dos métodos de detecção e quantificação de OGMs. Na presente revisão, foram discutidos os métodos mais relevantes para tais fins, especialmente aqueles que se baseiam na detecção da proteína ou do DNA recombinante, destacando as suas principais propriedades, limitações e vantagens. A regulamentação e algumas sugestões de métodos alternativos para a detecção de OGMs também são abordadas.

Palavras-chave: OGM, transgênicos, métodos de detecção, métodos de quantificação.

ABSTRACT

The enforcement of legislation that regulates the presence of genetically modified organisms (GMOs) in food and food ingredients is totally dependent on the sensitivity and reliability of the GMO testing methods. In this review, the most relevant methods such as recombinant proteins or DNA-based methods were discussed, emphasizing their main properties, limitations and advantages. The regulation and some suggestions of alternative methods for the detection of GMOs were also discussed.

Key words: GMO, transgenic, detection methods, quantification methods.

INTRODUÇÃO

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) são organismos vivos, sejam eles plantas, animais ou microorganismos, cujo material genético foi alterado por meio de engenharia genética, seja pela introdução de seqüências de DNA exógenas, que podem ser originárias de qualquer organismo vivo, inclusive de organismos filogeneticamente distantes à espécie a ser modificada (TOZZINI, 2004), seja pela inativação de genes endógenos (TERADA et al., 2002).

O conhecimento da estrutura básica de um OGM é importante para compreender o princípio de alguns métodos utilizados na detecção destes organismos. Um típico inserto de um OGM é composto por três elementos: o promotor, que regula a leitura do gene (transcrição); o gene de interesse, que determina a característica desejável; e o elemento terminador, responsável pelo término da transcrição (CONCEIÇÃO et al., 2004). Além destas, outras seqüências exógenas de DNA, responsáveis principalmente pela regulação e estabilização do gene inserido, podem estar eventualmente presentes. A combinação de todos estes elementos caracteriza um evento, ou seja, a construção gênica característica de um OGM. Qualquer estratégia

¹Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia (CenBiot), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: frochedo@ufpel.tche.br Autor para correspondência.

²Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola, Laboratório de Imunologia, CenBiot, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

³Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal, CenBiot, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

de detecção leva em consideração os elementos do inserto, seja diretamente para o desenho de iniciadores usados na detecção do DNA recombinante ou indiretamente para a detecção das proteínas ou produtos derivados dos OGMs.

A grande quantidade de OGMs que vem sendo aprovada no mundo nos últimos anos e a suspeita de que os mesmos não sejam seguros para o consumo levaram estes organismos ao centro das atenções públicas. A simples detecção destes organismos não garante a segurança de alimentos produzidos com OGMs. No entanto, esta se faz necessária por três razões: a primeira razão é o direito básico do consumidor, assegurado pelo Código de Defesa do Consumidor (CDC) e pelo Princípio 10 da Declaração do Rio, segundo o qual todos os cidadãos têm o direito à informação adequada sobre produtos e serviços; a segunda razão é a imposição legal, isto é, assegurada por lei (BRASIL, 2003), e a terceira razão é a geração de confiança nos alimentos que contêm OGMs. Neste sentido, é imperativo que os governos e todo o setor produtor de alimentos estejam interessados em desenvolver, padronizar e validar métodos para uma eficaz detecção e quantificação de OGMs em alimentos e ingredientes alimentares. O objetivo desta revisão foi discutir as características, aplicações, limitações e vantagens dos principais métodos, distinguir estratégias e apresentar alguns métodos alternativos para a detecção e quantificação de OGMs em alimentos.

Regulamentação

Com o crescente cultivo de OGMs no mundo e a liberação destes para a produção de alimentos e derivados, cresceu também a preocupação e o ceticismo de governantes e consumidores em relação à segurança alimentar (KUIPER et al., 2004). Além disso, num complexo sistema de produção e processamento de alimentos, inadvertidamente podem ocorrer contaminações com OGMs em alimentos livres destes. O avanço mais recente na regulamentação internacional para alimentos contendo OGMs foi dado em 11 de setembro de 2003, quando entrou em vigor o Protocolo de Cartagena, que restringe a livre comercialização de OGMs e obriga a rotulagem dos alimentos e ingredientes derivados destes quando as percentagens excederem ao estabelecido por lei (CBD, 2000). Na União Européia, desde 2004, o limite para não rotular um produto como geneticamente modificado é de 0,9% de OGMs (CE, 2003). No Brasil, o limite é de 1%, determinado pelo Decreto 4.680 de 24 de abril de 2003 (BRASIL, 2003), na Suíça 0,1% e na Rússia e Japão 5%. Nos EUA, embora a recente legislação não exija a rotulagem, o governo recomenda fazê-la

voluntariamente, exigindo apenas que as empresas produtoras de alimentos contendo OGMs notifiquem a FDA (órgão do governo americano responsável pela fiscalização de drogas e alimentos) pelo menos 120 dias antes do novo produto ser comercializado (TOZZINI, 2004). Segundo a FDA, os alimentos que contêm OGMs e que são substancialmente equivalentes aos convencionais, não necessitam de rotulagem especial (FDA, 2001).

Estratégias para a detecção de OGMs em alimentos

OGMs geralmente são caracterizados pela presença de um ou mais segmentos de DNA exógenos, que podem ou não proporcionar a expressão de novas proteínas. Sendo assim, a detecção destes organismos é focalizada na seqüência de DNA exógena ou na proteína transgênica. A análise de rotina de produtos alimentícios contendo OGMs compreende três etapas: 1- detecção; 2- identificação do OGM presente na amostra, para determinar se este é autorizado e; 3- quantificação do OGM no produto, para checar a necessidade de rotulagem ou não, conforme a legislação (PETIT et al., 2003).

Detecção baseada na presença de proteína

Bioensaios

Atualmente, a maioria dos OGMs utilizados na alimentação provêm de plantas geneticamente modificadas (GM) que são tolerantes a herbicidas ou resistentes a vírus, fungos ou insetos (MARIOTTI et al., 2002). O bioensaio para tolerância a herbicida é um método simples e prático no qual as sementes alvo são colocadas em meio de germinação contendo uma solução diluída de herbicida. Se a semente for resistente ao herbicida glifosato, como a da soja transgênica Roundup Ready™ (RR) e a do milho transgênico Liberty Link™, ocorrerá germinação e desenvolvimento normal da plântula. As principais limitações do bioensaio são: o longo tempo para obtenção do resultado (aproximadamente uma semana) e a utilização restrita à OGMs resistentes à herbicidas. Bioensaios são utilizados atualmente por companhias exportadoras de sementes e grãos (TORRES et al., 2003).

Imunoensaios

Imunoensaios são ideais para a detecção qualitativa e quantitativa de proteínas em misturas complexas. Baseado na típica concentração de proteína transgênica em tecidos vegetais ($> 10\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido), o limite de detecção de um imunoensaio é de aproximadamente 1% (STAVE, 1999). Existem imunoensaios comerciais para a detecção e quantificação das proteínas da família Cry (endotoxinas

de *Bacillus thuringiensis*), que conferem resistência contra insetos, da proteína EPSPS-CP4 (5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintetase da cepa 4 de *Agrobacterium tumefaciens*), que confere tolerância ao herbicida glifosato, e da proteína PAT (fosfinotricina-N-acetiltransferase de *Streptomyces viridochromogenes*), que confere tolerância ao herbicida glufosinato (STAVE, 2002).

A detecção de OGMs, através de imunoenaios, nem sempre é possível. Isto ocorre quando o nível de expressão da proteína transgênica nas partes das plantas que são utilizadas na produção de alimentos é muito baixo (AHMED, 1995). A concentração de proteína transgênica nos tecidos de plantas varia em função da idade, variedade e condições ambientais (STAVE, 2002). Outra situação desfavorável aos imunoenaios é o processamento do alimento, que pode promover a remoção das proteínas em determinados produtos, como em xaropes e óleos altamente refinados, ou a desnaturação das mesmas, alterando a sua conformação e impedindo o seu reconhecimento pelo anticorpo (STAVE, 2002; LIU et al., 2004). A detecção de epitopos termoresistentes de proteínas transgênicas ou a produção de anticorpos contra a proteína desnaturada podem ser uma alternativa para a detecção de proteínas transgênicas em alimentos processados (BRETT et al., 1999). Imunoenaios também não podem ser utilizados na detecção de OGMs cuja modificação genética não resulta em uma nova proteína. É o caso do tomate longa vida FlavrSavr™, cuja modificação genética resulta em um mRNA anti-sense ao mRNA para o gene da poligalacturonase (*pg*) (LÜTHY, 1999). Quando a proteína transgênica é muito similar à proteína nativa, não é possível produzir anticorpos específicos que reconheçam apenas a proteína transgênica, tendo em vista a semelhança de epitopos. Este caso de reação cruzada ocorre com o evento GA21 de milho transgênico, no qual a proteína transgênica EPSPS-CP4 apresenta somente dois aminoácidos diferentes em relação aos 450 aminoácidos da EPSPS nativa (TOZZINI, 2004). Outra limitação dos imunoenaios é a incapacidade de detectar alimentos contendo OGMs cuja modificação genética resulta no aumento da expressão de uma proteína nativa (MIRAGLIA et al., 2004). Além disso, os imunoenaios também são incapazes de distinguir as variedades GM que apresentam diferentes eventos, porém expressam a mesma proteína transgênica (KOK et al., 2002; VAN DUIJN et al., 2002).

O ensaio imunoenzimático (ELISA), o imunoensaio de fluxo lateral (IFL) e o Western blot são os principais imunoenaios utilizados na detecção e quantificação de alimentos contendo OGMs (MAGIN et al., 2000).

ELISA

O ELISA é um método sensível, específico, seguro, robusto, rápido e que geralmente não requer muito treinamento (Tabela 1). Além disso, é ideal para a análise simultânea de um grande número de amostras. Este método é adequado principalmente para testes de rotina de alimentos crus e ingredientes básicos (YATES, 1999). A sua sensibilidade na detecção de OGMs é de aproximadamente 10^{-12} M (50 pg/ml de proteína transgênica) (STAVE, 1999). O limite de detecção da proteína EPSPS-CP4, presente na soja RR, foi de 0,25% para sementes e 1,4% para alimento tostado (YATES, 1999). Kits comerciais baseados em ELISA estão disponíveis para poucos produtos GM, sendo que cada um deles pode detectar somente uma proteína específica (GENESCAN, 2005).

O princípio do ELISA utilizado na detecção e quantificação de OGMs, descrito por CONCEIÇÃO et al. (2004), fundamenta-se no ensaio de duplo anticorpo ou “sanduíche”, que utiliza dois anticorpos específicos para a proteína transgênica (antígeno - Ag). Um deles é utilizado na sensibilização da microplaca, visando a captura do Ag presente na amostra do alimento, e o outro geralmente está conjugado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que revela a reação (produção de cor). Uma outra variação do ELISA, que também é utilizada na detecção e quantificação de OGMs, é o ensaio competitivo, onde o Ag presente na amostra e um padrão (Ag conjugado com uma enzima) competem pela ligação do anticorpo de captura. Neste ensaio, a concentração de Ag é inversamente proporcional à intensidade colorimétrica produzida. Segundo YATES (1999), o ensaio “sanduíche” é mais recomendado que o ensaio competitivo, tendo em vista a sua maior sensibilidade. A utilização de anticorpos monoclonais, tanto para a captura quanto para a detecção (conjugado) aumenta a especificidade do ELISA (AHMED, 2002). Por outro lado, anticorpos policlonais aumentam a sensibilidade, visto que podem reconhecer diferentes epitopos da proteína.

Imunoensaio de fluxo lateral

O imunoensaio de fluxo lateral (IFL) é um teste qualitativo, prático, não dispendioso e rápido, cujos resultados são obtidos entre 5 e 15 minutos, por isso é indicado para triagens (Tabela 1). Além disso, não necessita de pessoal treinado e equipamentos especiais. É similar ao teste de gravidez encontrado nas farmácias. A sensibilidade deste método na detecção de OGMs é de aproximadamente 0,1% (URBANEK et al., 2001). As fitas de IFL foram desenvolvidas comercialmente para detectar a

Tabela 1 - Resumo das características dos principais métodos utilizados na detecção e quantificação de OGMs em alimentos.

Parâmetros	Baseados na proteína			Baseados no DNA		
	Western	ELISA	IFL	PCR qualitativa	PCR-QC	PCR-TR
Facilidade de uso	Difícil	Moderado	Simples	Difícil	Difícil	Difícil
Equipamentos especiais	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Sensibilidade	Alta	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta
Duração	2 d	8 h	10 min	1 d	2 d	1 d
Custo/amostra (R\$)	150	20	10	250	400	450
Resultados quantitativos	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Prático para testes em campo	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
Empregado principalmente	Academia	Laboratório	Campo	Laboratório	Laboratório	Laboratório

Fonte: Modificada de CONCEIÇÃO et al. (2004).

endotoxina Cry(Ab) ou a proteína EPSPS-CP4 presente em plantas de soja, milho, canola e beterraba açucareira geneticamente modificadas (LIPTON et al., 2000). Existem no mercado diversos kits para diferentes eventos, porém fitas que poderão detectar simultaneamente várias proteínas estão sendo desenvolvidas (AHMED, 2002).

O princípio do ensaio “sanduíche” utiliza dois anticorpos específicos contra a proteína transgênica: um anticorpo de captura e um anticorpo de detecção conjugado a partículas de ouro, látex, carbono, poliestireno, lipossomos encapsulados desidratados ou cristais submicrométricos de elementos raros (*upconverting phosphor* - UCP) capaz de gerar uma reação colorimétrica. O anticorpo de detecção está na extremidade da fita que é inserida na amostra em solução. A seguir, este anticorpo, a proteína alvo e o complexo anticorpo de detecção - proteína alvo migram por capilaridade até a outra extremidade da fita, que contém duas zonas de captura, uma específica para a proteína alvo e a outra específica para o anticorpo de detecção. A presença de duas bandas coloridas indica que o teste é positivo para a proteína alvo enquanto que a presença de uma banda colorida indica que o teste foi realizado corretamente, porém negativo (CONCEIÇÃO et al., 2004). A utilização de UCP como repórter no IFL aumenta significativamente a sensibilidade do método e também possibilita a análise simultânea de várias substâncias em função dos diferentes espectros que podem ser emitidos (HAMPL et al., 2001).

Western blot

O Western blot é um método semi-quantitativo altamente específico, que é particularmente indicado para análise de proteínas insolúveis (BRETT et al., 1999). Por ser um método mais laborioso, é pouco aplicado na rotina de análise de OGMs (Tabela 1). Uma vez que a separação eletroforética das proteínas é conduzida sob condições desnaturantes, alguns problemas de solubilização, agregação e co-

precipitação da proteína alvo com as outras proteínas presentes na amostra são eliminados (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Por outro lado, anticorpos contra epitopos conformacionais da proteína alvo podem não reconhecer-la quando desnaturada, portanto é mais indicada a utilização de anticorpos contra epitopos lineares. O princípio deste método na detecção de OGMs foi descrito por CONCEIÇÃO et al. (2004).

Em grãos de soja, o limite de detecção da EPSPS-CP4 variou de 0,5 a 1%, sendo que após o processamento a detecção não foi possível (VAN DUIJN et al., 1999). Por outro lado, YATES (1999) encontrou um limite de detecção de 0,25% para grãos de soja e 1% para alimentos tostados. Devido à elevada especificidade, o Western blot é geralmente utilizado para confirmar amostras que foram positivas no ELISA ou no IFL.

Detecção baseada na presença de DNA

Os métodos baseados na detecção do DNA recombinante destacam-se quando a quantificação do OGM nos alimentos é necessária ou quando a amostra é oriunda de um alimento processado. Geralmente existe uma correlação linear entre a quantidade de OGM e DNA exógeno quando a modificação genética é nuclear. Entretanto, isso não é verdadeiro em relação à quantidade de OGM e proteína/RNA ou quando o DNA exógeno é introduzido em uma organela como o cloroplasto (modificação genética não nuclear). Até o momento, todos os OGMs comercializados possuem modificação genética nuclear (CONCEIÇÃO et al., 2004). O DNA, por ser mais estável que a maioria das proteínas, é passível de ser detectado em alimentos processados. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que consiste na amplificação seletiva de seqüências específicas da molécula de DNA, é o principal método utilizado na detecção e quantificação de alimentos contendo OGMs. É um método sensível, específico,

seguro, capaz de detectar uma ampla série de eventos (BERTHEAU et al., 2002; GIOVANNINI & CONCILLO, 2002) e de distinguir as variedades GM que apresentam diferentes construções gênicas, porém expressam a mesma proteína (YAMAGUCHI et al., 2003). Além disso, a PCR também é capaz de detectar OGMs que utilizam a tecnologia anti-sense (HOLST-JENSEN et al., 2003). As principais limitações da PCR são: dificuldade na construção dos iniciadores, uma vez que a informação sobre a seqüência da modificação genética geralmente é confidencial (HOLST-JENSEN et al., 2003); necessidade de pessoal treinado e equipamentos especiais (Tabela 1); elevado custo, pois cada teste é específico para uma única modificação genética e; necessidade de material de referência certificado, cuja disponibilidade geralmente é limitada (MIRAGLIA et al., 2004). A separação física de todas as suas etapas é recomendada para evitar contaminações (YAMAGUCHI et al., 2003).

O gene transgênico é apenas um entre os milhares de genes do genoma. Além disso, na prática diária, é necessário detectar uma única semente geneticamente modificada entre 1.000 a 10.000 sementes convencionais e a PCR tem demonstrado ter sensibilidade suficiente para tal. O limite de detecção da PCR está entre 20 pg e 10 ng de DNA alvo, correspondendo a 0,0001 a 1% de OGM. Em outras palavras, o limite de detecção é menor do que vinte moléculas de DNA alvo (LÜTHY, 1999).

A qualidade e a pureza do DNA extraído de alimentos e ingredientes alimentares são determinantes para o sucesso da PCR. Entre os métodos de extração de DNA de alimentos, destacam-se o método CTAB, no qual a amostra de alimento é incubada com o detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), e o método Wizard, que emprega resinas de sílica com alta afinidade pelo DNA. Ambos os métodos são satisfatórios (AHMED, 2002). A precipitação com solventes orgânicos e o tratamento enzimático são os principais métodos utilizados na purificação do DNA extraído. A precipitação com solventes mostrou ser mais eficiente que o tratamento enzimático, pois manteve a integridade e aumentou a pureza do DNA extraído (VANNI et al., 2004).

O processamento de alimentos associado ao excesso de calor, atividade de nucleases e pH baixo contribui para a degradação do DNA. Isto é mais comum em produtos com vida de prateleira longa. A detecção do DNA não é possível em alguns produtos como lecitina purificada, derivados de amido e óleos refinados derivados de OGMs (YATES, 1999; HOLST-JENSEN, 2003). Outro problema na reação de PCR é que a DNA polimerase utilizada pode ser inibida por

substâncias contidas no alimento, como proteínas, gorduras, polissacarídeos, polifenóis, açúcar caramelizado entre outros (AHMED, 2002). Por isso, é fundamental a utilização de controles de qualidade para evitar resultados falso-negativos. Estes controles avaliam a qualidade do DNA extraído e são representados por genes conservados de plastos ou genes específicos, como, por exemplo, o gene *ivr* da invertase do milho e o gene *lec1* da lectina de soja (HOLST-JENSEN et al., 2003).

Detecção ou rastreamento de OGMs

A maioria dos OGMs aprovados para uso alimentar possui seqüências comuns, como o promotor 35S, proveniente do vírus do mosaico da couve flor (VMCF), o terminador NOS, proveniente do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* e genes de resistência a antibióticos (HOLST-JENSEN et al., 2003; BORDONI et al., 2004), todas elas passíveis de serem detectadas através da PCR. Entre as principais técnicas de detecção qualitativa e de rastreamento estão a PCR *screening*, a PCR *nested* e a PCR multiplex.

Na PCR *screening*, um resultado positivo indica a presença de uma modificação genética sem, no entanto, permitir a identificação do tipo de modificação ou do organismo que foi modificado (CONCEIÇÃO et al., 2004). O promotor 35S está presente em aproximadamente 75% dos OGMs comerciais (KOK et al., 2000), fato que facilita bastante a detecção destes organismos. A principal desvantagem deste método é a ocorrência de resultados falso-positivos, uma vez que estas seqüências comuns também ocorrem naturalmente em algumas plantas e microrganismos do solo (AHMED, 2002). Plantas da família das crucíferas, por exemplo, podem estar infectadas com o VMCF. Se o resultado da PCR *screening* for positivo, uma PCR qualitativa específica deve ser realizada. Este método auxiliar emprega iniciadores que flanqueiam dois elementos genéticos adjacentes que estão presentes apenas em OGMs, como o promotor e o gene de interesse ou o gene de interesse e o terminador (HOLST-JENSEN et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2004).

A PCR *nested* consiste no uso de dois pares de iniciadores para um determinado evento de OGM. O primeiro par de iniciadores amplifica uma seqüência específica do DNA alvo, que servirá de molde para o segundo par de iniciadores (*nested*). Por exemplo, na identificação do gene *cryIA(b)*, presente no milho-Bt (resistente a insetos), são utilizados iniciadores externos (CRY1 e CRY2) que delimitam uma seqüência de 420 pb, e iniciadores internos (CRY3 e CRY4), que delimitam uma seqüência de 189 pb dentro da seqüência

de 420 pb (QUERCI & MAZZARA, 2004). A vantagem desta estratégia é a elevada especificidade, uma vez que se ocorrer a amplificação de um fragmento falso positivo pelo primeiro par de iniciadores, a probabilidade da seqüência *nested* ser amplificada é muito baixa.

A PCR multiplex é uma técnica robusta, rápida e confiável que possibilita a detecção de várias seqüências de DNA alvo em uma única reação, resultando na economia de tempo e reagentes (HERNANDEZ et al., 2003). Por outro lado, esta técnica requer maior manipulação, o que pode aumentar o risco de contaminações e resultados falso-positivos (GERMINI et al., 2004). Além disso, o risco de resultados incorretos aumenta pelas seguintes razões: cada reação requer condições diferentes de otimização, ou seja, diferentes temperaturas e concentrações dos reagentes; a combinação de diferentes iniciadores pode resultar na amplificação de seqüências não-alvo; e quando há mais de um fragmento alvo sendo amplificado em uma reação de PCR, estes competirão pelos reagentes. Se um deles for amplificado com maior eficiência, a possibilidade de ocorrer um resultado falso-negativo aumenta. Por isso, a validação de métodos multiplex requer muita cautela. Kits de PCR multiplex capazes de detectar vários genes simultaneamente vêm sendo desenvolvidos, como por exemplo, o kit que detecta os eventos Bt11, Bt176, Mon810, T25 e GA21 de milho geneticamente modificado (MATSUOKA et al., 2001).

Quantificação de OGMs

Um aspecto crucial na análise de alimentos contendo OGMs é a quantificação, pois dependendo da sua concentração final no alimento, este será ou não rotulado como alimento contendo produto geneticamente modificado. Para isso, foram desenvolvidos métodos de quantificação como a PCR quantitativa competitiva (PCR-QC) e a PCR em tempo real (PCR-TR) (CONCEIÇÃO et al., 2004; MIRAGLIA et al., 2004; TRAPMANN & EMONS, 2005).

A PCR-QC fundamenta-se na co-amplificação competitiva de um DNA padrão (de concentração conhecida) e de um DNA alvo (evento transgênico) em um mesmo tubo de reação. O princípio deste método na quantificação de OGMs foi descrito por CONCEIÇÃO et al. (2004). A concentração de OGM presente na amostra é dada pela razão entre o número de cópias do DNA alvo e o número de cópias do gene característico da espécie, multiplicada por 100%. A principal vantagem deste método é que se houver inibidores, a amplificação do DNA padrão também será inibida. A PCR-QC tem sido empregada na quantificação da soja RR, milho Bt176 e Bt11, promotor 35S e

terminador NOS (RUDI et al., 2003). A PCR-QC, apesar de ser um método robusto, rápido, sensível e adequado para análise de rotina, é dispendioso, oneroso (Tabela 1), requer experiência e padrões competidores adequados, sendo bastante comum à contaminação da amostra devido à excessiva manipulação. Além disso, a confiabilidade da quantificação por este método depende muito da técnica usada para detectar os produtos da amplificação. O procedimento usual consiste em separar os produtos da PCR através de eletroforese em gel de agarose, corar o gel com brometo de etídio, digitalizar a imagem e quantificar os fragmentos de DNA com um software especializado. Esse procedimento é pouco reproduzível e acurado, requer grandes quantidades de amostra e consome muito tempo (GARCIA-CANAS et al., 2004). A sensibilidade da PCR-QC é de aproximadamente 0,1 a 2% de OGM (RUDI et al., 2003).

A técnica de análise dos produtos da PCR durante a amplificação tornou-se conhecida como PCR em tempo real (PCR-TR). Assim, a quantidade de produto amplificado durante a reação é estimada diretamente pela mensuração da fluorescência emitida. Durante a reação, a inserção de uma sonda especial de DNA permite a detecção de fluorescência. No ensaio TaqMan™, esta sonda contém uma molécula *reporter* (de emissão) e uma molécula *quencher* (de extinção). Quando a molécula *reporter* e a *quencher* estão próximas fisicamente, a emissão de fluorescência é anulada, portanto, nenhum sinal pode ser detectado. Durante a amplificação a sonda é degradada, afastando o *reporter* do *quencher*, resultando na emissão do sinal fluorescente, que é captado por uma câmera digital. O ensaio descrito acima é o mais utilizado (WEIGHARDT et al., 2004), porém existem outros ensaios utilizados para estimar a concentração de produto amplificado na PCR-TR, como o SYBR Green I, o FRET (Förster resonance energy transfer) e molecular *beacons* (AHMED, 2000). O percentual de OGM no alimento é obtido comparando-se a curva da amostra analisada com uma curva de calibração padrão (WEIGHARDT et al., 2004). Empiricamente, a concentração de DNA na PCR-TR é inversamente proporcional ao número de ciclos que ocorrem durante a fase exponencial da PCR.

A PCR-TR é altamente sensível, precisa, segura, rápida e capaz de detectar uma ampla série de eventos GM. Além disso, o produto da reação é analisado diretamente no tubo, reduzindo significativamente o risco de contaminação (BRODMANN, et al., 2002; HOLST-JENSEN et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2004). Já as suas principais limitações são: necessidade de equipamentos especiais e dispendiosos (Tabela 1), de padrões de calibração definidos (PARDIGOL et al., 2003), de insumos caros e baixa reprodutibilidade inter-laboratorial (GARCIA-

CANAS et al., 2004). Na quantificação de OGM em alimentos para bebês, produtos dietéticos, bebidas de soja, sobremesas, talharim e cereais contendo soja RR e milho Bt, a PCR-TR demonstrou ser eficaz. Entretanto, a quantificação em gorduras, óleos e condimentos não foi possível (AHMED, 2002; MIRAGLIA et al., 2004). A sensibilidade da PCR-RT é de aproximadamente 0,01% de OGM (WEIGHARDT et al., 2004).

Métodos alternativos de detecção e quantificação de OGMs

O maior desafio para a atual metodologia de detecção e quantificação de OGMs é o grande número e a complexidade dos eventos que estão surgindo. Considerando que seja necessário realizar pelo menos uma PCR para cada modificação, a análise de OGMs torna-se cada vez mais complexa e onerosa, tendo em vista todas as possíveis combinações de modificações que podem aparecer em um alimento. Perante este cenário, novas metodologias com maior sensibilidade, celeridade, confiabilidade e custo mais baixo deverão ser desenvolvidas. Nesse contexto, diversos métodos vêm sendo desenvolvidos, destacando-se a cromatografia, a espectrometria de massa, os microarranjos de DNA (microchips) e a espectrometria no infravermelho próximo. O promotor 35S e o terminador NOS foram eficientemente detectados através de eletroforese capilar (OBEID et al., 2004) e biosensores (MINUNNI et al., 2001).

Cromatografia e espectrometria de massa

Como metodologia alternativa de detecção, a cromatografia pode ser empregada na detecção de compostos químicos e proteínas. A cromatografia é aplicada na análise de derivados, tais como óleos, açúcares e amidos, cuja detecção da proteína ou DNA recombinante não é possível. Nestes casos, a cromatografia pode ser empregada para determinar o perfil químico e detectar os produtos decorrentes de modificações genéticas. A aplicação prática da cromatografia líquida de alta resolução (*High Pressure liquid chromatography* - HPLC) acoplada a um espectrômetro de massa (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry* - APCI-MS) foi demonstrada em óleo derivado de canola GM, analisando a constituição dos triglicerídeos (BYRDWELL & NEFF, 1996).

A espectrometria de massa é uma técnica analítica poderosa utilizada para identificar e quantificar compostos desconhecidos, bem como elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas. É uma técnica de elevada sensibilidade, capaz de detectar compostos em quantidades tão pequenas como 10^{-15} g. Isto significa que OGMs podem ser identificados em concentrações de fentoescala (uma parte em 10^{12}).

Microarranjos de DNA

O método desenvolvido por KOK (2000) permite a detecção simultânea de várias seqüências de DNA presentes em alimentos contendo OGMs. Este método é conhecido como microarranjo ou microchip de DNA, no qual é possível posicionar aproximadamente 250.000 oligonucleotídeos ou 1.000 cDNAs por centímetro quadrado de superfície sólida (VO DINH, 2001). Com isso, as amostras são testadas simultaneamente para a presença de muitas variedades GM identificadas. Além disso, teoricamente, os microarranjos também possuem a capacidade de detectar OGMs não autorizados que apresentam alguma similaridade com os aprovados (construção genética conhecida) (MIRAGLIA et al., 2004; NESVOLD et al., 2005). O limite de detecção de OGMs através de um microarranjo de DNA é de aproximadamente 250 cópias de cada uma das seqüências de DNA alvo (CONCEIÇÃO et al., 2004; NESVOLD et al., 2005).

Sondas específicas (oligonucleotídeos) são fixadas pontualmente na forma de arranjo sobre uma superfície sólida (plástico, náilon, silicone entre outras). Os arranjos são subsequentemente hibridizados com o DNA isolado da amostra ou com os produtos da PCR multiplex, ambos marcados com fluoresceína. Em seguida, os fragmentos marcados que não hibridizaram são removidos por uma lavagem e a intensidade da fluorescência de cada arranjo é determinada por um scanner. As principais desvantagens deste método são: o fluído contendo os fragmentos de DNA marcados com fluoresceína fica estático sobre o arranjo durante o teste, reduzindo a taxa de hibridização; arranjos com alta concentração de sondas podem impedir fisicamente a hibridização (*steric hindrance*) dos fragmentos marcados e; o elevado custo (MIRAGLIA et al., 2004; TRAPMANN & EMONS, 2005).

O microarranjo também pode ser utilizado para detectar proteínas. Anticorpos específicos ou outros tipos de proteínas seletivas podem ser fixadas no arranjo, possibilitando a captura das proteínas da amostra.

Espectrometria no infravermelho próximo

As técnicas analíticas alternativas para a detecção e quantificação de OGMs baseadas na HPLC e nos microarranjos de DNA são lentas, de custo elevado e requerem o pré-tratamento da amostra. A espectrometria de infravermelho próximo (NIR), baseada na mensuração do comprimento de onda e na intensidade de absorção de luz infravermelha próxima realizada pela amostra, apresenta potencial para ser empregada na detecção e quantificação de OGMs. É uma técnica rápida que não requer o pré-tratamento da

amostra. A luz infravermelha próxima se estende em uma faixa de 800 nm a 2.5 μm (12,500 – 4000 cm^{-1}) e tem energia suficiente para excitar moléculas de altos níveis de energia (HURBURGH, et al., 2000). É eficaz na detecção de proteínas, óleos, açúcares e fibras. No caso da soja RR detectada através de NIR, o limite de detecção foi de aproximadamente 0.1% (ROUSSEL et al., 2001). A detecção de OGMs em alimentos através de NIR é altamente eficaz, no entanto, a quantificação ainda precisa ser validada (HURBURGH, et al., 2000; KOK et al., 2002).

Padronização dos métodos de detecção e quantificação de OGMs

O Brasil, como um dos principais produtores de alimentos do mundo e com crescente desenvolvimento no setor do agronegócio e exportação de alimentos, necessita cada vez mais se ajustar à realidade internacional com relação à legislação e imposições dos países importadores de produtos alimentícios. Assim, é um grande desafio para a pesquisa e para o setor produtivo manter-se atualizado, em termos metodológicos, visando atender às exigências dos nossos parceiros comerciais. A detecção e quantificação de OGMs é exigida em quase todos os países para os quais o Brasil exporta alimentos.

Atualmente, no Brasil, um crescente número de laboratórios de controle de alimentos utiliza a técnica de PCR para a detecção e quantificação de OGMs. Contudo, a padronização dos métodos de análise de OGMs ainda está no início. É preciso estabelecer procedimentos comuns no que diz respeito à amostragem (GILBERT, 1999), preparo das amostras e métodos de detecção de OGMs. Ensaio interlaboratoriais devem ser realizados visando à validação dos métodos qualitativos e quantitativos discutidos ao longo do texto. Essa padronização é necessária para que os laboratórios brasileiros sejam creditados pelos parceiros internacionais, principalmente no que tange à acurácia e à credibilidade dos laudos emitidos.

CONCLUSÕES

A legislação brasileira e os diversos mercados mundiais exigem a rotulagem de alimentos contendo OGMs. Porém, até o momento, estes alimentos são encontrados nas prateleiras sem o devido rótulo. Além de desenvolver e validar métodos de detecção e quantificação de OGMs que atendam aos limites exigidos pela lei, outro grande desafio da comunidade científica é o desenvolvimento de métodos para a detecção de alimentos contendo OGMs não aprovados. Uma estratégia ideal de detecção e

quantificação de OGMs em alimentos deve combinar diferentes métodos. Inicia-se pelo mais simples, rápido e econômico, conforme as características apresentadas na Tabela 1. Por último, devem ser utilizados os métodos mais sofisticados, capazes de identificar e quantificar os eventos GM presentes no alimento. É imprescindível destacar que todos os métodos discutidos nesta revisão apresentam limitações e, portanto, cabe à comunidade científica aprimorá-los e validá-los. Atualmente, cada evento de OGM é identificado separadamente, mas se for possível detectar com uma única análise todos os OGMs presentes na amostra, esta se tornará mais rápida e menos onerosa.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F.E. Application of molecular biology to biomedicine and toxicology. **Journal of Environmental and Science Health**, v.11, p.1-51, 1995.
- AHMED, F.E. Molecular markers for early cancer detection. **Journal of Environmental and Science Health**, v.18, p.75-125, 2000.
- AHMED, F.E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, v.20, p.215-223, 2002.
- BERTHEAU, Y. et al. Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. **Journal of AOAC International**, v.85, p.801-808, 2002.
- BORDONI, R. et al. Detection and quantitation of genetically modified maize (Bt-176 Transgenic maize) by applying ligation detection reaction and universal array technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1049-1054, 2004.
- BRASIL. DOU - **Diário Oficial da União**. Publicado no dia 25.04.2003. Seção I, p.2.
- 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.
- BYRDWELL, W.C., NEFF, W.E. Analysis of genetically modified canola varieties by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric and flame ionization detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.19, p.2203-2225, 1996.
- CBD - Convention on Biological Diversity. **Protocolo de Cartagena sobre Segurança da Biotecnologia na Convenção sobre a Diversidade Biológica**. Montreal, p.19, 2000. Capturado em 14 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.biodiv.org>
- CE - REGULAMENTO (CE) nº 1830/2003 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. Relativo à rastreabilidade e rotulagem de organismos geneticamente modificados e à rastreabilidade dos géneros alimentícios e

- alimentos para animais produzidos a partir de organismos geneticamente modificados e que altera a Diretiva 2001/18/CE. **Jornal Oficial da União Européia**, L 268/24, PT, 2003.
- CONCEIÇÃO, F.R. et al. Detecção de organismos geneticamente modificados. In: BINSFELD, P.C. **Biossegurança em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. p.145-169.
- FDA – Food and Drug Administration - **Guidance for industry voluntary labeling indicating whether foods have or have Not been developed using bioengineering**. 2001. Capturado em 22 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/biolabgu.html>
- GARCIA-CANAS, V. et al. Quantitation of transgenic Bt event-176 maize using double quantitative competitive polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis laser-induced fluorescence. **Analytical Chemistry**, v.76, p.2306-2313, 2004.
- GENESCAN. 2005. **Applicability of ELISA testing**. Capturado em 20 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.gmotesting.com/elisa>
- GERMINI, A. et al. Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3275-3280, 2004.
- GILBERT, J. Sampling of raw materials and processed foods for the presence of GMOs. **Food Control**, v.10, p.363-365, 1999.
- GIOVANNINI, T.; CONCILLO, L. PCR detection of genetically modified organisms: a review. **Starch**, v.54, p.321-327, 2002.
- HAMPL, J. et al. Upconverting phosphor reporters in immunochromatographic assays. **Analytical Biochemistry**, v.288, p.176-187, 2001.
- HERNANDEZ, M. et al. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. **Analytical Biochemistry**, v.323, p.164-170, 2003.
- HOLST-JENSEN, A. **GMO detection methods and validation**. 2003. Capturado em 14 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.entransfood.com>
- HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.375, p.985-993, 2003.
- HURBURGH, C.R. et al. **Detection of genetically modified grains by near-infrared spectroscopy**. Proceedings PITTCON 2000–Science for the 21st Century, New Orleans, La, 2000. Capturado em 14 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://pittcon24857.omnibooksonline.com/>
- KOK, E.J. et al. **Detection of genetically modified DNA in food**. 2000. Capturado em 10 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.rikilt.dlo.nl>
- KOK, E.J. et al. DNA methods: critical review of innovative approaches. **Journal of AOAC International**, v.85, p.797-800, 2002.
- KUIPER, H.A. et al. Safety assessment, detection and traceability, and societal aspects of genetically modified foods. **Food Chemical Toxicology**, v.42, p.1195-202, 2004.
- 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.
- LIU, W. et al. Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. **Food Control**, v.15, p.303-306, 2004.
- LÜTHY, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. **Food Control**, v.10, p.359-361, 1999.
- MAGIN, K. et al. **Methods for detection of GMO grain in commerce**. 2000. Capturado em 10 dez. 2004. Online. Disponível na Internet <http://www.acpa.org>
- MARIOTTI, E. et al. Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection. **Analytica Chimica Acta**, v.453, p.165-172, 2002.
- MATSUOKA, T. et al. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from live lines of genetically modified maize. **Journal Food Higiény of Society Japan**, v.42, p.24-32, 2001.
- MINUNNI, M. et al. Biosensors as new analytical tool for detection of genetically modified organisms (GMOs). **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.369, p.589-93, 2001.
- MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food Chemical Toxicology**, v.42, p.1157-1180, 2004.
- NESVOLD, H. et al. Design of a DNA chip for detection of unknown genetically modified organisms. **Bioinformatics**, v.12, 2005, *in press*.
- 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.
- PARDIGOL, A. et al. A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. **European Food Research and Technology**, v.216, p.412-420, 2003.
- 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.
- QUERCI, M.; MAZZARA, M. **Characteristics of the qualitative PCR systems**. Manual. EU Commission Joint Research center. 2004. Capturado em 26 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://gmotraining.jrc.it/docs/Session08.pdf>
- ROUSSEL, S.A. et al. Detection of Roundup Ready™ soybeans by near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.55, p.1425-1430, 2001.

- RUDI, K. et al. A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.62-70, 2003.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL. D.W. **Molecular cloning**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. p.A8.40-A8.55.
- STAVE, J.W. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs. **Food Control**, v.10, p.361-374, 1999.
- STAVE, J.W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations and practical considerations. **Journal of AOAC International**, v.85, p.780-786, 2002.
- TERADA, R. et al. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. **Nature Biotechnology**, v.20, p.1030-1034, 2002.
- 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. **Biotecnología y mejoramiento vegetal**. Buenos Aires: INTA, 2004. p.409-424.
- TRAPMANN, S.; EMONS, H. Reliable GMO analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.381, p.72-74, 2005.
- URBANEK, K.B. et al. Usefulness of an immunoassay test trait for detection of genetically modified Roundup ready soybean in food products. **Rocz Panstwowy Zaklad Higieny**, v.52, p.313-320, 2001.
- VAN DUIJN, G.J. et al. Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**, v.10, p.375-378, 1999.
- VAN DUIJN, G.J. et al. Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: bridging the methods. **Journal of AOAC International**, v.85, p.787-91, 2002.
- VANNI, A. et al. Evaluation of purification procedures of DNA from maize-meal samples by exploiting different analytical techniques for the assessment of DNA quality. **Annali di Chimica**, v.94, p.269-280, 2004.
- VO-DINH, T. DNA chips: technology and applications. **Clinical Laboratory**, v.25, p.12-16, 2001.
- WEIGHARDT, F. et al. Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 Zea mays event. **Journal of AOAC International**, v.87, p.1342-1355, 2004.
- YAMAGUCHI, H. et al. Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan. **Food Control**, v.14, p.201-206, 2003.
- YATES, K. **Detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms**. 1999. Capturado em 16 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.ils.com>