

Desenvolvimento de Metodologia para Detecção Simultânea de Organismo Geneticamente Modificado e de Patógenos em Extrato Hidrossolúvel de Soja

Andrea Matos¹
Edna Maria Morais Oliveira²
Renata Torrezan³
Ana Lúcia Penteado⁴

Introdução

A busca por métodos analíticos rápidos e multi-alvos é uma constante dentre os profissionais envolvidos no desenvolvimento de metodologias analíticas. Dentro deste contexto, as equipes do Laboratório de Diagnóstico Molecular e de Microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos realizaram uma série de experimentos com o objetivo de detectar simultaneamente a soja geneticamente modificada (soja RR) e bactérias patogênicas, que possam estar presentes em extrato hidrossolúvel de soja.

Material e Métodos

Preparação do leite de soja

O extrato hidrossolúvel de soja foi produzido, segundo o proposto por Felberg et al. (2003), utilizando-se soja convencional e soja RR. Os teores de soja RR nas formulações foram de: 0,1% , 1,0% , 2,0% , 5,0% ,

10,0% , 25,0% e 50,0%.

Inoculação de Enterobacter spp. para garantir a contaminação nas formulações de soja

A contaminação das formulações com bactérias foi conduzida no Laboratório de Microbiologia, adicionando-se 100mL de suspensão de células de *Salmonella enteritidis* (mantidas em TSA), com 60 UFC (unidades formadoras de colônia) por 1000mL de cada formulação.

Extração de DNA

O DNA total das formulações foi isolado usando o kit DNeasy (Qiagen) e o método descrito por Leão et al. (2004), com adaptações realizadas pela equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular.

Detecção/Quantificação de patógenos e de soja RR

A detecção de bactérias foi conduzida por reação em

¹ Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, andreams@ctaa.embrapa.br

² Engenheira Química, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, edna@ctaa.embrapa.br

³ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, torrezan@ctaa.embrapa.br

⁴ Farmacêutica, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, analucia@ctaa.embrapa.br

cadeia da polimerase qualitativa (PCR) usando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) da região conservada do RNA ribossomal de procaríotos (16SrRNA), validados por Löfström (2004), no termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). As condições para um volume final de 50 mL de reação foram: 150ng de DNA total; dNTPs 0,4mM; MgCl₂ 3,5mM; 10nM mistura de *primers*; 2,5U de enzima (Taq DNA polimerase). A ciclagem da reação foi conduzida a 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos composto das seguintes etapas: 95°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; 72°C por 4 minutos. Subsequentemente, os produtos da PCR foram analisados e fotodocumentados (Sistema Vilbert-Biosystems).

A soja RR foi detectada e quantificada por PCR em tempo real, usando o kit comercial GMO 35S Detection (Applied Biosystems), que usa o sistema TaqMan para a quantificação do fragmento do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, componente da construção gênica presente na soja RR, além do fragmento do gene para lectina (gene endógeno da soja). As corridas de PCR em tempo real foram conduzidas no ABI SDS7000 (Applied Biosystems).

Também foram conduzidas reações usando Sistema SYBR GREEN, usando os primers já validados para lectina (GERMINI et al., 2004) e para RR (MARCELINO; GUIMARÃES; BARROS, 2007). A curva padrão foi construída usando material de referência certificado (MRC), contendo 0,0%; 0,5%; 1,0% e 2,0% de soja RR (padrões Fluka).

Resultados e Discussão

Após a PCR, os resultados da detecção de patógenos presentes nas formulações foram analisados por eletroforese horizontal. Na Fig 1. estão apresentados os produtos da PCR. Pode-se afirmar que os métodos de extração usados foram eficientes no isolamento de DNA total e que o patógeno foi detectado em todos os isolados. Entretanto, os produtos da PCR foram mais específicos nas reações onde os extratos do kit DNeasy foram usados na reação (raias 3 e 4), quando comparados com os isolados obtidos com o método Leão et al. (2004) (raias 1 e 2) modificado pelo autor (dados não mostrados).

1. Leite de soja convencional– extraído com Protocolo Leão et al. (2004) modificado pelo autor; 2. Leite de soja transgênico – extraído com Protocolo Leão et al. (2004) modificado pelo autor; 3. Leite de soja convencional– extraído com Protocolo com kit comercial – DNeasy para bactérias; 4. Leite de soja transgênico– extraído com Protocolo com kit comercial – DNeasy para bactérias; 5. Controle positivo; 6. Padrão de 25 pb (Invitrogen)

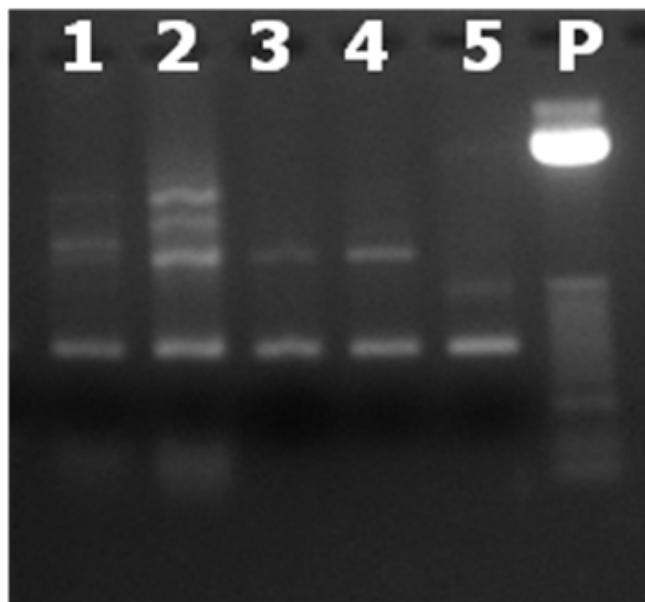


Figura 1: Produtos da PCR qualitativa para detecção de patógenos em formulações de soja.

Com o objetivo de quantificar o percentual de soja RR no “leite de soja”, foram conduzidas PCR em tempo real (quantitativas), usando a curva padrão construída com os dados obtidos dos padrões de soja RR (MRC). A quantificação de OGM em alimentos processados é importante, pois vai ao encontro do Decreto Lei de Rotulagem (BRASIL, 2003).

As curvas de amplificação da PCR em tempo real, a curva de dissociação e a curva padrão construída usando material de referência certificado, contendo diferentes percentuais de soja RR, estão apresentadas na Fig. 2.

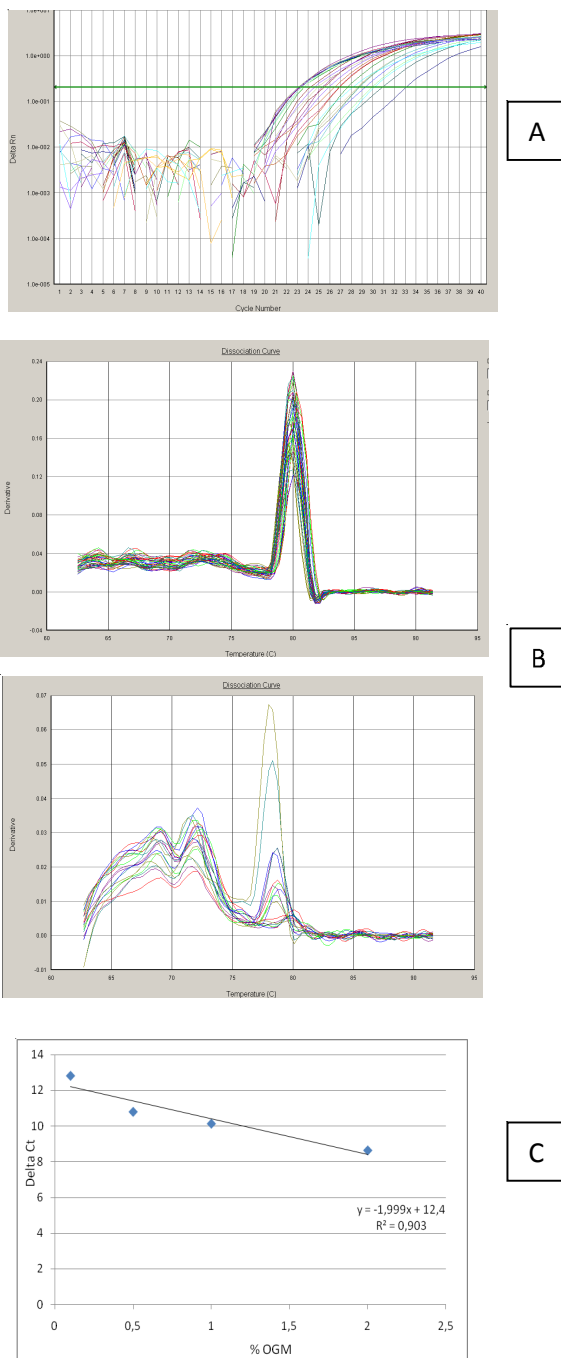


Figura 2: A- Curvas de amplificação dos padrões de soja RR e das formulações, usando sistema TaqMan; B- Curvas de dissociação das reações que foram conduzidas usando o sistema SYBR GREEN; C- Curva padrão construída a partir dos MRC de soja RR.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores calculados para o percentual de OGM (soja RR) nas formulações preparadas no Laboratório de Leguminosas.

Tabela 1. Percentual de soja RR determinado a partir da curva padrão construída com os Materiais de Referência Certificados (MRC).

Amostra	% soja RR
F1	0,11
F2	1,01
F3	2,03
F4	>5,0*
F5	>5,0
F6	>5,0
F7	>5,0

*Os pontos da curva padrão são de 0,0 a 5,0% de soja RR.

Conclusão

Com apenas uma extração foi possível verificar a presença de DNA recombinante de Soja *Round up Ready*[®], pela técnica PCR em tempo real (com sonda da *Applied Biosystem* e com SYBR GREEN - primers: Lectina (GERMINI et al., 2004); RR (MARCELINO; GUIMARÃES; BARROS, 2007) e DNA de bactérias pela técnica de PCR convencional.

Embora a extração do DNA total tenha permitido a detecção dos dois alvos, é necessário o aperfeiçoamento da metodologia para conduzir uma única reação e detectar os dois alvos: bactéria e OGM.

Referências

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de 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 [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 abr. 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/d4680.htm>. Acesso em: 11 nov. 2009.

FELBERG, I; CABRAL, L. C.; DELIZA, R.; FURTADO, A.; TORREZAN, R. **Obtenção de bebidas esterilizadas à base de soja e castanha-do-brasil**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2003. 2 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado

técnico, 65).

GERMINI A. ; MEZZELANI, A.; LESIGNOLI, F.; CORRADINI, R.; MARCHELLI, R.; BORDONI, R.; CONSOLANDI, C. ; DE BELLIS, G. Detection of genetically modified soybean using peptide nucleic acids (PNAs) and microarray technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4535-4540, 2004.

LEÃO, S. C.; MARTIN, A.; MEJIA, G. I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. da S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. 2004. 164 p.

Disponível em: <<http://www.esmycobacteriology.eu/>

Inco.htm > . Acesso em: 10 out. 2009.

LÖFSTRÖM, C.; KNUTSSON, R.; AXELSSON, C. E.; RÅDSTRÖM, P. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 69-75, jan. 2004.

MARCELINO, F. C.; GUIMARÃES, M. F. M.; BARROS, E. G. de. Detecção e quantificação de alimentos geneticamente modificados: o panorama brasileiro. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 313, p. 239-249, 2007.

Comunicado

Ministério da Agricultura,

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Fone: (0XX21) 3622-9600

Fax: (0XX21) 3622-9713

Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>

E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*

Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Renata Torrezan, Ronoel Luiz de O. Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes*

Secretária: *Michele Belas Coutinho*

Supervisão editorial: *Comitê de Publicações*

Revisão de texto: *Edmar das Mercês Penha*

Normatização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*

Editoração eletrônica: *Marcos Moulin e André Luis do Nascimento Gomes*