

Autor: Stefanie Trapmann

Comissão Europeia – Centro Comum de Investigação
Instituto de Materiais e Medições de Referência (IRMM)
Retieseweg 111, 2440 Geel, Bélgica

Email: stefanie.trapmann@ec.europa.eu

www.erm-crm.org

Utilização de materiais de referência certificados para a quantificação de OGM em géneros alimentícios e alimentos para animais

Esta nota de aplicação fornece orientações para a utilização correcta dos materiais de referência do IRMM, certificados para a fracção de massa GM (geneticamente modificada) correspondente a uma modificação genética específica.

Os dados a seguir apresentados dizem respeito à utilização dos MRC ERM-BF410, ERM-BF411, ERM-BF412, ERM-BF413, ERM-BF414, ERM-BF415, ERM-BF416, ERM-BF417, ERM-BF418 e ERM-BF423.

INTRODUÇÃO

O Regulamento (CE) n.º 1830/2003 exige a rotulagem dos géneros alimentícios e alimentos para animais constituídos por organismos geneticamente modificados (OGM) ou contendo mais de 0,9% de OGM, admitindo que esses OGM tenham sido colocados no mercado europeu em conformidade com a legislação comunitária. Logo, a quantificação dos OGM nesses produtos tem de ser realizada de forma fiável. Para tal, Materiais de Referência Certificados (MRC) apropriados são indispensáveis na garantia da qualidade analítica.

CARACTERÍSTICAS DOS MRC-OGM

Os valores certificados dos MRC acima indicados baseiam-se nas massas dos pós secos, obtidos de sementes GM e não-GM, utilizadas na preparação gravimétrica. As massas são corrigidas em função do teor de humidade e das estimativas de pureza das respectivas sementes. A fracção da massa que é GM é calculada por:

$$\frac{\text{Massa corrigida das sementes GM, em pó}}{\text{Massa corrigida das sementes GM, em pó} + \text{Massa corrigida das sementes não-GM, em pó}}$$

Cada MRC-OGM é certificado para a fracção de massa correspondente a uma modificação genética específica (evento) (indicado no certificado). Assim, só pode ser usado para quantificar o evento indicado no certificado e o correspondente material para o ensaio em branco só pode serve para provar a ausência desse evento abaixo do limiar referido no certificado.

ERM® - BF418c

DRIED MAIZE POWDER		
	Mass Fraction	
	Certified value ¹⁾ [g / kg]	Uncertainty ²⁾ [g / kg]
1507 maize	9.9	-0.6 ; +0.8

1) The certified value is based on the mass fraction of dried non-genetically modified powder and dried genetically modified powder mixed and corrected for the water content. The certified value is traceable to the SI.
2) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor $k = 2$, corresponding to a level of confidence of about 95 %.

Figura 1: Imagem parcial do certificado do MRC para OGM ERM-BF418c.

Os MRC-OGM recentemente produzidos pelo IRMM foram certificados com um intervalo assimétrico de incertezas. Assim, se estes forem utilizados no controlo de erros sistemáticos (ver a Nota de Aplicação 1 do ERM), então deve tomar-

se a 'incerteza positiva' sempre que o resultado médio das medições exceda o valor certificado e a 'incerteza negativa' quando o resultado médio das medições seja menor que valor certificado.

UTILIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (rt-PCR) é muitas vezes utilizada para quantificar as fracções GM de amostras de géneros alimentícios e de alimentos para animais. Esta técnica de quantificação mede o rácio entre o ácido desoxirribonucleico (DNA) transgénico, resultante da modificação genética, e o DNA endógeno, específico da espécie em causa.

Devido à diferente composição genética das várias partes constituintes das sementes de monocotiledóneas (ex.: casca, endosperma e embrião), o valor do rácio de DNA do material de referência pode não ser igual ao valor do rácio de DNA da fracção de massa do pó certificada. Assim, o razão "DNA transgénico extraível/DNA endógeno extraído" não é necessariamente igual a razão "massa de milho GM/massa total de milho", mesmo que os dois tipos de DNA tenham rendimentos de extracção comparáveis.

Durante a preparação dos MRC-OGM, foram tomados cuidados especiais para garantir a semelhança dos pós GM e não-GM em termos de distribuição granulométrica. Esse factor influencia particularmente a eficiência da extracção de DNA e qualquer diferença registada entre os pós GM e não-GM, alteraria o valor de concentração GM medido por rt-PCR. Logo, só devem ser usados métodos de extracção que tenham sido validados para este requisito.

Durante a certificação, a fracção de massa GM do MRC é verificada por um método rt-PCR específico do evento. No entanto, é necessária cautela ao tirar conclusões das medições feitas em amostras desconhecidas, já que a quantificação do teor GM baseada no DNA pode variar com a variedade testada. Se não houver qualquer informação, é conveniente investigar a influência das diferentes variedades nos resultados da rt-PCR, por meio de um processo de validação interna [1].

Os métodos de detecção por rt-PCR, apresentados e validados nos termos do Regulamento (CE) n.º 1829/2003, estão acessíveis ao público através da página Internet do

laboratório comunitário de referência para os géneros alimentícios e alimentos para animais GM: <http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm>.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS EM NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE DNA

Na Europa, a metodologia mais utilizada para a quantificação de OGM é a rt-PCR, razão pela qual uma recente Recomendação da Comissão (2004/787/CE) propõe expressar os resultados das medições, em amostras GM, em número de cópias de DNA. Se se usarem MRC-OGM, certificados para a fracção de massa GM, na calibração das medições e se se apresentarem os resultados finais em número relativo de cópias, então deve atender-se a que estes MRC foram produzidos utilizando milho GM heterozigótico para o transgene. A informação relativa à zigosidade dos materiais utilizados para a produção dos MRC consta do respectivo relatório de certificação. Por outro lado, é necessário ter em consideração que os números relativos de cópias de DNA GM, no caso do milho, são influenciados pela forma como a variedade

híbrida GM foi obtida e pelo estado de endorreduplicação das sementes, que aumenta o impacto da distribuição genómica no endosperma. Considerando os casos extremos, os números relativos de cópias do DNA geneticamente modificado poderão ir de 33 % (evento transgénico proveniente da linha masculina utilizada para a obtenção da semente heterozigótica) a 66 % (evento transgénico proveniente da linha feminina utilizada para a obtenção da semente heterozigótica), partindo do pressuposto de que a endorreduplicação é tão intensa que o impacto do endosperma é próximo de 100 %. Todos os outros casos (menor influência da endorreduplicação e maior influência do tecido do embrião) conduzirão a valores entre 33 % e 66 %, partindo do pressuposto de que, em comparação com esses efeitos, pode desprezar-se o impacto da casca da semente. Apresenta-se em seguida um exemplo de conversão para número relativo de cópias, de um resultado de medição e respectiva incerteza, originalmente em g/kg.

EXEMPLO

Usando para a calibração MRC, certificados para a sua fracção de massa GM, verificou-se que uma amostra de milho continha 65 ± 20 g/kg de milho com o evento 1507. A incerteza expandida de medição, 20 g/kg, foi calculada utilizando o factor de cobertura 2 e uma incerteza de medição do método de quantificação de 15 %, estimada durante a validação interna. Para transformar o resultado obtido para a fracção de massa GM numa relação entre números de cópias, o resultado em g/kg tem de ser convertido em percentagem, dividindo-o por 10. Deve tomar-se em consideração que os MRC-OGM utilizados para a calibração foram produzidos a partir de sementes de milho heterozigóticas, logo os resultados terão de ser divididos por 2:

$$\frac{\bar{x}}{10 \times 2} = \frac{65}{20} = 3,3 \quad \text{em que } \bar{x} = \text{valor médio das medições do teor de OGM, em g/kg.}$$

De notar que, nos casos em que tenha sido observada uma extractabilidade do DNA diferente nos materiais de base, GM e não-GM, utilizados para produzir os MRC, terá de se aplicar um factor de correcção. As informações relativas à extractabilidade do DNA constam do relatório de certificação. Utilizando o método CTAB, verificou-se que a relação entre as extractabilidades do DNA do pó GM e do pó não-GM foi de $0,7 \pm 0,3$. Por conseguinte, o verdadeiro teor de OGM da amostra em causa está sobrestimado em termos de número de cópias e deve ser corrigido:

$$3,3 * f = 3,3 * 0,7 = 2,3 \quad \text{em que } f = \text{factor de correcção relacionado com a diferente extractabilidade do DNA do pó GM e do pó não-GM utilizados como MRC.}$$

Os efeitos da endorreduplicação e do processo de obtenção do milho heterozigótico contendo o evento devem ser considerados na incerteza dos resultados obtidos. A incerteza tem que cobrir um intervalo de 33 % (66 % menos 33 %) e o valor medido poderá variar em 16,5 %. Para estimar o rácio do número de cópias, tem de se quantificar o DNA extraído da amostra de milho em análise e de se estimar o seu número de genomas. Para tal, divide-se a concentração do DNA pela massa de genoma do milho. Logo, a incerteza associada a quantificação do DNA e a incerteza associada a estimativa da dimensão do genoma devem ser tomadas em consideração no cálculo da incerteza. De acordo com a literatura, a dimensão de genoma do milho pode variar até 36 % [2]. Durante a validação interna, a reprodutibilidade do método de quantificação foi de 22 %. Assim, a incerteza expandida combinada dos resultados expressos em rácio de número de cópias (U_{cc}) pode ser calculada do seguinte modo:

$$U_{cc} = k \sqrt{u_m^2 + u_{gs}^2 + u_{Dq}^2 + u_e^2}$$

$$U_{cc} = 2 \sqrt{15^2 + \left(\frac{18}{\sqrt{3}}\right)^2 + 22^2 + \left(\frac{16,5}{\sqrt{3}}\right)^2} \% = 60 \%$$

em que k = factor de cobertura,
 u_m = contribuição para a incerteza relacionada com o método de quantificação do número de cópias,
 u_{gs} = contribuição para a incerteza relacionada com a estimativa da dimensão do genoma,
 u_{Dq} = contribuição para a incerteza relacionada com a quantificação do DNA,
 u_e = contribuição para a incerteza relacionada com a obtenção e a endorreduplicação.

Expressando o resultado em número de cópias, a amostra de milho contém $2,3 \pm 1,4$ sequências transgénicas do evento 1507 por 100 sequência endógena. Comparado com o resultado expresso em fracção de massa do evento 1507, 65 ± 20 g/kg, verifica-se que a incerteza expandida relativa aumentou de 30% para 60 %.

[1] IUPAC Technical Report (2002): Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis.
 [2] Poggio et al., Annals of Botany 85 (1998), 107-115.