

Detecção de organismos geneticamente modificados em soja: Uma análise de diferentes técnicas de detecção



<https://doi.org/10.56238/tecnocienagrariabiosoci-024>

Ariane Pereira de Souza

Centro Universitário Integrado, Brasil
E-mail: arianepereirawedewer@gmail.com

André Ricardo Peron dos Santos

Centro Universitário Integrado, Brasil
E-mail: andreperoff@gmail.com

Laís de Souza Braga

Centro Universitário Integrado, Brasil
E-mail: biomedicina@grupointegrado.br

RESUMO

Devido a criação de novas cultivares de soja e regulamentações acerca de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), tem-se a necessidade de detecção e análise dessas sementes que pretendem ser comercializadas. O presente trabalho tem por objetivo realizar um levantamento de protocolos de detecção de OGMs em soja. Trata-se de uma revisão de literatura sistemática, cuja busca foi realizada no banco de dados Pubmed, com

a utilização dos seguintes termos em conjunto: “Plants, Genetically Modified; Organisms, Genetically Modified; Multiplex Polymerase Chain Reaction; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Polymerase Chain Reaction; Soybeans”. Houve também aplicação de filtros para refinamento dos resultados, com um número final de 217 resultados. Em pesquisa, observou-se que diferentes protocolos estão sendo utilizados e dentre eles, métodos mais excêntricos como a utilização de LAMP (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop), ou uma adaptação de método de Sion. O uso de PCR Digital, Multiplex e em Tempo Real se fez presente dentre os demais protocolos, cada um contendo suas variações. A tecnologia presente aplicada na execução destes requer um alto capital, pois grande parte dos materiais são de origem estrangeira, demandando tempo e custo elevado. Há importância de estabelecer um protocolo padrão onde tenha qualidade e custo-benefício que se adeque às demandas do laboratório para a pesquisa e identificação de OGMs em amostras de soja.

Palavras-chave: Soja, Reação em Cadeia da Polimerase, DNA.

1 INTRODUÇÃO

A soja é conhecida cientificamente como *Glycine Max* (L.) Merrill, originária da Ásia Oriental e considerada a principal oleaginosa cultivada anualmente no mundo, fazendo parte do conjunto de culturas agrícolas com maior destaque no mercado mundial. (RHODEN *et al.*, 2020). Sendo o principal produto da agricultura brasileira, a soja tem sua produtividade em grandes escalas nas últimas décadas no Brasil, onde a utilização de sementes transgênicas vem sendo essencial a esse aumento. (MENDONÇA, 2017).

Segundo Miranda *et al.* (2017), os organismos geneticamente modificados (OGMs) são organismos que sofrem modificações em seu DNA, sendo possível a transferência de genes de um organismo para outro, utilizando as técnicas de Engenharia Genética. O foco dos OGMs é a busca por apresentar alimentos com valores nutricionais elevados com a utilização da tecnologia do DNA recombinante. O melhoramento de plantas ofereceu um aumento de 100% na produção em relação a



um aumento de 12% da área plantada, sendo assim, a prática produtiva por área apresentou mudanças significativas, juntamente com a facilidade na adaptação de diferentes condições divergentes. Esses valores podem ser maiores com o avanço de pesquisas nessa área. (COSSETIN; DURANTE, 2018).

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é essencial para o melhoramento vegetal e baseia-se na amplificação *in vitro* de um segmento específico de DNA, gerando ao final dos ciclos milhões de cópias que poderão ser analisadas. Para realizar a reação é necessário uma amostra do DNA que será amplificado, uma enzima Taq DNA polymerase, dNTPs e primers projetados para delimitar uma região de interesse. Essa técnica é bastante utilizada em laboratórios de melhoramento genético para a identificação de amostras geneticamente modificadas. (ANDERLE, 2021).

É por meio da detecção precisa de OGMs na soja que podemos proteger a saúde humana, garantir a precisão da rotulagem de alimentos e atender às regulamentações de comércio internacional. (SOGA *et al.*, 2020).

Considerando a importância do cultivo de soja e os avanços tecnológicos na área de modificação genética para melhoramento de produção, este trabalho tem o intuito de avaliar protocolos descritos na literatura que otimizam e flexibilizam os processos em programas de melhoramento genético, além de aumentarem a eficiência das técnicas.

2 METODOLOGIA

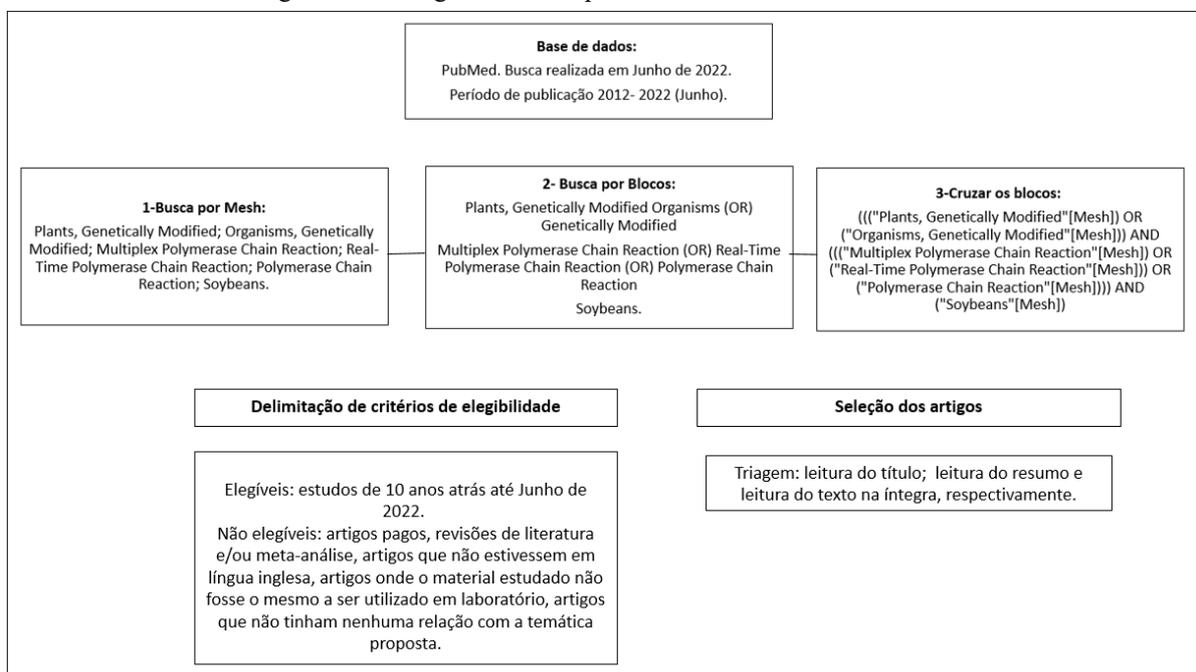
O presente estudo se trata de uma revisão sistemática. Seguiu-se um padrão de pesquisa que consistiu na busca virtual, com a utilização da base de dados Pubmed em Junho de 2022 por três pesquisadores de forma independente e síncrona sob validação do especialista. Para isso utilizaram-se os seguintes “Mesh terms”: Plants, Genetically Modified; Organisms, Genetically Modified; Multiplex Polymerase Chain Reaction; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Polymerase Chain Reaction; Soybeans. Na sequência foram colocados termos agrupados em: Plants, Genetically Modified Organisms (OR) Genetically Modified. Multiplex Polymerase Chain Reaction (OR) Real-Time Polymerase Chain Reaction (OR) Polymerase Chain Reaction.Soybeans. Para finalizar esta etapa, cruzamos os blocos, (((“Plants, Genetically Modified”[Mesh]) OR (“Organisms, Genetically Modified”[Mesh])) AND (((“Multiplex Polymerase Chain Reaction”[Mesh]) OR (“Real-Time Polymerase Chain Reaction”[Mesh])) OR (“Polymerase Chain Reaction”[Mesh]))) AND (“Soybeans”[Mesh]).

Foram delimitados também critérios de elegibilidade, onde foram considerados elegíveis todos os estudos de 10 anos atrás até Junho de 2022 (Figura 1). Foram excluídos artigos pagos, revisões de literatura e/ou meta-análise, artigos que não estivessem em língua inglesa, estudos onde o material estudado não fosse o mesmo a ser utilizado em laboratório e também artigos que não possuíam nenhuma relação com a temática proposta. A busca, portanto, consistiu inicialmente na seleção de



artigos pelo título, onde os que apresentaram relação com o objetivo do estudo foram incluídos, e, posteriormente, tiveram seus devidos resumos submetidos a uma leitura, onde mantiveram-se os que possuíam em seu conteúdo métodos para a detecção de organismos geneticamente modificados em soja, cumprindo os requisitos do estudo. Por fim, a etapa de seleção concluiu-se pela leitura dos artigos completos, dos quais permitiriam que fosse realizada uma análise comparativa entre as diversas técnicas de detecção de OGMs em diferentes tipos de amostras de soja, além da recuperação de referências presente nesses estudos, que possibilitou uma maior fonte de informações para a construção desse estudo. Existem ainda dados complementares que poderão ser incluídos nesse trabalho em formato de tabela.

Figura 1. Estratégia de busca aplicada na base de dados Pubmed.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante aplicação de filtros, obtiveram-se um total de 217 artigos. A triagem e seleção dos estudos para inclusão na revisão sistemática consistiu na leitura do título, resumo e texto na íntegra. Após a análise do título obteve-se um N de 165 artigos. Com a remoção de triplicatas e leitura do resumo, o resultado do N foi de 40. A leitura do texto completo filtrou ainda mais esse valor, resultando em um N de 20 artigos. Por fim, foram incluídos seis artigos nesta revisão bibliográfica sistemática, na qual um é proveniente da China, outro da Noruega e os demais do Japão.

As cultivares de soja geneticamente modificadas (GM) são produzidas em todo o mundo e cabe às autoridades administrativas de cada país suas devidas regulamentações acerca destas (SOGA *et al.*, 2020). Desde 1996, onde teve sua completa comercialização, culturas geneticamente modificadas foram substanciais economicamente, beneficiando o setor agrícola, de distribuição e consumidor.



(TSUKAHARA *et al.*, 2016). Um exemplo é o Japão, onde tradicionalmente sua culinária tem a inclusão da soja, porém o país produz menos de 10% do que consome, sendo a maior parte importada dos Estados Unidos e Brasil, onde até 2018, 96% da soja cultivada no Brasil era geneticamente modificada. (SOGA *et al.*, 2020).

3.1 PCR CONVENCIONAL VERSUS PCR EM TEMPO REAL

Para iniciar as análises metodológicas de identificação de OGM em soja, o estudo de Tsukahara *et al.* (2016) tem como proposta o uso de PCR para um evento específico (MON87701) para detecção quantitativa de OGMs. A obtenção de amostra e preparo da extração de DNA se deu por meio de sementes secas de soja GM e não GM que foram homogeneizadas e incorporadas após moagem. Para obtenção do material genético utilizou-se o kit de extração DNeasy® Plant Maxi, de tecnologia alemã. (TSUKAHARA *et al.*, 2016).

Juntamente às amostras, para amplificação, as seguintes proporções de reagente foram adotadas: 25ng de DNA, 200 mM de dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,625 U de polimerase AmpliTaq Gold® e 0,5 mM par de primers foram adicionados em 25 µL de volume final de solução de reação. Os primers utilizados foram MON87701 direto (5'-TGGTGATATGAAGAT ACATGCTTAGCAT-3'); MON87701 reverso (5'-CGTTTC CCGCCTTCAGTTTAAA-3'). A sonda utilizada foi a MON87701 (5'-TCA GTGTTTGACACACACACTAAGCGTGCC-3'). O programa de amplificação utilizado seguiu a ciclagem de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C e 30 seg a 72°C. (TSUKAHARA *et al.*, 2016).

Para a PCR em tempo real, as amostras foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo 50 ng DNA, 12,5 µL Universal Master Mix, par de primers de 0,5 mM e sonda de 0,2 mM em triplicata para cada amostra. Sua ciclagem foi de 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 45 ciclos de 30 seg a 95°C e 1 min a 59°C. (TSUKAHARA *et al.*, 2016).

Em relação a veracidade e precisão, foram avaliados os seguintes vieses: repetibilidade do desvio padrão relativo e reprodutibilidade do RSD. Para o limite de quantificação, fora estabelecido como a menor concentração que pode ser determinada quantitativamente com um nível aceitável de precisão e exatidão de acordo com o padrão internacional de quantificação de OGM, de modo que ao final do estudo o método desenvolvido teve sua veracidade e precisão semelhante a estudos anteriormente realizados, com variações de 2,3 a 7,0%, de 3,5 a 10,2%, e de 16,8 a 24,4%, com o valor de Cf totalizando 1,24 para o ABI7900, cujo desempenho se mostrou adequado para monitoramento de grãos de soja do Japão. (TSUKAHARA *et al.*, 2016).



3.2 PCR EM TEMPO REAL TRIPLEX

No trabalho realizado por Soga et al. (2020), os autores obtiveram uma análise qualitativa e quantitativa por meio de um protocolo comparativo baseado em 3 etapas de PCR em tempo real. (SOGA *et al.*, 2020). Após a obtenção de suas sementes, submeteu-as a um processo de limpeza e secagem com solução de dodecil sulfato de sódio a 5% (p/v), enxágue com água e, posteriormente secas a 40°C durante o período de 16h. Apenas um grão de soja individual foi moído usando um Multibeads Shocker. As amostras foram submetidas a um ciclo de moagem regulado em 1000 rpm por 15 segundos, seguido de 2000 rpm por 15 segundos e 2500 rpm por 15 segundos. (SOGA *et al.*, 2020).

Para extração de DNA, foi utilizado o kit de extração GM quicker 96. A concentração e a qualidade de cada amostra de DNA foram estimadas medindo a absorbância. Os primers e sondas escolhidos pelo autor foram: RRS 01-5' RRS 01-3' RRS-Taq, MON89788-F MON89788-R MON89788-P, KVM175 SMO001 TM031, SHA003 SHA004 TM058, MON 87705-1, MON 87705-2, MON 87705-sonda, MON87769 iniciador 1, MON87769 iniciador 2, sonda MON87769, MON 87701-1, MON 87701-2, MON 87701-sonda. (SOGA *et al.*, 2020).

A replicação ocorreu por três métodos de PCR em Tempo Real Triplex, projetados para rastrear a presença de soja GM em amostras. As sequências alvos foram amplificadas e monitoradas por meio da intensidade de fluorescência de corantes 6-carboxifluoresceína (FAM), TexasRed® e Sulfo-Cyanine5 (Cy5). As reações foram realizadas com um volume final de 20µL, onde continha 50ng de DNA, 10µL FastStart Universal Probe Master (Sem ROX), 0,1µL de cada 50-µM Iniciador M, 0,2µL de cada 10-µM sonda e H₂O para completar. Enquanto a ciclagem térmica foi definida da seguinte forma: 95°C por 10min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 15s e 55°C por 1min. Um controle positivo foi utilizado na reação. (SOGA *et al.*, 2020).

A reação foi realizada por PCR em Tempo Real, com volume de reação de 25 uL (5ng de DNA, 12,5uL FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Diagnostics KK), 0,8µM cada primer, 0,1µM Sonda e H₂O). A reação foi definida com desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguidas de 45 ciclos de 95°C por 15s e 55°C por 1 minuto. Reações com valores de C_q inferiores a 35 e gráficos de amplificação exponencial foram classificados como positivos. As reações com valores de C_q inferiores a 35, mas sem amplificação exponencial, foram classificadas como positivas, enquanto as reações com valores de C_q superiores a 35 foram classificadas como negativas. (SOGA *et al.*, 2020).



O método consiste em 3 etapas tendo como função triar os genes transgênicos mais amplamente utilizados e sequências específicas de eventos usando três métodos de PCR em Tempo Real Triplex. O DNA genômico preparado a partir de um único kernel foi usado como molde em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços. (SOGA *et al.*, 2020). A 1ª etapa tem por objetivo detectar Cp4-epsps, Pate MON87708, que cobrem mais de 80% de todos os eventos de soja GM autorizados no Japão (total de 25 eventos), com a utilização do método de PCR em Tempo Real Triplex. Todos os eventos restantes foram detectados usando PCR em Tempo Real Triplex na 2ª e 3ª etapas. Para testar a confiabilidade do sistema de detecção de grãos de soja GM desenvolvido, o DNA genômico preparado a partir de grãos GM genuínos ou CRMs foi testado como modelo. Todos os três métodos de PCR em Tempo Real Triplex projetados detectaram com sucesso as sequências alvo em cada evento de soja GM em valores de Cq de 22,05–32,71. (SOGA *et al.*, 2020).

3.3 PCR DIGITAL E 6-PLEX

Descrito pela primeira vez na década de 90, a PCR digital (dPCR) foi proposta no estudo de Kosir *et al.* (2017). A técnica tem por finalidade a amplificação de alvos específicos dentro de uma amostra. Cada replicação funciona como um teste qualitativo se apresentando como “Positivo” ou “Negativo” independentemente da amplitude do sinal. Ao contar as partições negativas e positivas, o número de cópias de DNA em uma amostra pode ser calculado usando a distribuição de Poisson²⁰. O autor relaciona a técnica de dPCR com o ensaio 6-plex que tem como alvo todos os cinco eventos GM de soja (p35S, tNOS, ctp2-cp4-epsps, bar e pat). (KOSIR *et al.*, 2017).

O DNA foi obtido por meio de extração e purificado por meio do método *In House* a partir de 200mg de material para todas as amostras, usando um protocolo de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), com RNase-A e proteinase-K, para remoção de RNA e proteína das amostras. (KOSIR *et al.*, 2017). Essa técnica foi realizada com a utilização do Autodimer, aparelho responsável por executar o alinhamento local de todos os primers e sondas em um ensaio de PCR Multiplex sem a inclusão de lacunas. Durante esse processo, o aparelho atribui um valor de +1 para cada correspondência encontrada e um valor de -1 para cada incompatibilidade identificada. De acordo com as diretrizes, uma pontuação de no mínimo 7 é considerada como um indicativo de uma interação significativa. (KOSIR *et al.*, 2017).

No total, 15 conjuntos de primers e sondas foram preparados para as reações simplex que visavam o evento GM individual de soja. Todas as sondas para os eventos GM e endogene (FAM) foram marcadas com 6-carboxifluoresceína, enquanto endogene Le1 foi marcada com 5'-hexacloro-fosforamidite de fluoresceína. (KOSIR *et al.*, 2017).



Primers e sondas foram projetados para as reações simplex, duplex e multiplex, inclusive para a Le1. Para a reação duplex obteve-se 15 conjuntos, cada um contendo primers e sondas individuais de cada evento, mais os primers e sondas para Le1. 7-plex e 11-plex fizeram uso dos mesmos primers e sondas, no entanto, para a 11-plex houve adição de primers e sondas correspondentes a amostras GM de FG72, DAS-44406-6, DAS-81419-2 e DAS-68416 -4. (KOSIR *et al.*, 2017).

As PCR digitais foram realizadas em um volume final de 20uL, para isso receberam as seguintes proporções: 10 uL 2×ddPCR Supermix para sonda (sem dUTP), 6 uL de primer e mistura de sonda (correspondente 6-plex, 7 -plex ou 11-plex) , 4 uL de DNA, para o branco 4uL de H2O ultra pura. Gotas geradas em cartuchos DG8, por meio de gerador de gotas QX100 Droplet Digital System. As emulsões (água em óleo) foram aplicadas em uma placa de 96 poços para amplificação em um ciclador de PCR T100. A ciclagem se deu da seguinte forma: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de de duas etapas (15 s a 95°C e 60 s a 60°C, a uma taxa de rampa de 2,5°C/s), e incubação final a 98°C por 10 min, e, posteriormente o resfriamento a 4°C. (KOSIR *et al.*, 2017).

Ao fim da ciclagem, as placas passaram por um leitor de gotas QX100 Droplet Digital System. A análise dos dados se deu por meio do software QuantaSof, versão 1.6.6. Gotículas positivas que continham produtos amplificados foram separadas das que não continham, aplicando um limiar de amplitude de fluorescência. (KOSIR *et al.*, 2017).

Uma série de diluição de cópias alvo foi preparada misturando DNA de todos os 15 eventos GM de soja transgênica alvo. Cada amostra GM obteve 128 cópias alvo/ μ L, com exceção de A2704-12 e MON89788, que atingiram 49 e 92 cópias/ μ L, respectivamente. A quantidade de material genético de cada amostra foi verificada por duplex ddPCR. O número de cópias de quantificação e detecção para PCR digital receberam determinações baseadas nesses experimentos. Te LOQ (absoluto e relativo) determinou-se de acordo com a menor concentração que gerou um desvio padrão relativo (RSD) <25%^{26, 27}. Todas as técnicas aplicadas apresentaram viabilidade na detecção em amostras de soja GM com a utilização de diluições de 1:10 e de 2:10 e, posteriormente, com amplificações do tipo 6-plex, 7-plex e 11-plex também efetivadas com sucesso. (KOSIR *et al.*, 2017).

3.4 LAMP E PCR NESTED

Diferentemente dos demais estudos que trazem investigação e avaliação por métodos de PCR, este propõe a detecção de OGM em soja ao montar um estudo que possibilita a visualização a olho nu. Para a execução, utilizou-se amostras identificadas como GM e não GM, que foram moídas para a extração do material genômico utilizando o método *In House* com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). (LIU *et al.*, 2009).

Para identificação através do método em LAMP foram projetados dois primers internos, sendo eles, com suas respectivas sequências genômicas: FIP (50 -CGGAAAGGCCAGAGGATTTGCG-



TTTT-CAGCCTGCATGCTTCACG-30) e BIP (50-CGATCTCCCACCGGTCCTTCAT-TTTT-CGTCCTCGCCTTCCAGAA-30), e dois primers externos, com suas respectivas sequências genômicas: F3 (50 -CCTTTAGGATTTTCAGCATCAGTG-3) e B3 (50 -CATGGCCTTGCCCCGTATT-30). O preparo do analito total de 25uL volume de reação contendo 0,8mM cada um de FIP e BIP, 0,12mM cada um dos primers F3 e B3, 1,6 mM dNTPs, 1M betaína, 20mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 8 unidades do Bst Fragmento grande de DNA polimerase e 1mL de DNA alvo.

A reação foi mantida em incubação por 45min a 65°C e foi finalizada elevando a temperatura a 80°C por 3 min. Foram feitos testes em temperaturas diferentes a fim de avaliar qual seria a temperatura ótima para amplificação, sendo elas: 60°C, 62°C, 64°C e 66°C. Entretanto, o produto testado a 64°C exibiu um pouco menos de DNA do que aquele que estava um grau acima. Nenhum produto foi detectado nas outras temperaturas. (LIU *et al.*, 2009).

O DNA de plasmídeo p18RR diluído 1:10 foi usado como modelo para LAMP e a reação de PCR Nested. Para detectar amplicons LAMP diretamente no tubo de reação a olho nu, 1,0uL de SYBR Green I diluído 1:10 foi adicionado ao tubo. Na presença de amplicons LAMP a cor da solução se tornaria verde ao invés do laranja original. Géis de agarose a 2% foram feitos para determinar as condições ideais dos produtos LAMP. (LIU *et al.*, 2009).

A reação de LAMP se apresentou com um limite de cinco cópias em 70 min. A mistura de reação LAMP que continha fragmentos amplificados ficou verde imediatamente após a adição de SYBR Green I, enquanto uma solução sem amplicons manteve a cor laranja original de SYBR Green I. O plasmídeo incorporado às amostras (p18RR) funcionou como controle positivo e água destilada como controle negativo. Todas as respectivas amostras GM e não GM acusaram suas procedências. Paralelo a isto, a PCR Nested também foi realizada para as mesmas amostras simultaneamente, e os mesmos resultados foram obtidos (LIU *et al.*, 2009).

3.5 MÉTODO DE SION

O trabalho de Harikai tem a proposta de detectar sequências de DNA alvo a olho nu, do qual baseia-se na integração entre PCR e extensão de primer em uma placa plástica. (HARIKAI *et al.*, 2009).

As sementes foram obtidas secas e previamente moídas. Para a extração do DNA, foi utilizado o kit de extração DNeasy® Plant Mini Kit, de tecnologia alemã. No preparo das amostras, utilizou-se 25uL da mistura de reação que continha 12,5uL, QuantiTect Multiplex PCR Master Mix, 0,1mM em cada um dos primers, 0,5mM em cada um dos primers para GA21, uma amostra de DNA de 100 ng e água esterilizada para completar o volume final da reação. (HARIKAI *et al.*, 2009).

Para a PCR Multiplex (8-plex), a ciclagem foi a seguinte: 2min a 50-C e 15min a 95-C, seguido



de amplificação do DNA por 35 ciclos de 60s a 94-C e 60s a 61-C. Os produtos de PCR foram posteriormente utilizados para a reação de extensão do primer. As placas tratadas com primers de extensão modificados com ligantes amino na extremidade 5' e foram sintetizadas e purificadas em coluna de fase reversa. A placa também recebeu um polímero fosfolipídico biocompatível único e uma fração éster funcional altamente ativa para ligar covalentemente o sítio de ligação para oligonucleotídeos ligados a amino sob condições alcalinas. 1 uL de primer de ligação amino em solução alcalina foi adicionado na placa. A placa se manteve incubada por 3 horas e, posteriormente, foi tratada com uma solução de 0,1M de hidróxido de sódio para realização do bloqueio das reações éster. Na sequência, foi lavada com água quente, seca ao ar e armazenada a 4°C. (HARIKAI *et al.*, 2009).

A mistura de reação de extensão do primer (50ml) consistiu em 5U TERMIPol DNA polimerase 7h7 1 - tampão de reação C, 2mM MgCl₂, 50mg/ml, DNA de esperma de salmão, 0,05% triton-X 100, 100mM dATP, 100mM dGTP, 100 mM dCTP, 65 mM dTTP, 35mM biotina-11-dUTP, 5ml de produtos de PCR e água esterilizada para completar o volume final da reação. As amostras foram incubadas à 95°C por 5 min e então aplicadas na placa previamente aquecida à 72°C que se manteve a essa temperatura por 3 min. A placa foi lavada em 0,1% de triton X-100 em 50 mM de tris (pH 7,5) e depois em 50 mM tampão tris (pH 7,5). Foi incubada novamente por 20 min à 37°C com biotina conjugada + fosfatase alcalina + complexo de avidina (com 200 vezes o volume de 2% BSA e 0,01% de DNA de esperma de salmão em 50mM tampão tris (pH 7,5) e pré-incubado por 20 min em temperatura ambiente antes do uso). A placa foi lavada novamente em 0,1% de triton X-100 em 50 mM tris (pH 7,5) e depois em 50 mM tampão tris (pH 7,5). Posteriormente, foi realizada a incubação da placa à 37° por 10 min com adição de solução NBT/BCIP. Para finalizar a reação, a placa foi lavada com água ultra pura e deixada ao ar seco. (HARIKAI *et al.*, 2009).

Ao final da reação, foi possível a visualização a olho nu dos halos escuros na placa. Estes resultados indicam que este método possibilita identificar amostras contendo 1% de material GM. Entretanto, amostras com menor intensidade de sinal do que aquelas contendo 1% de OGM são invisíveis a olho nu. (HARIKAI *et al.*, 2009).

3.6 TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX

Diferentemente dos demais estudos anteriormente descritos, este propõe uma avaliação de métodos de triagem de sementes para detecção de cultivar GM. O trabalho realiza uma análise acerca da confiabilidade de detecção de laboratórios usando eventos de teste contendo diversos segmentos-alvo comuns. Para isso utilizaram amostras de cultivares RRS, A2704-12 e MON89788. (TAKABATAKE *et al.*, 2012).



As sementes secas foram obtidas íntegras para posterior moagem e a extração foi realizada por meio do kit de extração DNeasy® Plant Maxi, de tecnologia alemã. Para a análise quantitativa, cada uma das amostras continham um nível diferente de mistura de materiais de teste, ou seja, 0%, 0,50%, 1,0%, 5,0% e 10,0%. Feito isso, foram determinadas as análises interlaboratoriais baseadas no fator de conversão. (TAKABATAKE *et al.*, 2012).

A determinação do valor de Cf do segmento P35S foi realizada com amostras de soja RRS e A2704-12. RRS possui a inserção única do cassete do transgene, enquanto A2704-12 detém duas cópias de todos os segmentos recombinantes que inclui o P35S. Ao analisar os gráficos formados pela PCR em Tempo Real foi possível verificar a separação dos eventos RRS e A2704-12 em relação ao segmento P35S. Os valores de Cf alcançaram razões estimadas (número de cópias), sendo elas RRS = 1,0 e A2704-12 = 2,0. Para MON89788, o Cf foi medido por meio do número de cópias de Le1. (TAKABATAKE *et al.*, 2012).

Os métodos quantitativos de triagem podem ocasionalmente superestimar a quantidade de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) presentes em uma amostra. No entanto, durante a triagem prática é mais importante evitar a subestimação dos valores, pois quantidades de OGMs misturadas que ultrapassam o limite de rotulagem estabelecido podem ser erroneamente estimadas como muito baixas. Portanto, para determinar o valor de Cf para o gene P35S, foi escolhido o método RRS. (TAKABATAKE *et al.*, 2012).

Ao longo deste trabalho é possível verificar diferentes métodos aplicados para identificação de soja GM e, na maioria deles, o único elemento em comum é a PCR. Entretanto, sua aplicabilidade também varia, podendo ser Convencional, em Tempo Real, Multiplex e Nested.

3.7 COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES

Tsukahara *et al.* (2016), propõe um comparativo entre a PCR Convencional e a PCR em Tempo Real na detecção quantitativa de evento GM em seus eventos dentro do mesmo estudo.

Soga *et al.* (2020) faz uso PCR em Tempo Real e Multiplex, utiliza protocolo comparativo baseado em 3 etapas para uma análise qualitativa e quantitativa de soja GM. É curioso analisar que para desenvolver seu trabalho, Kosir *et al.* (2017) utiliza PCR Digital, porém para a extração do material genético faz uso do método *In House*. Com a proposta de técnica de visualização a olho nu de OGM em soja, para Liu *et al.* (2009), a PCR é apenas uma etapa do método de LAMP e assim como Kosir *et al.* (2017), o autor faz o uso de *In House* para extração de material genético, com diferentes protocolos.

Harikai *et al.* (2009), da mesma forma que Liu *et al.* (2009), apresenta um estudo cujo objetivo é a detecção de sequências de DNA alvo a olho nu, e neste trabalho a PCR também representa apenas uma das etapas.



Takabatake et al. (2012), diferentemente dos demais estudos, propõe uma avaliação de triagem de sementes para detecção de cultivar GM, realizando uma análise acerca da confiabilidade de detecção de laboratórios usando eventos de teste contendo diversos segmentos-alvo comuns, observando assim se cada laboratório envolvido estava atendendo o requisito de triagem nacional estabelecido. Partindo do princípio que cada estudo exhibe suas metodologias e resultados de maneira singular, a comparação entre eles seria um viés por se tratar de protocolos tão distintos entre si. A análise de diferentes técnicas de triagem de sementes de soja GM ocorre em nível molecular em países distintos (predominantemente no Japão). É válido pensar que a utilização da maioria dos materiais citados nos estudos são provenientes de tecnologia japonesa ou européia e no caso da implementação de protocolos que necessitam destes materiais, analisar a logística e a relação custo-benefício é fundamental. O estudo acerca de tais metodologias faz-se necessário para avaliação dos meios empregados a fim de obter uma padronização de técnicas viáveis, adequadas e confiáveis para implementação na realidade laboratorial.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, após o levantamento e avaliação de diferentes técnicas empregadas para detecção de OGM em soja presentes na literatura, alguns dos protocolos apesar de apresentarem uma proposta de detecção que chama atenção, sua aplicabilidade não se mostrou eficiente. Protocolos que ainda usam o método *In House* para extração demonstraram que essa técnica não é um empecilho no teste. A triagem para detecção de OGM baseada em 3 etapas apresentou maior eficiência e fidedignidade quando comparada aos demais estudos. Acredita-se que a partir de protocolos eficazes e fidedignos é possível promover alterações nos mesmos para que se adequem à realidade do laboratório sem perder seu padrão de qualidade.



REFERÊNCIAS

ANDERLE, L. Z.; GUIMARÃES, F. C. M.; KAWAKAMI, J.. Seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento genético da soja. *Revista Técnico-Científica*, n. 25, 2021.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira: grãos - safra 2018/19 – Terceiro levantamento. Companhia Nacional de Abastecimento, v. 7, n. 3, p. 1-28, 2019.

COSSETIN, M. R.; DURANTE, M. C. J.. Soja transgênica no Brasil: Aspectos Positivos e Negativos. *ADUBAÇÃO ORGÂNICA E MINERAL EM VARIEDADE DE FEIJÃO PRETO.*, p. 573. 2018.

HARIKAI, Naoki *et al.* Optical Detection of Specific Genes for Genetically Modified Soybean and Maize Using Multiplex PCR Coupled with Primer Extension on a Plastic Plate. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, [S.L.], v. 73, n. 8, p. 1886-1889, 23 ago. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.90215>. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/8/73_90215/_pdf.

KOSIR, Alexandra Bogožalec *et al.* Development and inter-laboratory assessment of droplet digital PCR assays for multiplex quantification of 15 genetically modified soybean lines. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 7, n. 1, 17 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09377-w>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28819142/>.

LIU, Mei *et al.* Sensitive and Rapid Detection of Genetic Modified Soybean (Roundup Ready) by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, [S.L.], v. 73, n. 11, p. 2365-2369, 23 nov. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.80723>. Disponível em: <https://academic.oup.com/bbb/article/73/11/2365/5947783>.

MENDONÇA, R. S. A segurança alimentar e nutricional no Brasil diante da produção da soja transgênica. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

MIRANDA, D. M. et al. A cultura da soja transgênica no Brasil. *PESQUISA & EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA*, n. 6, 2017.

RHODEN, A. C. et al. Análise das tendências de oferta e demanda para o grão, farelo e óleo de soja no Brasil e nos principais mercados globais. *Desenvolvimento em Questão*, v. 18, n. 51, p. 93-112, 2020.

SMALCI, A. et al. Fatores determinantes e condicionantes para inovação e competitividade no setor do agronegócio brasileiro. *Revista Metropolitana de Sustentabilidade (ISSN 2318-3233)*, v. 10, n. 1, p. 6, 2020.

SOGA, Keisuke *et al.* Development and Testing of an Individual Kernel Detection System for Genetically Modified Soybean Events in Non-identity-preserved Soybean Samples. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, [S.L.], v. 43, n. 8, p. 1259-1266, 1 ago. 2020. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b20-00382>. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/43/8/43_b20-00382/_article/-char/en

TAKABATAKE, Reona *et al.* Development and Interlaboratory Validation of Quantitative Polymerase Chain Reaction Method for Screening Analysis of Genetically Modified Soybeans. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 131-134, 2013. Pharmaceutical Society of Japan.



<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b12-00766>.

Disponível

em:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/1/36_b12-00766/_article/-char/ja/.

TSUKAHARA, Keita *et al.* Development and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean MON87701. Food Hygiene And Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), [S.L.], v. 57, n. 6, p. 187-192, 25 dez. 2016. Japanese Society for Food Hygiene and Safety. <http://dx.doi.org/10.3358/shokueishi.57.187>. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/shokueishi/57/6/57_187/_article