

VIABILIDADE NO USO DO PCR NA DETECÇÃO DE OGMs EM ALIMENTOS IRRADIADOS CONTENDO MILHO

**R. G. Crede*, G. B. Fanaro, R. L. Guedes, I. T. Sabundjian, Ruiz, M. O. ,
A.L.C.H. Villavicencio**

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)
Centro de Tecnologia das Radiações – Lab. de Detecção de Alimentos Irradiados
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP
*rgcrede@ipen.br

RESUMO

A PCR é um método que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, utilizando-se dois iniciadores (“primers”) que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Para isso, o DNA é desnaturado (92°C - 96°C), os “primers” são hibridizados (30°C - 60°C) e posteriormente, a síntese de DNA é feita com DNA-polimerase e nucleotídeos (dNTPs) (72 °C), por vários ciclos repetitivos. O desenvolvimento da PCR permitiu enormes avanços na Biologia Molecular, principalmente para análise de genes, diagnóstico de doenças e patógenos, entre outros exemplos. Atualmente a PCR tem sido muito utilizada para a identificação de constituintes transgênicos em alimentos. Na detecção de grãos geneticamente modificados, a técnica de PCR mostrou-se altamente sensível, ela permite identificar um grão geneticamente modificado dentre um milhão de grãos normais. Hoje, a análise pelo método da PCR, é a única capaz de discriminar um organismo geneticamente modificado de um não transgênico. A identificação de alimentos originários de grãos transgênicos, como soja e milho, através da técnica PCR ainda é polêmica. Sendo que o resultado do teste é mais confiável quando este é positivo. Ou seja, a ausência de detecção não significa que o produto não contenha, de fato, ingredientes transgênicos. Isso ocorre pelo fato de que para detectar uma sequência de DNA, é preciso que este esteja minimamente preservado. Entretanto o que muitas vezes acontece no processo de industrialização, é que na manipulação dos ingredientes o DNA pode ser degradado (por exemplo, calor) e, com isso não ser mais detectável. Este trabalho tem como objetivo principal o estudo da viabilidade do uso da PCR na detecção de OGM's em alimentos irradiados contendo milho. Para a irradiação do material foi utilizada uma fonte de ⁶⁰Co Irradiador Gamma Cell-220 (Atomic Energy of Canada, LTD), aplicando-se doses de 25 e 50 kGy.

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores têm o direito de saber se o alimento que consomem é seguro, independentemente de como ele é produzido ou desenvolvido. Atualmente várias companhias produzem organismos geneticamente modificados OGM's, que carecem de estudos e pesquisas mais aprofundados em diversas áreas do conhecimento [1].

Por ser uma tecnologia recente, ainda não houve tempo para a realização de um bom número de trabalhos científicos envolvendo os organismos geneticamente modificados em relação as mais diversas áreas do conhecimento humano. Faltam, estudos que avaliem a sua atividade na economia mundial, sua importância nutricional, seus possíveis impactos ambientais e sua relação com outras tecnologias utilizadas na indústria alimentícia [2].

Atualmente são muitas as variedades geneticamente modificadas de milho [3]. Entre elas pode-se destacar:

- Milho Bt176: produzido pela Syngenta (ex-Novartis), é geneticamente alterado de forma a produzir o seu próprio pesticida, tornando-se assim resistente a alguns insetos.

- Milho Bt11: linhagem resistente a insetos e tolerante a herbicidas, contendo a proteína inseticida Cry1Ab, isolada da bactéria *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kustaki* cepa HD1 a proteína herbicida acetil transferase (PAT), isolada da bactéria *Streptomyces viridochromogenes*, da empresa Syngenta.

- Milho MON810: desenvolvido pela empresa Monsanto, possui resistência a insetos, através da presença da proteína inseticida Cry1Ab.

- Milho T25: linhagem tolerante a herbicida Liberty Link T25, contendo a proteína herbicida PAT e produzido pela empresa Aventis/Bayer.

A identificação destes cultivares geneticamente modificados, pode ser realizada pela técnica da PCR – reação em cadeia pela polimerase [4]. A invenção desta técnica deu a Kary Mullis o Nobel de Química de 1993. A PCR é um método que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, utilizando-se dois iniciadores (“primers”) que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Para isso, o DNA é desnaturado (92-96°C), os “primers” são hibridizados (30 a 60) e posteriormente, a síntese de DNA é feita com uma DNA-polimerase e nucleotídeos (dNTPs) (72°C), por vários ciclos repetitivos [5].

Na detecção de grãos de soja geneticamente modificados, a técnica da PCR mostrou-se altamente sensível, ela permite identificar um grão de soja geneticamente modificada dentre um milhão de grãos normais. O tempo necessário para a análise pela técnica da PCR, gira em torno de 1,5 dias. Hoje, a análise pelo método da PCR, é a única capaz de discriminar um organismo geneticamente modificado de um grão não transgênico [6].

Apesar da grande polêmica ocasionada pela chegada ao mercado brasileiro da soja transgênica Roundup Ready, produzida pela multinacional Monsanto, contendo o transgene CP4 EPSPS, ainda não possuímos maiores estudos referentes a grãos transgênicos e seus produtos industrializados [7].

Além disso, a identificação de alimentos originários de grãos transgênicos, como soja e milho, através da técnica PCR ainda é polêmica. Sendo que o resultado do teste é mais confiável quando este é positivo. Ou seja, a ausência de detecção não significa que o produto não contenha, de fato, ingredientes transgênicos [8].

Isso ocorre pelo fato de que para detectar uma sequência de DNA, é preciso que este DNA esteja minimamente preservado. O que muitas vezes acontece no processo de industrialização, é que na manipulação dos ingredientes o DNA pode ser degradado e, com isso não ser mais detectável por técnicas de biologia-molecular como a PCR [9].

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da radiação gama de cobalto 60 na detecção de variedades de milho geneticamente modificado ou de alimentos que o contenham como ingrediente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Três tipos de alimentos foram utilizados neste experimento. Alimentos importados da África do Sul, irradiados e prontos para consumo (Roast Beef, Roast Pork, Chicken Curry e Chicken Tomato). Alimentos nacionais, adquiridos no comércio local e irradiados no IPEN (Curau, Sopa de Milho, Missoshiro e Cremogema). Sementes de milho propriamente ditas (Bt11 como controle positivo e comercial a granel). Durante o desenvolvimento do trabalho também foram testadas amostras de um alimento (Fajita) possuidor de milho Bt11 em sua formulação, conforme estudos anteriores desenvolvidos por Greiner *et al.*, 2004 [10].

3.2 Irradiação

As amostras foram irradiadas no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) em fonte de ^{60}Co , Gammacell 220 (A.E.C. Ltda) em temperatura ambiente, com uma taxa de dose de 4,34 kGy/h. As amostras foram irradiadas com doses de até 50 kGy.

3.2 Primers para PCR

Os primers utilizados estão representados na seguinte tabela:

Tabela 1: Primers utilizados

<i>Milho controle</i>	<i>IVR1-F</i>	<i>5'-CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C-3'</i>	<i>amplifica</i>
	<i>IVR1-R</i>	<i>5'-GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C-3'</i>	<i>226 pb</i>
<i>Bt11</i>	<i>IVS2-2</i>	<i>5'-CTG GGA GGC CAA GGT ATC TAA T-3'</i>	<i>amplifica</i>
	<i>PAT-B</i>	<i>5'-GCT GCT GTA GCT GGC CTA ATC T-3'</i>	<i>189 pb</i>

3.3 Montagem da PCR

Para a realização da PCR cada microlitro da solução de DNA foi adicionada a uma solução de vinte e quatro microlitros de mastermix composta por: 15,9µl de água bidestilada, 2,5µl de 10xPCR-buffer, 1,0µl de cada primer (5 µM), 2,0µl de dNTP (2,5mM), 0,1µl de Taq polimerase (5U/µl) e 1,5µl de cloreto de magnésio.

3.4 Programação da PCR

Para a realização da PCR foi utilizado o seguinte programa. Dez minutos a 95°C para a desnaturação inicial; quarenta ciclos de um minuto e meio cada, sendo trinta segundos a 95°C para desnaturação, trinta segundos a 64°C para anelamento e trinta segundos a 72°C para extensão. Ao final dos ciclos a temperatura de 72°C foi mantida por sete minutos para finalizar a PCR.

Após a realização da PCR, os resultados foram obtidos através da eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio e devidamente fotodocumentados.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão representados nas figuras 1 e 2.

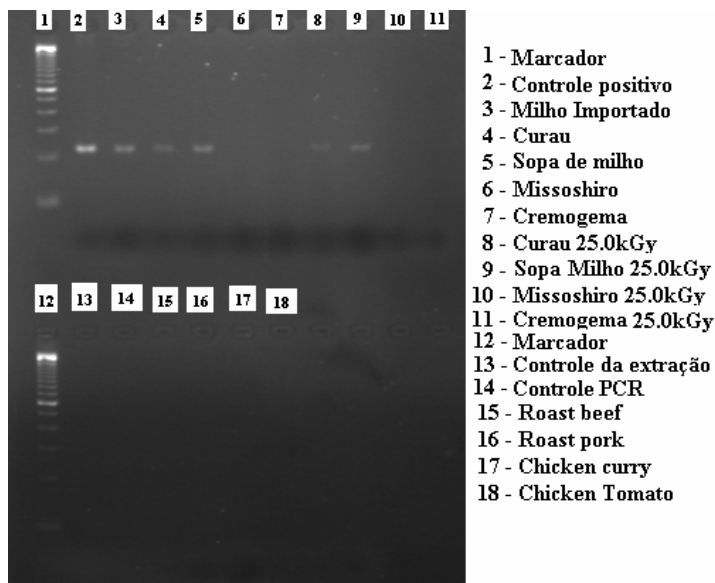


Figura 1: Eletroforese resultante de PCR utilizando-se os primers IVR1 (milho).

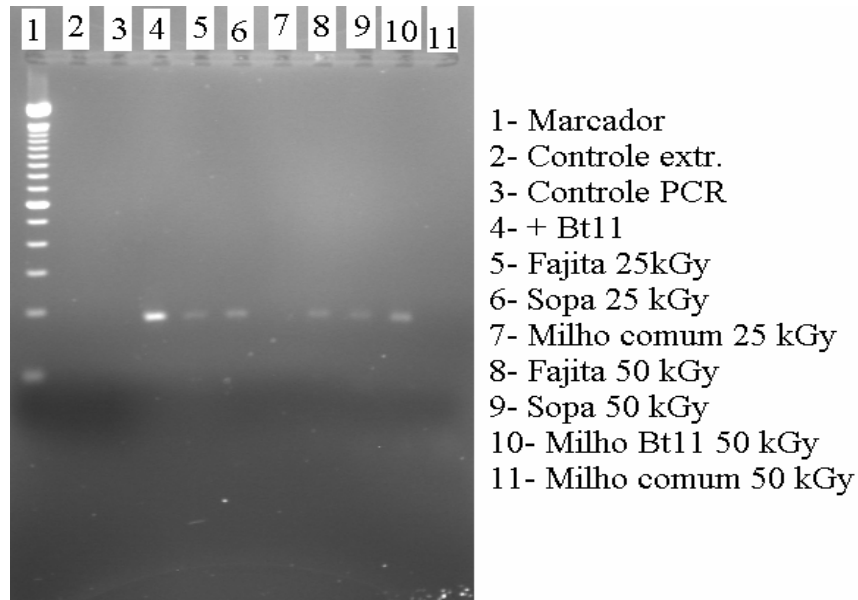


Figura 2: Eletroforese resultante de PCR com os primers IVR2-2 e PAT-B (Bt11).

Após a PCR utilizando-se os primers IVR1, pode-se observar que alguns alimentos industrializados contendo milho em sua formulação, apresentaram resultado negativo para a presença de milho através da PCR. Destes alimentos dois (Cremogema e Missoshiro) se apresentam na forma de pó, onde o milho não foi identificado nem mesmo nas amostras não irradiadas. Tal fato pode ser explicado pela baixíssima quantidade de milho no manufatura ou então no processo de industrialização, sendo que um dos produtos apresenta-se simplesmente como amido de milho refinado. Os outros quatro produtos que apresentaram resultado negativo, mesmo contendo milho em sua confecção foram os alimentos irradiados prontos para consumo (Roast Beef, Roast Pork, Chicken Curry e Chicken Tomato). Neste caso podemos supor que o processo de industrialização e irradiação do produto, somado a uma baixa quantidade de milho no material analisado possa explicar este tipo de resultado.

Dois produtos (Curau e Sopa de Milho) tiveram resultados positivos para a presença de milho, Fig.1: 4 e 5. Mesmo após a irradiação com doses de 25kGy estes produtos mantiveram os resultados positivos, o que demonstra que neste caso a irradiação não afeta o resultado da PCR. Na figura 2, podemos observar que a “Sopa” realmente possui como ingrediente o

milho Bt11, e que o resultado desta detecção na se altera com a irradiação do alimento, mesmo que esse seja feito a altas doses 50 kGy. Também foram testadas amostras de um alimento sabidamente possuidor de ingrediente contendo Bt11 (Fajita). Também neste caso os resultados não se alteraram com doses de 25 e 50 kGy.

Os testes de detecção para Bt11 utilizando-se as sementes do milho, mostraram resultados pertinentes aos encontrados nos alimentos prontos contendo esta variedade. Na figura 2, podemos observar que amostras de sementes de milho irradiadas com dose de 50 kGy continuam obtendo resultado positivo na detecção pela PCR.

5. CONCLUSÃO

Podemos concluir que processos industriais relacionados a manufatura dos alimentos realmente podem interferir na detecção de seus ingredientes pela técnica de PCR. O que pode ser comprovado neste estudo com os alimentos oriundos de milho (Cremogema) e que o possuem como ingrediente (Missoshiro) não podendo ser detectado pela técnica de PCR.

Entretanto a irradiação de alimentos não mostrou nenhuma interferência quanto a aplicabilidade do uso da reação da PCR na detecção de organismos geneticamente modificados contendo milho. Mesmo em condições extremas (50 kGy) equivalente a doses muito acima daquelas utilizadas em alimentos, a detecção de OGM's em alimentos continua sendo possível.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS

1. S.B. Cavalli, Food safety: the approach to transgenic foods, *Rev. Nutr. Campinas*, **Vol 14** suppl.0, (2001).
2. P.C. Binsfield, Análise diagnóstica de um produto transgênico. *BioTecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Brasília, **Vol 2**, n.12, p.16-19, (2000).

3. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – Comunicado Número 15 – Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/ctnbio/legis/comunicados/015.htm>> Acesso em: 26/04/2004.
4. E.Romano, Extração de DNA de Plantas, *BioTecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Brasília, **Vol 2**, v.II, n.9, p.40. (1999).
5. A.A. Ikuno, Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), in: Curso Básico de Biologia Molecular Aplicada – Instituto Biológico de São Paulo., (2000).
6. E. Gachet, Detection of genetically modified organisms by PCR: a brief review of methodologies available, *Trends in Food Scien. Technol.* **Vol 9**, p.380, 1999.
7. A.R.Silva, Faltam provas. Agroanalysis, Rio de Janeiro, v.20, n.8, p.59-61, (2000).
8. J.H. Dickinson, – The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods, *Lett. Appl. Microbiol.* N20, p.212, (1995).
9. R. Greiner, Models Systems for developing detection methods for foods derived from genetic engineering. *J. Food Comp. Anal.*, n.10, p.28, (1998).
10. R. GREINER, U. Konietzny e A.L.C.H. Villavicencio, Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control. Article in Press*, available online at www.sciencedirect.com in 13/01/2005.