

RENATA TROTTA BARROSO FERREIRA

**DETERMINAÇÃO DE SOJA ROUNDUP READY®
EM ALIMENTOS**

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2006

DETERMINAÇÃO DE SOJA ROUNDUP READY® EM ALIMENTOS

RENATA TROTTA BARROSO FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Vigilância Sanitária, como requisito para obtenção do
título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Dra. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro

2006

DETERMINAÇÃO DE SOJA ROUNDUP READY® EM ALIMENTOS

Renata Trotta Barroso Ferreira

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

_____ (UFSC)

Prof. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

_____ (CTAA/EMBRAPA)

Prof. Dra. Edna Maria Morais Oliveira

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Victor Augustus Marin

Orientador: _____

Prof. Dra. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro

2006

FERREIRA, Renata Trotta Barroso

Determinação de soja Roundup Ready® em alimentos./ Renata Trotta Barroso
Ferreira. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006.

xii, 86 p.; fig., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária / INCQS, 2006. Orientadora: Paola Cardarelli Leite.

1. soja RR 2. Alimentos transgênicos 3. Real Time-PCR

I. Título

A Deus, por intermédio de Jesus Cristo.

Por que Dele por Ele e para Ele, são todas as coisas, Glória, pois, a Ele eternamente. Amém!
(Rm 11:36)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo seu infinito amor e bênçãos concedidas;

Aos meus queridos pais, pelo apoio e carinho que sempre tiveram comigo;

Aos meus dois grandes amores, Cláudio pelo amor, paciência e incentivo e Matheus que é o meu presente maior;

Aos meus irmãos, Robson e Rosane, pela amizade apoio e carinho.

À minha sogra Ilza, pela ajuda ao cuidar do Matheus

À amiga Paola Cardarelli, pela orientação, estímulo, paciência e dedicação que sempre demonstrou por mim;

Às amigas do Setor de Biologia Molecular, Érica, Patrícia, Regina e Suely, pela amizade e incentivo.

À Carla Rosas, pela amizade e oportunidade de ingressar na FIOCRUZ;

Aos colegas do departamento de microbiologia, em especial, Carla, Carlos, Valéria, Ludimila, Ana Paula, Marília, Nilson e Alessandra.

Ao diretor, Dr^o André Gemal e Marise Sacramento de Magalhães, pela permissão e oportunidade de ingressar no curso de pós-graduação;

Ao Instituto Nacional de Controle de Controle de Qualidade, na pessoa do sr. Dr. André Gemal;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O Brasil regulamentou recentemente o plantio e a comercialização de soja geneticamente modificada bem como estabeleceu o limite de 1% para a informação no rótulo de produtos alimentícios que contenham ou sejam constituídos por OGM. Com a liberação do plantio da soja GM, o controle da qualidade de alimentos tornou-se ponto essencial para a manutenção do Princípio da Precaução através da verificação do cumprimento da legislação de rotulagem, atuando no rastreamento e no controle pós-comercialização.

Este trabalho teve como objetivo detectar, identificar e quantificar a soja geneticamente modificada presente em alimentos obtidos por vários tipos de processamento.

A extração de DNA foi efetuada utilizando-se brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e amplificabilidade de DNA de soja foi avaliada através da detecção do gene para lectina *le1*. A detecção presuntiva de OGM foi realizada através da detecção do gene promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e do gene terminador *nos* de *Agrobacterium tumefaciens*, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A detecção específica do gene da construção da soja Roundup Ready[®] (CP4 EPSPS) foi realizada pela técnica de *Nested*-PCR. A quantificação dos teores de OGM foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (princípio TaqMan[®]).

Entre 2001 e 2005 foram analisadas 170 amostras: soja em grão (29), bebidas e pós para bebidas (34), ração (6), proteína, farinha e fibra de soja (7), sopas desidratadas (17), sopas em lata (2), produtos cárneos (16), carne vegetal (5), massas (5), biscoitos, batata frita e snack (8), pós para preparo de alimentos (11), mistura de cereais (5), soja frita (9), farinha de trigo (16), perfazendo um total de 75 marcas comercializadas no Brasil. Dentre as 161 amostras que apresentaram DNA amplificável e resultados positivos nos testes presuntivos, em 64 amostras soja em grão (7), bebidas e pós para bebidas (15), ração (3), proteína, farinha e fibra de soja (5), sopas desidratadas (6), produtos cárneos (6), carne vegetal (1), massas (1), pós para preparo de alimentos (9), farinha de trigo (11), ficou demonstrado a presença do gene CP4 EPSPS por *Nested* PCR.

Os resultados de quantificação demonstraram teores de OGM acima de 1% em 01 amostra de soja em grão, 02 de bebidas e pós para bebidas, 03 de sopas desidratadas, 08 de pós para preparo de alimentos, 01 de ração para gatos e 12 de farinhas de trigo, no total de 27 amostras analisadas.

Esses resultados mostram que está sendo utilizada soja geneticamente modificada na formulação de vários tipos de produtos alimentícios. Esforços serão necessários no sentido da implantação de testes quantitativos para a verificação da adequação dos rótulos à legislação brasileira.

ABSTRACT

Brazil regulated recently the plantation and the commercialization of genetically modified soy as well as established the limit of 1% for the information in the label of food products that contain or are constituted by GMO. With the release of the plantation of GM soy, the control of the quality of foods is an essential point for the maintenance of the Principle of Precaution through the verification of the fulfillment of the labeling legislation, acting in the tracking and in the post commercialization surveillance system.

This work had as objective to detect, to identify and to quantify the presence of genetically modified soy in processed foods.

The extraction was effected using cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) and its amplifiability was evaluated through the detection of the gene for lectin *le1*. The presumptive detection of GMO was carried through the detection of the promoter gene 35S of cauliflower mosaic virus (CaMV) and the terminator gene of *Agrobacterium tumefaciens*, utilizing the technique of the Polymerase Chain Reaction (PCR). The specific detection of the gene of the construction of Roundup Ready soy (CP4 EPSPS) was performed with the technique of Nested-PCR. The quantification of GMO was carried through by the technique of the Real Time PCR (TaqMan principle).

From 2001 to 2005, 170 samples were analyzed: soy in grains (29), drinks and powder for drinks (34), feed (6), protein, flour and fiber of soy (7), dehydrated soups (17), canned soups (2), meat products (16), vegetal meat (5), pasta (5), biscuits, potato fries and snacks (8), powder for food preparation (11), mixture of cereals (5), soy fries (9), wheat flour (16), in a total of 75 marks commercialized in Brazil. Amongst the 161 samples that had presented amplified DNA and positive results in the presumptive tests, in 64 samples: soy in grains (7), drinks and powder for drinks (15), ration (3), protein, flour and fiber of soy (5), dehydrated soups (6), meat products (6), vegetal meat (1), pasta (1), powder for food preparation (9), wheat flour (11), were demonstrated the presence of the gene of the CP4 EPSPS protein.

The results demonstrated levels of GMO above 1% in one sample of soy in grain, 2 of drinks and powder for drinks, 3 of dehydrated soups, 8 of powder for food preparation, 01 of cats feed and 12 of wheat flour.

These results show that it is being used genetically modified soy in the formulation of several kinds of food products. Necessary efforts in the direction of the implantation of quantitative tests for the verification of the adequacy of labels to the Brazilian legislation are needed.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitro

bp – pares de base

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

CNBS – Conselho Nacional de Biossegurança

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DNA – ácido desoxirribonucleico

IDEC – Instituto de Defesa do Consumidor

M – concentração molar

mA – mili ampère

MgCl_2 – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

NaCl – Cloreto de sódio

OGM – Organismos Geneticamente Modificados

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PNB – Política Nacional de Biossegurança

RR – Roundup Ready

TBE – Tris ácido bórico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de utilização dos principais produtos da soja	9
Figura 2 - Diagrama dos subprodutos da soja	10
Figura 4: Representação linear e circular do vetor de clonagem utilizado para transformação	22
Figura 5: Símbolo que deverá conter no rótulo de alimentos que contenham OGM em sua composição.	32
Figura 6: Procedimento Operacional para a Detecção, identificação e quantificação de OGM para cumprimento da Legislação Brasileira	36
Figura 7: Representação esquemática da amplificação de DNA pela PCR.	37
Figura 8: Representação das etapas da reação da Real Time-PCR, sistema <i>Taqman</i> ®	41
Figura 9: Gráfico de amplificação do Real Time PCR com as fases da reação destacadas.....	42
Figura 10: Curva Padrão para determinação do conteúdo de soja RR.	43
Figura 11: Representação gráfica das regiões de amplificação.....	52
Figura 12: Equipamento “Sequence Detection System ABI-Prism 7500” da Applied Biosystems.....	55
Figura 13: Representação gráfica dos resultados obtidos nas análises.....	58
Figura 14: Gel de agarose mostrando fragmentos de amplificação de lectina de 118bp utilizando iniciadores GMO3/GMO4	59
Figura 15: Géis de agarose apresentando diferentes fragmentos de amplificação de acordo com os iniciadores utilizados na DETECÇÃO.....	60
Figura 16: Gel de agarose apresentando fragmentos de amplificação de 169 bp pela <i>nested</i> PCR.....	61
Figura 17: Representação gráfica dos resultados obtidos nas análises por categoria de alimento.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da soja em grão e componentes (base seca) ..	7
Tabela 2: - Propriedades funcionais dos produtos protéicos de soja usados como ingrediente de alimentos	14
Tabela 3: Classificação dos vegetais geneticamente modificados e suas características.....	21
Tabela 4: Exemplo de planilha obtida durante a determinação do conteúdo de soja RR	56
Tabela 5: Resultado de amplificação, detecção, identificação e quantificação das amostras analisadas	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Histórico da soja	4
1.2. A soja na alimentação	5
1.2.1. Características físicas, composição química e valor nutricional da soja	6
1.2.2. Obtenção e uso dos principais produtos de soja	7
1.3. O que são e como são produzidos os organismos geneticamente modificados (OGM)	15
1.4. Alimentos geneticamente modificados	19
1.5. Soja Round Up Ready (RRS)	20
1.6. Herbicida Glifosato	23
1.7. Modelo Regulatório Brasileiro	26
1.8. Aspectos gerais sobre a metodologia de análise de OGM	34
1.9. Aspectos sobre extração de DNA	38
1.10. Aspectos sobre Quantificação de OGM por PCR em Tempo Real	40
2 OBJETIVOS.....	45
3 METODOLOGIA.....	47
3.1. Amostras	47
3.2. Preparo de amostra	47
3.3. Extração de DNA	48
3.4. Detecção de DNA	49
3.5. Detecção de OGM pela PCR	50
3.6. Identificação de soja tolerante ao herbicida glifosato pelo método da PCR <i>nested</i>	51
3.7. Condições da PCR	52
3.8. Eletroforese em gel de agarose	53
3.9. Critérios de aceitação na interpretação de resultados	53
3.10. Quantificação de OGM por PCR em Tempo Real	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5 . CONCLUSÃO.....	73
6 -REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A soja é uma planta de grande importância econômica, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial: entre 2000 e 2001 produziu em torno de 36 milhões de toneladas de soja e exportou cerca de 13 milhões de toneladas (SOUZA, 2002).

As plantas Geneticamente Modificadas (GM) já fazem parte do nosso dia a dia e estão sendo comercializadas ou em fase de teste no mundo inteiro. Novos eventos de transformação estão ocorrendo em diversos laboratórios do mundo e os alimentos contendo organismos geneticamente modificados já ocupam prateleiras em muitos supermercados.

Entre 1996 e 2005, a área total cultivada com lavouras GM cresceu mais de 47 vezes, passando de 1,7 milhão de hectares em 1996 para 90 milhões de hectares em 2005, com crescente participação dos países em desenvolvimento (JAMES, 2005).

Em 2005, a área global estimada de cultivo de plantas geneticamente modificadas autorizadas foi de 90 milhões de hectares compreendendo o plantio em 21 países sendo os maiores produtores, em ordem decrescente os Estados Unidos da América (soja, milho, algodão e canola), Argentina (soja, milho, algodão), Canadá (canola, milho e soja), Brasil (soja), China (algodão), Paraguai (soja), Índia (algodão), África do Sul (milho, soja e algodão), Uruguai (soja e milho), Austrália (algodão), Espanha (milho), Filipinas (milho) e México (algodão e soja). Além dessas culturas, variedades geneticamente modificadas de mamão, batata, arroz, cana de açúcar, tomate e abóbora já foram autorizadas para plantio e consumo em alguns países (JAMES, 2005).

Desde 11 de setembro de 2003 quando o Protocolo de Cartagena entrou em vigor regulamentando internacionalmente a restrição da livre comercialização de OGM, a rotulagem dos alimentos e ingredientes derivados destes é obrigatória quando as percentagens excederem ao estabelecido por lei. Na União Europeia o

limite para não rotular um produto como geneticamente modificado é de 0,9% de OGM (CE, 2003), na Suíça 0,1% e na Rússia e Japão 5%. Nos EUA, embora a recente legislação não exija rotulagem, o governo recomenda fazê-la voluntariamente, exigindo apenas que as empresas produtoras de alimentos contendo OGM notifiquem ao FDA pelo menos 120 dias antes do novo produto ser comercializado (TOZZINI, 2004)

O Brasil regulamentou o plantio e a comercialização da soja geneticamente modificada, estabeleceu o limite de 1% para a informação no rótulo de produtos alimentícios que contenham ou sejam constituídos por OGM (Decreto nº 4680, de 24 de abril de 2003) e criou o símbolo que deve constar na embalagem de produtos que encontram-se nesta situação (Portaria nº 2658, de 22 de dezembro de 2003). Houve, portanto, uma nova situação para o Brasil e a conseqüente necessidade da existência de laboratórios oficiais para verificação da conformidade dos dizeres da rotulagem (BRASIL, 2003 a; BRASIL, 2003 d)

A adequação dos produtos à legislação brasileira sobre os limites de OGM para rotulagem é baseada na sua detecção, identificação e quantificação.

Análises em vários produtos processados comercializados no Brasil, realizadas em laboratórios no exterior por solicitação do Instituto de Defesa do Consumidor (IDEC), demonstraram a presença de OGM de milho ou soja em diversos alimentos como fórmulas infantis à base de leite de soja, batatas fritas, salsichas, sopas em pacote e em latas, macarrão instantâneo, suplemento alimentar dietético, biscoitos, salgadinhos de milho e fórmulas não lácteas com proteínas de soja, entre outros. O surgimento desses alimentos trouxe inúmeros questionamentos por parte dos consumidores.

O INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde) atua como laboratório de referência nacional para o controle da qualidade de produtos e serviços vinculados à Vigilância Sanitária, desempenhando importante papel na proteção da população contra as situações de risco e os fatores nocivos associados à produção e à comercialização de alimentos, medicamentos, cosméticos, saneantes, produtos biológicos, sangue e seus derivados, e outros de uso corrente. Portanto, deve estar preparado também para as análises de detecção e quantificação de OGM em alimentos, como melhor maneira de apoiar a legislação em vigor e contribuir nas ações de proteção à saúde e ao direito à informação do

consumidor, assegurando um valioso respaldo técnico aos órgãos do governo e à sociedade.

A rotulagem de alimentos é o principal meio de comunicação entre o produtor e o consumidor e é importante ferramenta de orientação de forma que o consumidor tenha seus direitos assegurados e os anseios respeitados (MARINS, 2004).

1.1. Histórico da soja

A soja (*Glicine Max* (L.) Merrill) é uma planta originária da China, inicialmente rasteira e cultivada nas margens de rios, domesticada e introduzida provavelmente no período entre 1500 e 1027 AC, sendo hoje a mais importante oleaginosa cultivada no mundo (HOOGERHEIDE, 2005).

Sua chegada no Ocidente ocorreu no fim do século XV e início do século XVI, com a chegada dos navios europeus à Ásia. Mesmo assim, permaneceu como curiosidade botânica durante os quatro séculos que se seguiram (SCHUSTER, 2005).

Nos Estados Unidos, a primeira menção sobre soja data de 1804. A partir de 1880 adquiriu importância nos Estados Unidos como planta forrageira. Em 1920 a área destinada à produção de grãos era de 76 mil ha, e a destinada à produção de forragem, pastagem e silagem chegava a 300 mil ha. O aumento da área destinada à produção de grãos deveu-se a sua alta capacidade de rendimento e à facilidade de colheita mecânica. Além disso, a política governamental de restrição à produção de milho e algodão, a partir de 1934, foi um grande incentivo para a expansão da produção de soja nos Estados Unidos (SCHUSTER, 2005).

A soja foi introduzida no Brasil em 1882 por Gustavo Dutra na Imperial Escola Agrícola da Bahia, atual Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, trazendo cultivares provenientes dos Estados Unidos (HOOGERHEIDE, 2005). Em 1891, no Instituto Agrônomo de Campinas-SP, foram realizados testes semelhantes com cultivares oriundos também dos Estados Unidos, avaliando sua adaptação às condições brasileiras, com estudos voltados para uso como forrageira (HOOGERHEIDE, 2005).

No Rio Grande do Sul a soja é cultivada desde 1935, concentrada inicialmente na região das missões e depois evoluindo para a região do planalto médio, substituindo a criação de gado e entrando na rotação com trigo. A soja era cultivada pelos colonos nas entrelinhas do milho e o grão utilizado como fonte protéica para suínos (MYASAKA, 1986).

Inicialmente, a soja produzida no Brasil era utilizada para alimentação de suínos, como fonte de proteína para complementar a dieta a base de milho, abóbora e mandioca. Foi também bastante utilizada como adubação verde. Em 1958, foi instalada a primeira indústria de soja no Rio Grande do Sul, mas o grande impulso da cultura ocorreu nos anos 60. Na década de 50 foi dado grande incentivo, por parte do governo federal ao cultivo do trigo. A soja entrou como a cultura ideal para fazer a rotação com o trigo, devido à sua facilidade de cultivo e colheita, utilizando basicamente os mesmos equipamentos destinados ao trigo. Com isso, a produção brasileira que era de 0,5% da produção mundial em 1954, passou a 16% em 1976 (SCHUSTER,2005).

No Rio Grande do Sul, a soja expandiu-se para o restante do país, inicialmente para Santa Catarina, depois para o Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Centro-Oeste. Atualmente a soja é cultivada em praticamente todo o território nacional, sendo o principal produto agrícola do país (SCHUSTER,2005).

1.2. A soja na alimentação

O expressivo crescimento da produção de soja no Brasil desencadeou mudanças na história do país. A soja apoiou ou foi a grande responsável pela aceleração da mecanização das lavouras brasileiras; pela modernização do sistema de transportes; pela expansão da fronteira agrícola; pela profissionalização e incremento do comércio internacional; pela modificação e enriquecimento da dieta alimentar dos brasileiros. A divulgação na mídia dos benefícios da soja à saúde está ocasionando mudanças no conceito dos consumidores em relação ao grão (EMBRAPA, 2003).

Esta leguminosa vem ganhando destaque, pois alguns estudos apontam uma série de benefícios para a saúde, que podem estar relacionados aos componentes

da soja. Entre eles, destacam-se o efeito preventivo em doenças cardiovasculares, osteoporose e câncer, além de alívio dos sintomas da menopausa (HASLER, 1998).

Estudos sobre as características nutricionais e nutracêuticas da soja têm promovido o seu consumo via incorporação da soja na dieta alimentar da população brasileira (ANDERSON et al, 1985). A tendência brasileira com relação à substituição de gorduras animais por gorduras vegetais, diminuiu o consumo de banha e toucinho, e aumentou o consumo de óleos vegetais, principalmente o óleo de soja (MONDINI, 1994).

A demanda mundial por soja está em franco crescimento. Entre os fatores estão, não somente o aumento do consumo na alimentação humana, mas também o aumento da produção animal no mundo, principalmente de ciclo curto como suínos e aves, em virtude do banimento, na Europa, das farinhas de origem animal. Ainda neste segmento, acredita-se na ampliação do uso de subprodutos de soja na piscicultura e na produção de camarões (CHIARELLO, 2002).

Mas, apesar da soja oferecer os referidos benefícios à saúde e possuir um bom valor nutritivo, seus produtos ainda sofrem restrições por parte dos consumidores ocidentais, devido ao sabor característicos denominado beany flavor (RACKIS et al., 1979), originário da associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração protéica (AXELROD et al., 1981).

1.2.1. Características físicas, composição química e valor nutricional da soja

Os grãos de cultivares comuns de soja variam da forma quase esférica a alongada ou achatada. A semente contém aproximadamente 8% de casca, 90% de cotilédone e 2% de hipocótilo (CABRAL e MODESTA, 1981). A composição química aproximada do grão e de seus componentes encontra-se na **Tabela 1**.

Tabela 1: Composição química da soja em grão e componentes (base seca)

Componente	Proteína	Lipídios	Cinza	Carboidratos*
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Soja integral	40,2	21,0	4,9	33,9
Cotilédone	42,8	22,8	5,0	29,4
Casca	8,8	1,0	4,3	85,9
Hipocótilo	40,8	11,4	4,4	43,4

* calculados por diferença $\{ 100 - (\text{proteína} + \text{óleo} + \text{cinza}) \}$

Fonte: CABRAL e MODESTA, 1981

O seu principal valor nutricional é devido ao seu alto teor de proteína. Os grãos de soja se caracterizam por conter muito pouco ou nenhum amido, cerca de 20% de óleo e 40% de proteína, que são de elevado valor nutritivo (SANTÁNA et al., 2000).

A soja também é fonte de minerais e algumas vitaminas do complexo B, E e K. O óleo de soja contém cerca de 15% de ácidos graxos saturados e em torno de 85% de ácidos graxos insaturados. Na soja crua, assim como na maioria das leguminosas existem alguns fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, hemaglutininas, saponinas, glicosídeos, isoflavonas e fatores antivitaminicos, porém podem ser destruídos ou inativados por tratamento térmico (CABRAL e MODESTA, 1981).

1.2.2. Obtenção e uso dos principais produtos de soja

A soja é, até hoje, muito utilizada pelos povos da Ásia oriental. Dentre os alimentos mais populares de tradição oriental, estão incluídos os fermentados como shoyu, misso, natto, tempeh e sufu e os não fermentados como leite de soja, tofu, kori-tofu, yuba e kinako (MORAIS e SILVA, 1997; CABRAL e MODESTA, 1981).

Em países ocidentais como Estados Unidos e Brasil, por exemplo, a utilização da soja como alimento humano tem seguido caminhos diferentes; com exceção do “shoyu” (molho de soja) nenhum dos outros alimentos orientais é consumido em quantidades significantes. Nesses países os produtos mais importantes são aqueles

derivados do farelo desengordurado cru, tais como: farinha, PVT (Proteína Vegetal Texturizada), concentrado protéico, isolado protéico etc, e os derivados do óleo bruto, tais como, óleo de cozinha, margarina, maionese etc (CABRAL e MODESTA, 1981).

Os subprodutos da soja são utilizados pela indústria de alimentos na fabricação de produtos de padaria, substitutos do leite, embutidos, ração animal, etc.(**Figura 1**). A partir da soja pode-se obter quatro grupos distintos de produtos: produtos não-desengordurados, produtos do óleo bruto, produtos do farelo desengordurado cru e produtos de tradição oriental (CABRAL e MODESTA, 1981) (**Figura 2**).

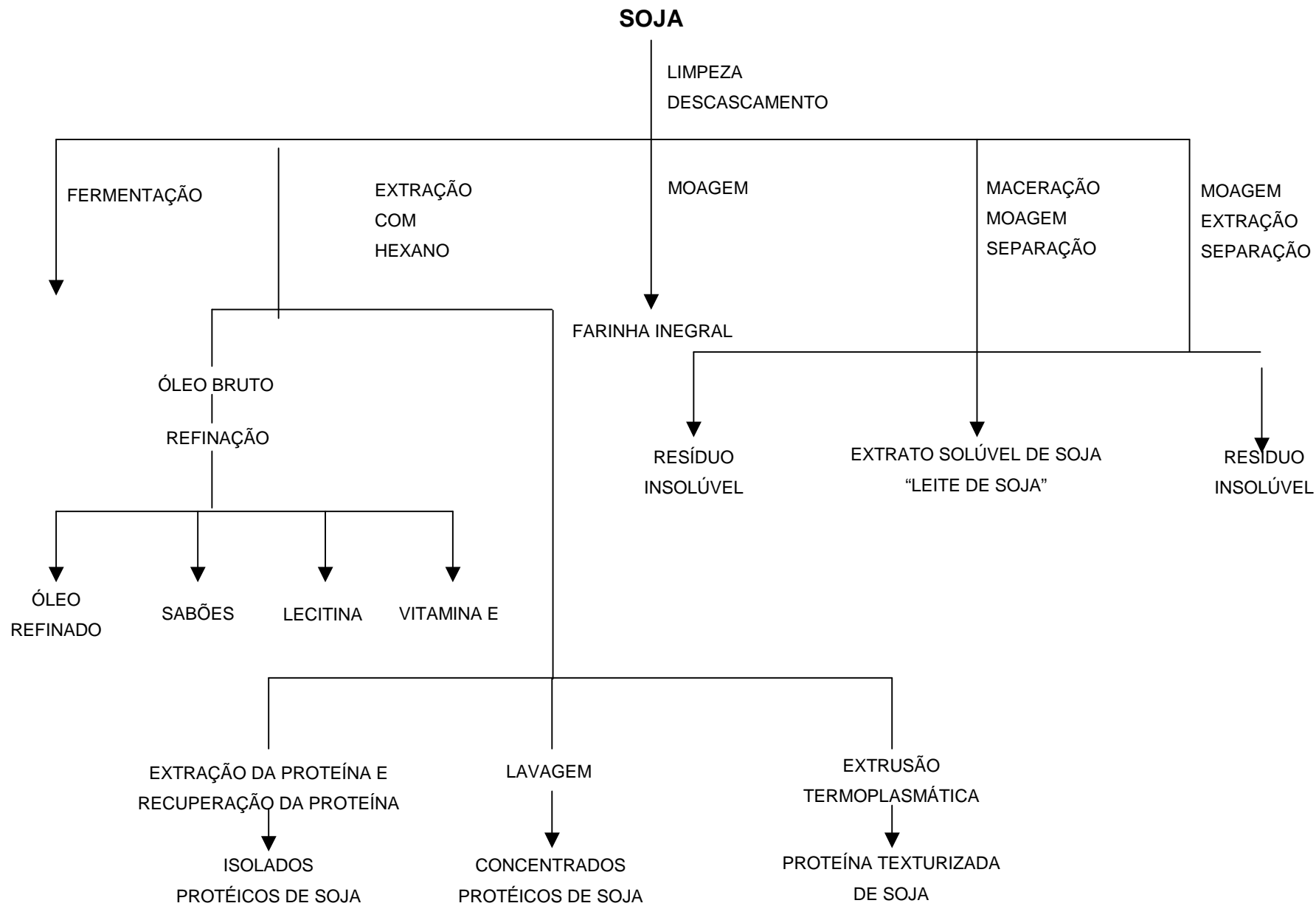


Figura 1: Diagrama de utilização dos principais produtos da soja (MORAIS E SILVA, 1996)

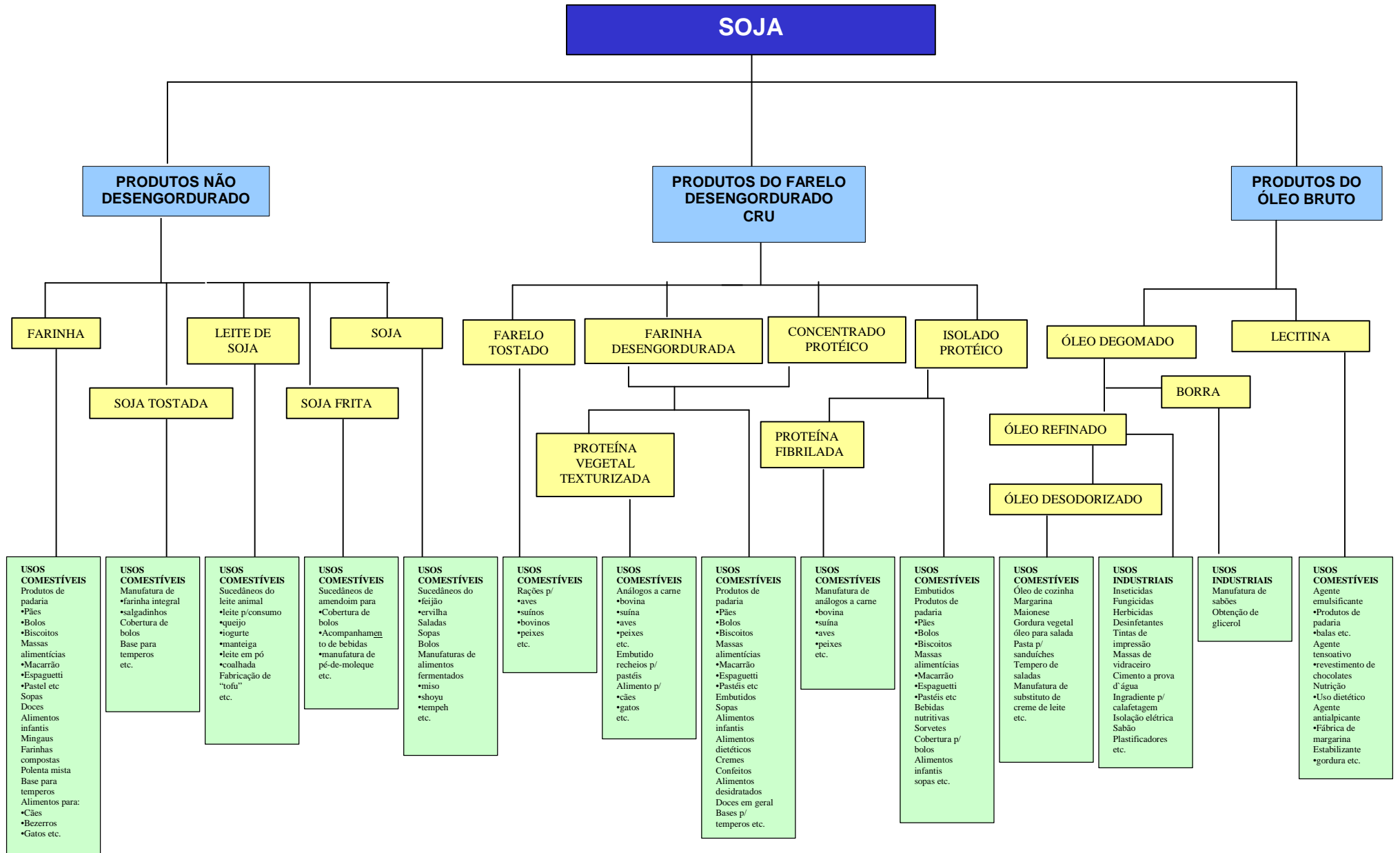


Figura 2 - Diagrama dos subprodutos da soja (CABRAL E MODESTA, 1981)

Os principais produtos não desengordurados obtidos da soja são: farinha integral, bebida de soja (“leite” de soja), soja tostada, soja frita e soja cozida (CABRAL e MODESTA, 1981).

A farinha integral de soja é um produto obtido diretamente dos grãos de soja e passa por uma peneira de 100 “mesh”. O tratamento térmico é uma etapa do seu processamento, mas quando a farinha de soja for utilizada para branqueamento de farinha de trigo destinada à fabricação de pães, não deve ocorrer o tratamento térmico, já que as enzimas presentes na soja devem permanecer ativas até o final do tratamento da farinha de trigo. A composição química da farinha integral de soja é muito variável, dependendo da variedade, condições de cultura, armazenamento, processamento etc. A farinha integral pode também ser classificada como flocos de soja e farinha de soja micropulverizada (MORAIS e SILVA, 1997).

O extrato solúvel de soja (leite de soja) é o produto obtido por extração aquosa dos grãos de soja. A fase aquosa consiste numa suspensão – emulsão – solução. Em suspensão encontram-se proteínas, carboidratos e algum material em pequenas partículas; em emulsão encontram-se os lipídios e, formando uma solução, alguns minerais e açúcares. Os procedimentos básicos para obtenção do extrato solúvel são: trituração dos grãos seguido de tratamento térmico, e depois, filtração para remoção dos sedimentos (MORAIS e SILVA, 1997).

A soja tostada é um produto usado por donas de casa que têm o hábito de consumir soja, pela simplicidade da sua obtenção, através da simples secagem dos grãos até conseguir uma cor marrom e aroma desejado. A soja frita é um produto que apresenta um sabor semelhante ao do amendoim e pode ser encontrada nas prateleiras de supermercados com diversos sabores. A soja cozida é um produto de obtenção e uso quase que exclusivamente caseiro. O uso da soja como feijão ainda é o mais utilizado, porém apresenta alguns inconvenientes, sendo o principal deles a ausência de amido, que impede a formação de caldo espesso durante o cozimento, prejudicando também a textura (CABRAL e MODESTA, 1981).

Os principais produtos do óleo bruto são lecitina, muito utilizada na indústria de alimentos na fabricação de chocolate, leite em pó, biscoito, margarina, sorvete, massas alimentícias e produtos de panificação; óleo degomado, óleo refinado e

desodorizado, além de uma borra usada para fabricação de sabões e glicerina (CABRAL e MODESTA, 1981).

O óleo bruto de soja é obtido por extração do grão com solvente ou prensagem. O óleo cru apresenta uma série de impurezas solúveis em gordura, cuja remoção é indispensável para proporcionar adequado sabor, odor, aparência e estabilidade. Estão presentes no óleo cru, como impurezas: fosfolipídios, lecitina, metais (ferro, cobre, magnésio), ácidos graxos livres, peróxidos e seus derivados e pigmentos. Por processos de refinação, a partir do óleo bruto obtém-se o óleo refinado de soja. A degomação consiste em adicionar água no óleo quente, a seguir, remover a goma (fosfatídeos hidratados) por centrifugação. Os fosfatídeos prejudicam a hidrogenação e transferem íons que diminuem a estabilidade, por serem pró-oxidantes, como o ferro e o cobre. No refinamento, adiciona-se hidróxido de sódio e, a seguir, centrifuga-se para remover os sabões formados. A remoção dos odores ocorre em várias etapas, quando os gases voláteis são retirados, à vácuo, após aquecimento. O resfriamento é usado para alguns óleos (salada), pois melhora sua qualidade. Com ele, removem-se por filtração, resinas, ceras, triglicerídeos com alto ponto de fusão e triglicerídeos di e trisaturados, capazes de precipitar se refrigerados (MORAIS e SILVA, 1997).

A lecitina é obtida através da hidratação e separação a partir do óleo cru. A lecitina natural apresenta cor castanha com diferentes tonalidades que dependem da qualidade do óleo bruto e da variedade da semente utilizada. Muitas vezes a cor pode impedir o seu emprego em alimentos, por isso faz-se o branqueamento da lecitina com peróxido de hidrogênio. Os principais produtos do farelo desengordurado cru são farinha de soja desengordurada considerada como o mais importante produto industrializado da soja; concentrado protéico e isolado protéico (CABRAL e MODESTA, 1981).

A farinha e o farelo são os produtos menos refinados das proteínas de soja. Têm a mesma composição, variando apenas o tamanho da partícula (farelo grosso, farelo médio, farelo fino e farinha) (MORAIS e SILVA, 1997).

Os concentrados protéicos de soja são obtidos a partir da farinha desengordurada por lavagem com álcool etílico, água fervente ou água ligeiramente acidificada a pH 4,5. Nesse processo de lavagem, componentes como açúcares, alguns minerais e ácido fítico são arrastados, deixando as proteínas e os

carboidratos. São utilizados na indústria de alimentos, na composição de produtos cárneos, sopas e farinhas especiais. Os isolados protéicos de soja também são produtos provenientes, da farinha desengordurada de soja. São obtidos pela extração aquosa das proteínas e recuperação delas por precipitação, seguida de secagem. O isolado, antes de seu uso, pode ser tratado química, enzimática ou termicamente para proporcionar funções específicas, tais como gelatinização, solubilidade, emulsificação e absorção de água (MORAIS e SILVA, 1997).

As proteínas texturizadas são obtidas a partir da farinha, do concentrado ou do isolado e através de processos especiais conseguem-se produtos finais com pouco sabor e grande amplitude de propriedades funcionais. Existem dois procedimentos básicos:

Texturização por fiação – a proteína de um isolado é solubilizada em meio alcalino e passada através de uma chapa com pequenos orifícios. Por eles saem fibra que serão coaguladas em banho ácido e estiradas por meio de rolos, girando em velocidade crescente. Este processo é utilizado, mais freqüentemente, para produzir os chamados análogos da carne. Os produtos finais são vendidos congelados.

Texturização por extrusão – a proteína texturizada de soja é proveniente da extrusão termoplástica da farinha desengordurada, proveniente da extração de óleo. Na extrusão, esta farinha é submetida a condições de temperatura, pressão e atritos elevados, produzindo um material texturizado, com camadas superpostas e aparência semelhante a um tecido muscular. É muito utilizada na indústria de carnes, principalmente em salsichas e hambúrgueres.

As propriedades funcionais dos produtos como farinhas, concentrados e isolados de soja usados como ingrediente de alimentos estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: - Propriedades funcionais dos produtos protéicos de soja usados como ingrediente de alimentos

Propriedades funcionais	Forma usada de proteína	Tipos de alimentos
<p>Emulsificação:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Formação ▪ Estabilização 	<p>F,C,I</p> <p>F,C,I</p>	<p>Salsichas, mortadela, lingüiça. Pães, bolo, sopas.</p> <p>“Chantilly” simulado, sobremesas congeladas. Salsichas, mortadela, lingüiça. Sopas.</p>
<p>Absorção de gordura:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Promoção ▪ Prevenção 	<p>F,C,I</p> <p>F, I</p>	<p>Salsichas, mortadela, lingüiça, patês de carne.</p> <p>Rosquinhas fritas, panquecas.</p>
<p>Absorção de água:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Absorção ▪ Retenção 	<p>F,C</p> <p>F,C</p>	<p>Pães, bolo</p> <p>Macarrão, balas, confeitos, etc. Pães, bolo</p>
<p>Textura:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Viscosidade ▪ Formação de gel ▪ Formação de tiras ▪ Formação de fibras 	<p>F,C,I</p> <p>I</p> <p>F,I</p> <p>I</p>	<p>Sopas, molhos, “chilli”</p> <p>Carne moída simulada</p> <p>Carne simulada</p> <p>Carne simulada</p>
<p>Formação de massa de pão</p> <p>Formação de filmes</p> <p>Adesão</p>	<p>F,C</p> <p>I</p> <p>C,I</p>	<p>Produtos de padaria</p> <p>Salsichas, mortadela</p> <p>Lingüiças, carnes de lanche, patês de carne, pão de carne e pãezinhos, presunto sem osso. Carnes desidratadas</p>
<p>Coesão</p> <p>Elasticidade</p>	<p>F,I</p> <p>I</p>	<p>Produtos de padaria, macarrão e carnes simuladas</p> <p>Produtos de padaria e carnes simuladas</p>
<p>Controle de cor</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Branqueamento ▪ Escurecimento 	<p>F</p> <p>F</p>	<p>Pães</p> <p>Pães, panquecas e “waffles”</p>
<p>Aeração</p>	<p>I</p>	<p>“Chantilly” simulado, sobremesas, balas, etc.</p>

F,C,I representam farinhas, concentrados e isolados de soja, respectivamente

Fonte: CABRAL e MODESTA, 1981.

Os alimentos naturais podem ser definidos resumidamente:

Shoyu: molho resultante da fermentação de soja e trigo pelo *Aspergillus oryzae*;
Misso: produto pastoso, obtido pela fermentação de soja e cereais pelo *Aspergillus oryzae*. Utilizado em sopas e como tempero;

Natto: obtido pela fermentação da soja cozida, pelo *Bacillus subtilis* ou *Bacillus natto*;

Tempeh: resulta da fermentação da soja descascada e cozida por diversas linhagens de *Rhizopus*. É empregado frito, em óleo vegetal ou em sopas;

Sufu: também denominado queijo chinês, é produzido pela ação do fungo *Actinomucor elegans* sobre cubos de leite de soja.

Tofu: alimento não fermentado, cujas proteínas são coaguladas e precipitadas por adição de sais de cálcio e magnésio, geralmente o sulfato de cálcio. É usado em sopas ou frito em óleo.

Kori-tofu: é um produto desidratado obtido a partir da coagulação de proteínas do leite de soja com cloreto de cálcio.

Yuba: obtido de uma película que se forma na superfície do leite de soja, quando aquecido à temperatura próxima da ebulição.

Kinako: farinha finíssima obtida da moagem da soja torrada.

Em setembro de 2005, a ANVISA elaborou um Regulamento Técnico para produtos protéicos de origem vegetal, que fixa a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer tais produtos. Os produtos devem ser designados de “proteína” ou “extrato” ou “farinha”, conforme o teor protéico mínimo, seguido do(s) nome(s) da(s) espécie(s) vegetal(is) (RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005).

1.3. O que são e como são produzidos os organismos geneticamente modificados (OGM)

Os Organismos Geneticamente Modificados (OGM) são organismos vivos, sejam eles plantas, animais ou microrganismos, cujo material genético foi alterado

por meio da 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).

O termo transgênico também é bastante utilizado, porém a distinção entre os termos “geneticamente modificado” e “transgênico” não é unânime. Muito ainda se discute em relação à definição de ambos. No entanto, neste trabalho consideraremos como sinônimos.

Um típico inserto de um OGM é composto por três elementos: o promotor, que regula a expressão do gene; 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 (CONCEIÇÃO et al., 2006) (**Figura 3**).

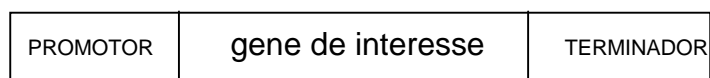


Figura 3: Figura esquemática da construção genética de um OGM

As etapas envolvidas no processo de transformação compreendem: a localização do gene correspondente a uma característica desejada, a obtenção e clonagem ou multiplicação desse gene, a construção do cassete de expressão do gene, a transformação da célula do organismo receptor e, finalmente, a seleção, regeneração da planta e fixação da característica desejada.

LAJOLO, 2003 descreve, a seguir, o processo de obtenção dos OGM: a etapa inicial é a identificação e obtenção do gene (fragmento de DNA) de interesse a ser transferido de um organismo (planta, bactéria) a outro. Normalmente esse gene é isolado do organismo “doador”, inserido em um vetor de clonagem, normalmente um plasmídeo destinado à multiplicação do gene sintetizado *in vitro* e modificado com elementos que controlam o seu funcionamento e introduzido em um vetor de expressão. Essas modificações envolvem a adição de um promotor, uma seqüência terminadora e um gene marcador. O vetor de expressão normalmente é um plasmídeo destinado à expressão forte do gene na célula hospedeira. O plasmídeo

de expressão contendo o gene de interesse é inserido em uma bactéria, que é multiplicada em cultura.

Esse DNA, agora obtido numa quantidade maior, é isolado e inserido na célula (por exemplo, uma célula vegetal capaz de regenerar-se) a ser transformada, por processos físicos ou biológicos. Entre os processos físicos, a biobalística é um dos mais empregados. Micropartículas metálicas são recobertas pela molécula de DNA a ser transferida e “bombardeadas” para dentro do núcleo da célula a ser transformada. Uma pequena fração se incorporará a seu DNA. Já o processo biológico, mais comum para dicotiledôneas, utiliza o *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria do solo capaz de infectar células de plantas e transferir parte do seu material genético para um tecido vegetal. Ele contém, além do seu cromossomo, um plasmídio conhecido como plasmídio Ti (indutor de tumor), em cujo DNA há uma região – o T-DNA (T de transferência) – que pode ser transferida para o cromossomo de plantas. A estratégia do processo é incluir nesse T-DNA a construção genética a ser transferida para a planta e usar os mecanismos naturais de transformação; colocando-se ambos em contato – o *Agrobacterium* já com o plasmídio recombinante mais a célula vegetal – esta será transformada e, depois de selecionada, poderá gerar uma nova planta.

Como os processos de transformação são pouco eficientes, associam-se ao gene de interesse, outros, conhecidos como genes marcadores, para facilitar a seleção das células que realmente foram transformadas, ou seja, as que transportam o gene desejado. Os marcadores são genes que produzem coloração ou são genes de resistência a antibióticos ou herbicidas. Juntamente com o gene de interesse e os marcadores, outros elementos são introduzidos, como o promotor e o terminador, que sinalizam o começo e o fim do gene a ser expresso.

O promotor é uma seqüência de nucleotídeos reconhecida pelo sistema de leitura (RNA polimerase) como o começo da transcrição do gene e define quando o gene irá expressar-se, em que órgão ou tecido e quanto de proteína irá produzir. Assim, com a escolha adequada do promotor, é possível fazer com que o gene de interesse se expresse em determinado órgão, por exemplo, num fruto, para manter sua firmeza; numa folha, para protegê-la do ataque de insetos; numa semente, para enriquecer seu conteúdo protéico. Entre os promotores mais usados, está o promotor CaMV 35S, do vírus do mosaico da couve-flor.

Nas modificações genéticas que ocorrem em melhoramentos convencionais também há transferência de genes, mais comumente entre plantas de uma mesma espécie e por processos de reprodução normal da planta, como polinização ou multiplicação vegetativa ou ainda embriogênese somática (regeneração da planta *in vitro*, pela qual parte dela dá origem a embriões cultivados artificialmente). A transferência, porém, é menos seletiva, envolvendo centenas de genes. Na transferência seletiva, o gene transferido irá incorporar-se ao DNA nuclear da célula transformada, a qual, regenerando-se, dará origem a uma planta com um ou alguns genes que ela antes não continha. Essa planta terá então novas propriedades originadas pela expressão dos novos genes.

Normalmente, as características desejadas, como, por exemplo, resistência a insetos, tolerância a herbicidas, ou produção de um nutriente, são obtidas pela introdução de um gene novo. Em certos casos, porém, genes preexistentes podem ser removidos ou bloqueados. Foi o que ocorreu com um arroz transgênico, que teve reduzida a expressão de um gene produtor de uma proteína alergênica. Também foi o que fez com que um tomate passasse a manter a firmeza por mais tempo, mesmo maduro. No caso do tomate, porém, introduziu-se a nova cópia do gene no sentido inverso ao preexistente, produzindo-se um RNA complementar, também invertido, que se combina com o RNA normal, bloqueando a sua tradução na proteína correspondente, uma enzima responsável pelo amolecimento do fruto, a poligalacturonase. Essa técnica, conhecida como DNA anti-senso, é usada também para inibir a produção do hormônio de amadurecimento de frutos (o etileno), permitindo que eles se conservem por tempos mais longos. A soja normal, por exemplo, não é resistente ao herbicida glifosato, usado para controle de pragas, porque possui uma enzima, a EPSPS, que é inibida por ele, como o é a enzima de outras plantas. O que se fez, então, foi a expressão forte do gene da enzima EPSPS de outro microrganismo, uma bactéria, tornando-a muito mais resistente ao herbicida, pelo aumento da atividade EPSPS resistente à ação inibitória do glifosato.

Pode-se também transferir mais de um gene. Por exemplo, um arroz recebeu genes de uma flor e de uma bactéria e passou a produzir β -caroteno (pro vitamina A). A mudança de cor fez com que fosse chamado de “arroz dourado”. A tecnologia do DNA recombinante permite de forma específica e mais rápida conferir características desejadas a um produto agrícola por meio de estratégias como a introdução de novos genes ou o aumento ou redução na expressão de genes preexistentes.

1.4. Alimentos geneticamente modificados

As primeiras plantas geneticamente modificadas foram desenvolvidas a partir de 1983, quando um gene codificante para resistência a um antibiótico foi introduzido em plantas de tabaco. As primeiras autorizações para plantio experimental de cultura GM ocorreram na China, em 1990, e se referiam ao tabaco e ao tomate resistentes a vírus. Entre os países desenvolvidos, no entanto, a primeira aprovação para uso comercial de vegetais geneticamente modificados só ocorreu em 1992, nos Estados Unidos, como tomate *Flavr Savr* e, posteriormente, em 1994 com a soja Round up Ready®.

A Biotecnologia moderna difere-se da Biotecnologia clássica pelo uso de técnicas da engenharia moderna onde o uso do gene que contém a informação para síntese de uma determinada proteína de interesse pode ser transferido para outro organismo, que então produzirá a proteína desejada. A Biotecnologia consiste na aplicação, em grande escala, dos avanços científicos e tecnológicos resultantes de pesquisas em Ciências Biológicas.

Embora a palavra biotecnologia tenha sido usada pela primeira vez em 1919, por um engenheiro agrícola da Hungria, as primeiras aplicações biotecnológicas pelo ser humano datam de 1800 a.C., com o uso de leveduras para fermentar vinhos e pães (GUERRANTE, 2003).

A biotecnologia já oferece avanços em áreas diversas como saúde animal e humana, processamento de alimentos, gerenciamento ambiental e tecnologia agrícola. Cientistas vislumbram a possibilidade de aumentar a produtividade de culturas e, ao mesmo tempo, diminuir o uso de substâncias químicas (reduzir simultaneamente desmatamentos e poluição) ou ainda oferecer à população, por exemplo, alimentos mais abundantes ou reforçados em nutrientes, ricos em anticancerígenos, livres de substâncias que causam alergias ou que possam crescer em condições adversas (seca, frio, excesso de salinidade, etc.). Os vegetais geneticamente modificados podem ser classificados em “três gerações” ou “ondas”, segundo a ordem cronológica de aparecimento (**Tabela 3**).

No Brasil a Embrapa está desenvolvendo cultivares geneticamente modificados de mamão resistente ao vírus da mancha anelar, feijão resistente ao vírus do mosaico dourado e algodão resistente a insetos (EMBRAPA, 2005). Há ainda trabalhos sendo desenvolvidos como alface com vacina contra a leishmaniose, frutas e hortaliças mais ricas em vitaminas e soja que produz insulina ou hormônio do crescimento (CTNBio, 2003).

Existem, atualmente, cerca de 100 diferentes eventos autorizados em vários países para uso na produção de alimentos e/ou ração animal, estando a maioria ainda em estágio experimental. Entretanto, somente um número reduzido vem sendo comercializado na forma de produtos alimentícios. Cada evento possui características próprias sendo que, na maioria dos casos, detalhes das seqüências das modificações são freqüentemente mantidos sob sigilo devido às leis de proteção da propriedade intelectual (MIRAGLIA et al., 2004)

1.5. Soja Round Up Ready (RRS)

A soja RR é um vegetal geneticamente modificado que possui um transgene (CP4/EPSPS) que confere resistência ao herbicida glifosato adquirido através da biobalística. O vetor de clonagem utilizado é um plasmídeo de *E. coli* (PV-GMGT04) que contém o gene de tolerância ao glifosato (CP4/EPSPS), o gene marcador *gus* (para produção de β -glucuronidase) e o gene *nptII* (confere resistência à canamicina) (GIÚDICE et al, 2000) (**Figura 4**).

Tabela 3: Classificação dos vegetais geneticamente modificados e suas características

	Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração
Características	Reúne as plantas geneticamente modificados com características agrônômicas de resistência a herbicidas, a pestes (insetos e fungos) e a vírus. Os primeiros plantios experimentais dessa geração ocorreram na década de 1980 e hoje, a maioria das sementes geneticamente modificadas aprovadas para comercialização no mundo pertencem a essa geração.	Reúne as plantas geneticamente modificadas cujas características nutricionais foram melhoradas qualitativa e quantitativamente. Essa é uma geração mais recente e poucas são, até hoje, as plantas da segunda geração autorizadas para comercialização	Reúne as plantas geneticamente modificadas destinadas à síntese de produtos especiais, como vacinas, hormônios, anticorpos e plásticos.
Exemplos	<ul style="list-style-type: none"> - Milho: proteção contra insetos, tolerância a herbicidas e esterilidade masculina; - Colza: tolerância a herbicidas, rica em ácido láurico e esterilidade masculina; - Mamão: resistência a vírus - Batata: proteção contra insetos e vírus - Soja: Tolerância a herbicidas - Melão: resistência a vírus - Beterraba açucareira: Tolerância a herbicidas - Tomate: Amadurecimento retardado, resistência a vírus - Chicória: Tolerância a herbicidas e esterilidade masculina 	<ul style="list-style-type: none"> - Banana: modificação no amadurecimento - Milho: maior teor de amido, alteração na estrutura do amido, alto teor de lisina e triptofano, maior teor proteico, maior teor de óleo - Colza: maior teor de óleo - Palma: melhora da qualidade do óleo - Batata: alto teor de amido, resistência a pragas de estocagem, resistência a danos mecânicos Arroz: maior teor de pro-vitamina A, maior teor de ferro, resistência à ferrugem bacteriana, resistência a larvas, a pragas de estocagem e, aumento da capacidade fotossintética - Soja: aumento do teor de óleo, aumento do teor de vitamina E, diminuição dos níveis de carboidratos causadores de flatulência, melhora do sabor - Beterraba açucareira: alteração na composição de macronutrientes - Tomate: resistência a doenças, melhora da qualidade para processamento, aumento em licopeno. 	Os vegetais dessa geração ainda estão em desenvolvimento.

Fonte: Giúdice *et al.*, 2000

O glifosato, um composto desenvolvido como herbicida, ingrediente ativo do Round-up, age como um inibidor competitivo da 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPS), uma enzima essencial da via bioquímica de Shikimate, envolvida na produção de aminoácidos aromáticos essenciais como fenilalanina, tirosina e triptofano. A inibição da EPSPS resulta em amarelecimento dos meristemas, necrose e morte da planta.

O gene de tolerância CP4 EPSPS é isolado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4. O gene CTP (peptídeo trânsito do cloroplasto) é responsável pelo endereçamento da nova proteína EPSPS ao interior do cloroplasto onde o sítio de ação do glifosato e a via do shiquimato estão localizados. O gene EPSPS, ligado ao CTP/EPSPS, está sob regulação de um forte promotor constitutivo do vírus do Mosaico da Couve-flor (P-CaMV E35S), e do terminador nopalina sintase (t-nos) da

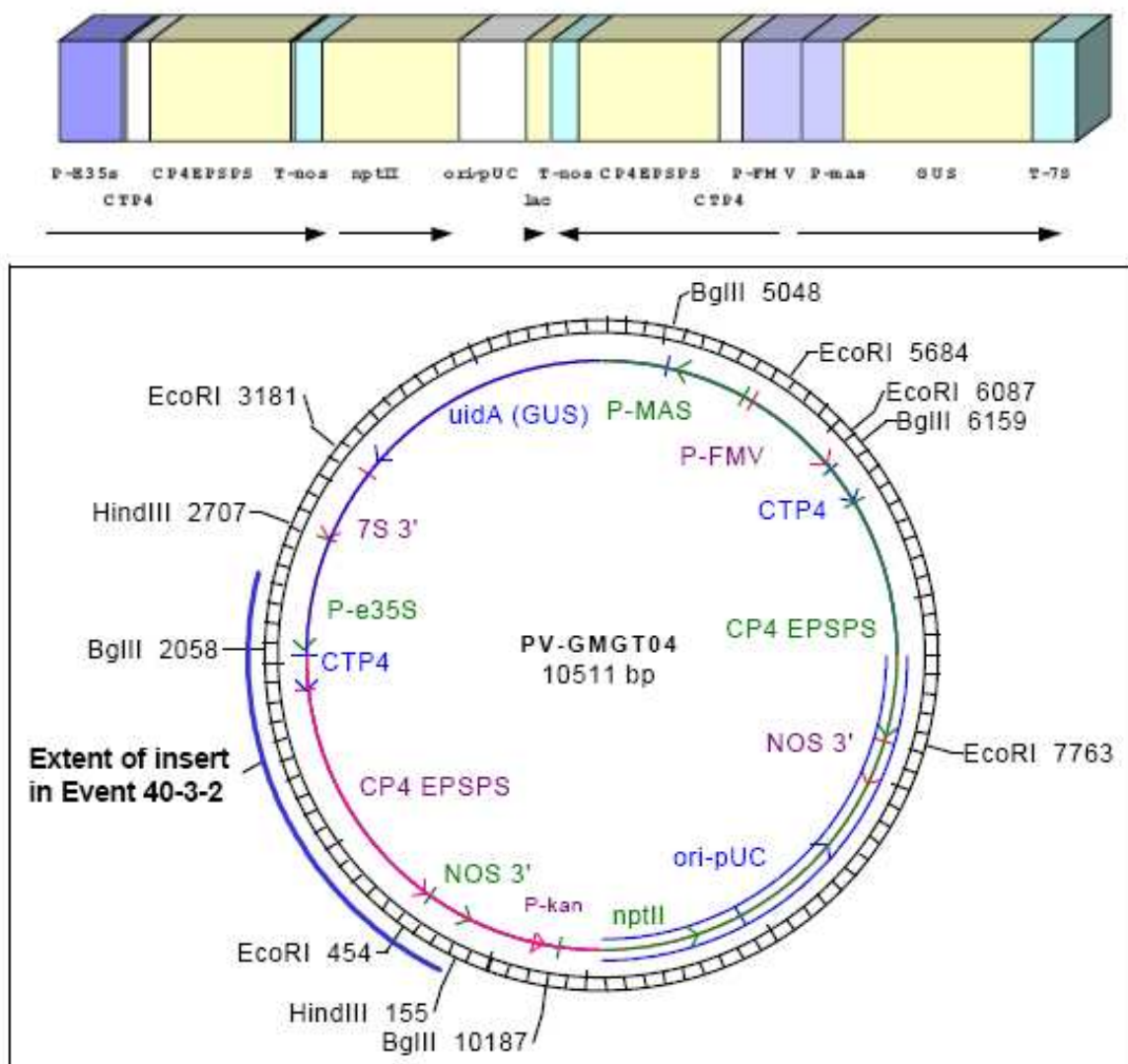


Figura 4: Representação linear e circular do vetor de clonagem utilizado para transformação (MONSANTO COMPANY, 2000)

1.6. Herbicida Glifosato

De acordo com o “Federal Environmental Pesticida Control Act” herbicidas são substâncias ou misturas de substâncias utilizadas para prevenir o aparecimento, reduzir, ou destruir ervas daninhas e outros tipos de plantas, quer sejam aquáticas ou terrestres. Podem, ainda, ser utilizados para causar a morte de apenas partes das plantas.

O termo erva daninha apresenta uma série de significados de acordo com a situação em particular. Cientificamente, somente se considera plantas lenhosas, cujas partes aéreas vivem menos de um ano. Na prática, pode ser definida, de modo geral, como qualquer planta indesejável num determinado local. Todavia, na agricultura e horticultura, é aquela planta que difere da cultura específica em crescimento. Nas ferrovias, estradas, pátios industriais, aeroportos, represas e etc.; é a vegetação como um todo (MIDIO, 1997).

A principal fonte humana de alimentos é a vegetal. Os vegetais competem com aproximadamente 30.000 espécies de ervas daninhas no mundo todo, com cerca de 1.800 delas causando sérias perdas econômicas. Essa competição, contribui para uma redução de 9-10% nas colheitas mundiais, de um total de 35% de perdas causadas por pragas em geral. As ervas daninhas privam as plantações de umidade e nutrientes do solo, impedem a incidência direta de luz solar reduzindo assim seu crescimento e contaminam grãos das safras com sementes quase sempre tóxicas ao homem e aos animais (MIDIO, 1997).

O comércio mundial de pesticidas cresce a cada ano. Embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, entre elas o advento das culturas transgênicas, resistentes a algumas pragas, o uso de herbicidas é destacado visto que a maioria destas inovações não impede o florescimento de ervas daninhas no campo. Atualmente, o herbicida glifosato (N-fosfanometilglicina), não-seletivo, sistêmico, pós-emergente, representa 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos, contabilizando um total de US\$ 1,2 bilhão/ano com vendas no produto (AMARANTE Jr. et al., 2002).

O glifosato apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas. Desde 1971, quando foi relatado primeiramente como herbicida, três tipos de

glifosato vêm sendo comercializados: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sequisódio (patenteados por Monsanto e vendido como Round-up®, e glifosato-trimesium (patenteado por ICI, atual Syngenta). Apesar do glifosato ser citado como pouco tóxico, há evidências de efeitos deletérios no ambiente, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas, após o uso prolongado do herbicida (AMARANTE Jr. et al., 2002).

Em diversos tipos de cultivo, glifosato costuma ser pulverizado sendo, em geral, absorvido na planta através de suas folhas e dos caulículos novos. O herbicida é, então, transportado por toda planta, agindo nos vários sistemas enzimáticos, inibindo o metabolismo de aminoácidos. As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas e, devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive (AMARANTE Jr. et al., 2002)

O glifosato tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (m.m.= 169,1 g/mol) e, na forma de sal de isopropilamônio, apresenta-se acrescido do grupo $(CH_3)_2CHNH_3^+$ (m.m.=228,2 g/mol). Em condições ambientais, tanto glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12g/L a 25 °C, para glifosato) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros. Glifosato funde a 200°C, possui densidade aparente de 0,5g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C (AMARANTE Jr., 2002 e RE nº 165 de 29/08/2003, BRASIL, 2003 e).

Em geral, glifosato é vendido em concentrações de 48% (m/v) e as doses aplicadas são em torno de 5L/ha. A mistura com outros herbicidas pode reduzir a atividade do produto, ocasionando o chamado antagonismo. Para aumentar a eficiência na eliminação de ervas, pode-se utilizar glifosato misturado com outros herbicidas, tais como formulados à base de 2,4- D, terbutilazina, simazina, alaclor e diuron, por exemplo. Glifosato pode ainda ser aplicado na água para o controle de ervas aquáticas (AMARANTE Jr., 2002).

A presença de resíduos químicos em alimentos e na água varia amplamente, de acordo com uma série de determinantes. A permanência de até 50% de resíduos de glifosato em diferentes tipos de solo tem sido, sistematicamente, documentada, e a variância do tempo de permanência, de alguns anos, tem sido um quebra-cabeça não resolvido para especialistas no assunto (KLEBA, 1998)

Quanto aos aspectos toxicológicos, o glifosato é irritante dérmico e ocular, podendo causar danos hepáticos e renais quando ingerido em doses elevadas. O composto é absorvido por via oral e dérmica, sendo excretado principalmente na urina (RE nº 165 de 29/08/2003, BRASIL, 2003 e).

O uso repetido tem resultado na maior resistência de ervas daninhas através do mecanismo de seleção natural, que beneficia biótipos resistentes, preexistentes na população, levando ao aumento da quantidade destes indivíduos (AMARANTE Jr., 2002).

Quanto ao ambiente, o glifosato tende a ser inativo em contato com o solo, desde que seja absorvido por este (WHO, 1994).

A rota de degradação do glifosato no solo, mais citada em literatura consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico, AMPA (AMARANTE Jr., 2002).

ARAÚJO, 2002 avaliou a biodegradação do glifosato monitorando a evolução do CO₂ dos microrganismos e também quantificou seus resíduos e do metabólito AMPA. Os resultados mostraram que o glifosato foi degradado pelos microrganismos do solo com formação do AMPA. Os actinomicetos tiveram aumento na população com a presença de glifosato, enquanto que as bactérias permaneceram em número constante durante o período de incubação.

AMARANTE JR. et al., 2002 discutem a inexistência de limites legais estabelecidos para o glifosato em águas ou solo no Brasil, embora a legislação estabeleça normas e critérios para realização de testes preliminares para a avaliação ecotoxicológica de pesticidas. É mencionado também o limite estabelecido de 700 µg/L de glifosato em água potável como “limite consultivo de saúde” pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) e a “concentração máxima admissível” de 0,1µg/L para pesticidas em águas potáveis como substâncias individuais, desde que a concentração total não ultrapasse 0,5 µg/L pela Comunidade Econômica Européia.

Na legislação brasileira o pesticida glifosato tem seu LMR (Limite Máximo de Resíduo) ou tolerância, e intervalo de segurança, ou carência (intervalo entre a aplicação do pesticida e a colheita), estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para as culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café,

cana-de-açúcar, citros, eucalipto, maçã, milho, nectarina, pastagens, pêra, pêssego, pinus, seringueira, soja, trigo e uva. A ANVISA estabeleceu o LMR de 0,2 mg/Kg para soja, porém em 2003 este limite foi alterado para 10 mg/Kg e houve também a inclusão do intervalo de segurança de 56 dias para soja resistente ao glifosato na modalidade de aplicação pós-emergência (RE nº 165, de 29/08/2003, BRASIL, 2003 e)

Os países integrantes da EEC têm estabelecido LMR de glifosato para frutas e hortaliças (0,10 mg/Kg), para cogumelos selvagens (50,00 mg/Kg) e para tubérculos (0,10 mg/Kg) (AMARANTE JR et al., 2002)

As concentrações mais altas de glifosato e seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), tem sido encontradas em folhagens novas. A aplicação de glifosato pode resultar na presença de resíduos tanto na colheita quanto em animais usados na alimentação humana. No ambiente, as concentrações mais altas de ambos os compostos foram encontradas no solo. A aplicação direta como herbicida em águas superficiais pode ser responsável pela presença de glifosato em água potável (WHO, 1994).

1.7. Modelo Regulatório Brasileiro

Os alimentos foram os primeiros produtos a ganharem legislação específica, revisada e atualizada em consonância com os avanços da tecnologia de produção e a incorporação de testes específicos para controle de riscos já reconhecidos e comprovados. Foram também os primeiros a “ganharem a desconfiança” ante o surgimento de novos produtos com novos coadjuvantes. Foi assim que surgiu, por exemplo, o decreto lei nº986 de 1969, acredita-se que a tragédia da talidomida tenha contribuído para tal prudência (BRASIL, 1969).

Em paralelo às conquistas sociais advindas da promulgação da nova Constituição Federal, surgiu o Código de Defesa do Consumidor, Lei nº8079, de 1990, que, entre outras determinações, busca a proteção da saúde contra os riscos do consumo de produtos considerados perigosos ou nocivos. O Código de Defesa do Consumidor externa o entendimento social de serem a qualidade e o risco responsabilidades do fabricante e/ou fornecedor. A Lei nº 8078/90 (Código de

Defesa do Consumidor), no artigo 6º inciso III e no artigo 31, define como direito básico do consumidor o acesso à informação sobre as características dos produtos ofertados em relação à sua qualidade, composição, origem e riscos que apresentem à saúde e segurança, veiculada de forma clara, precisa e ostensiva (BRASIL, 1990).

A Lei nº 8.974 de 05.01.95, *estabeleceu normas de segurança e mecanismos de fiscalização no uso das técnicas de engenharia genética na construção, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte de organismo geneticamente modificado (OGM), visando proteger a vida e a saúde do homem, dos animais e das plantas, bem como o meio ambiente" (BRASIL, 1995).*

Por fim, o Decreto nº 1752, de 20/12/95, ao regulamentar a Lei nº 8974/95, dispôs sobre a vinculação, competência e composição da CTNBio. O Decreto em questão elencou um considerável número de atribuições da Comissão. A análise da constitucionalidade do Decreto será melhor desenvolvida no tópico referente ao Estudo de Impacto Ambiental e na decisão judicial que suspendeu o plantio, em escala comercial, da soja *Round up Ready* (BRASIL, 1995 a)

A CTNBio elaborou ainda a Instrução Normativa Nº 20, 11 de dezembro de 2001 que dispõe sobre as normas para avaliação da segurança alimentar de plantas geneticamente modificadas ou de suas partes e dá outras providências (BRASIL, 2001).

O Princípio da Precaução foi definido após a Conferência Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, ocorrida no Rio de Janeiro em 1992 e definitivamente incluído no direito internacional após a Convenção da Diversidade Biológica que o Brasil assinou e ratificou, por intermédio do Congresso Nacional, em maio de 1994. Ele consiste em: "Não exercer uma determinada ação, que em caso de dúvida possa vir a produzir danos à saúde e ao meio ambiente".

Em 11 de setembro de 2003 entrou em vigor o Protocolo de Cartagena, o primeiro acordo internacional que rege a transferência, manejo e uso de organismos vivos modificados por meio da biotecnologia moderna. Espera-se que o tratado fomenta o uso seguro de transgênicos, tema que causa uma acesa polêmica global, liderada pelos Estados Unidos e pela Europa. Adotado em 2000 pelos membros da Convenção sobre Diversidade Biológica, o tratado busca um comércio internacional

de transgênicos mais transparente, através de medidas de segurança de acordo com as necessidades de consumidores, indústrias e, em particular, do meio ambiente.

Estabelecido em 2000, após 5 anos de intensas negociações, o Protocolo de Cartagena, até 03 de outubro de 2005, já foi ratificado por 125 países. O Brasil e o Japão são signatários desde 2004 e os Estados Unidos não são signatários. O objetivo deste instrumento é descartar potenciais conflitos entre as leis de comércio e o regime de biossegurança global. Existe uma árdua disputa entre os que vêem na biotecnologia o caminho para a segurança alimentar e os que alegam razões éticas, ambientais, sociais e de saúde para tentar pôr um limite à biotecnologia moderna. O Artigo 15 trata da Avaliação de Risco e o Artigo 18 da manipulação, Transporte, Embalagem e Identificação de Organismos Vivos Modificados.

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) anunciou, em março de 2000, a Declaração sobre Biotecnologia, onde afirma que esta ciência oferece instrumentos poderosos para o desenvolvimento sustentável da agricultura, pesca, atividade florestal, bem como das indústrias alimentícias. A Rede de Cooperação Técnica em Biotecnologia Vegetal (REDBIO), da FAO, composta por 570 laboratórios em 32 países, defende a manutenção e reforço da pesquisa em biotecnologia, incluindo os cultivos transgênicos, em lugar de fixar normas de biossegurança necessárias para evitar danos à saúde e ao meio ambiente.

Em junho de 2003, a República de Palau, ilhas situadas no noroeste da Oceania, se converteu no 50º Estado a ratificar o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança, o que permitiu sua entrada em vigor.

Em 19 de Julho de 2001, foi publicado no Diário Oficial da União, o Decreto nº 3871, que disciplina a identificação e rotulagem de alimentos oriundos de organismos geneticamente modificados.

"Art. 1º Os alimentos embalados, destinados ao consumo humano, que contenham ou sejam produzidos com organismo geneticamente modificado, com presença acima do limite de quatro por cento do produto, deverão conter informação nesse sentido em seus rótulos, sem prejuízo do cumprimento da legislação de biossegurança e da legislação aplicável aos alimentos em geral ou de outras normas complementares dos respectivos órgãos reguladores e fiscalizadores competentes.

§ 1º *Na hipótese do caput deste artigo, o rótulo deverá apresentar uma das seguintes expressões: "(tipo do produto) geneticamente modificado" ou "contém (tipo de ingrediente) geneticamente modificado".*

§ 2º *As informações do rótulo deverão estar em língua portuguesa, com caracteres de tamanho e formato que as tornem ostensivas e de fácil visualização.*

§ 3º *Para efeito deste Decreto, o limite previsto no caput estabelece o nível de presença não intencional de organismo geneticamente modificado, percentualmente em peso ou volume, em uma partida de um mesmo produto obtido por técnicas convencionais.*

§ 4º *Para alimentos constituídos de mais de um ingrediente, os níveis de tolerância estabelecidos serão aplicados para cada um dos ingredientes considerados separadamente na composição do alimento".*

Em 2003, no Governo Lula foi editado o Decreto Federal 4680 de 24.04.2003 que regulamenta o direito à informação, assegurado pela lei nº 8078, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados a consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. O Decreto 3871/01 (4%) foi revogado (BRASIL, 2003 a).

No Art. 2º do decreto 4680 diz: Na comercialização de alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM, com presença acima do limite de 1% do produto, o consumidor deverá ser informado da natureza transgênica desse produto (BRASIL, 2003 a).

Há uma exceção para o Estado de São Paulo. Em 1999 foi aprovada uma lei que exige que todos os alimentos que contiverem transgênicos, independentemente da quantidade, tragam a informação obrigatória no rótulo: "alimento geneticamente modificado" ou "contém, na composição, alimento geneticamente modificado", conforme o caso (SÃO PAULO, 1999). Recentemente, a Vigilância Sanitária Estadual, com base nessa lei, teria interditado 11 (onze) produtos.

O decreto federal nº 4680 estabelece que o rótulo deve ter uma das seguintes expressões, dependendo do caso: "(nome do produto) transgênico", "contém (nome

do ingrediente ou ingredientes) transgênico(s)" ou "produto produzido a partir de (nome do produto) transgênico". O decreto determina ainda que o consumidor seja informado sobre a espécie doadora do gene no local reservado para a identificação dos ingredientes (BRASIL, 2003 a).

Outra informação importante aos consumidores que o IDEC não tem negligenciado é a de que os alimentos de origem animal derivados de espécies alimentadas com ração contendo ingredientes transgênicos deverão trazer no painel principal, em tamanho adequado, a seguinte expressão: "(nome do animal) alimentado com ração contendo ingrediente transgênico" ou "(nome do ingrediente) produzido a partir de animal alimentado com ração contendo ingrediente transgênico". Desde que tenham similares transgênicos no mercado brasileiro, será facultado aos fabricantes de alimentos e ingredientes alimentares que não contenham nem sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados a rotulagem "(nome do produto ou ingrediente) livre de transgênicos".

Por fim, os órgãos responsáveis pela fiscalização de alimentos e os de defesa do consumidor federais, estaduais e municipais devem fiscalizar a rotulagem dos transgênicos, que são os órgãos de vigilância sanitária (como a Anvisa e as Visas estaduais e municipais), os de agricultura (como o Ministério da Agricultura e secretarias estaduais e municipais de agricultura) e os de defesa do consumidor (como o Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor do Ministério da Justiça e os Procons estaduais e municipais).

É preciso reconhecer que a importância da rotulagem não se verifica apenas na garantia do direito do consumidor em ser plenamente informado sobre o produto que está adquirindo ou ainda à segurança do alimento transgênico, até porque a sua liberação para o consumo depende de prévia análise de riscos e da aprovação dos testes procedidos pela Vigilância Sanitária, sendo o processo de rotulagem um instrumento eficaz de uma política de prevenção para se detectar os efeitos adversos de longo prazo e com isso se corrigir eventos não previstos nos testes realizados antes da liberação comercial.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio concluiu, em sua 5ª Reunião Extraordinária, realizada no dia 24 de setembro de 1998, a avaliação de biossegurança (ambiental e alimentar) sobre o uso, em escala comercial, do cultivar de soja geneticamente modificada "Roundup Ready". O parecer técnico conclusivo

refere-se aos genótipos derivados da linhagem de soja GTS 40-3-2 ou de suas progênes, tolerantes ao herbicida Glifosate, de acordo com a solicitação encaminhada à CTNBio pela empresa Monsanto do Brasil Ltda. (processo nº 01200.002402/98-60).

Através deste Comunicado, a CTNBio emitiu, sem exigir prévio Estudo de Impacto Ambiental -EIA/RIMA (respaldando-se, para tanto, no art. 2º, incisos XII e XIV do Decreto nº 1.752/95), parecer técnico conclusivo favorável à solicitação, encaminhada pela empresa Monsanto, de liberação da comercialização de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida Roundup Ready (BRASIL, 1995 a).

O IDEC, em 16.10.1998, ajuizou Ação Civil Pública, insurgindo-se contra tal parecer conclusivo e questionando, também, a constitucionalidade de aspectos da legislação referente ao procedimento de liberação da comercialização de produtos geneticamente modificados. O Juiz Federal Antônio Souza Prudente julgou procedente o pedido formulado e proibiu, em geral, a liberação comercial de variedades transgênicas sem prévia realização de estudo e relatório de impacto ambiental (EIA-Rima), e, particularmente, no caso concreto, suspendeu o parecer técnico conclusivo da CTNBio relativo à soja transgênica “Roundup Ready”.

Somente a partir de 2003, o plantio e comercialização da soja RR foram autorizados através de Medidas Provisórias:

- MP 113 de 26.03.2003 (BRASIL, 2003 g) trata da comercialização da safra 2002/03 de soja transgênica. Art 1º: Não estará sujeita às exigências da Lei 8974 § 1º : Comercialização até 31.01.2004 e destruição e limpeza do ambiente após esta data

Art 2 º: Rotulagem obrigatória Art 3º e 4º: Certificação

- Lei 10.688 de 13 de junho de 2003 - Estabelece normas para a comercialização da produção de soja da safra de 2003 e dá outras providências (BRASIL, 2003 b).

- MP 131 de 26.09.2003 - Estabelece normas para a comercialização da produção de soja da safra de 2004 e dá outras providências (BRASIL, 2003 f).

- MP 223 de 14.10.2004 - Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja da safra de 2005(BRASIL, 2004).

Outras legislações pertinentes são:

Secretaria de Defesa Agropecuária – Instrução Normativa nº 32, de 19 de julho de 2001 – Normas que estabelecem as condições para o credenciamento de Laboratório para Detecção de Modificações Genética em produtos, e subprodutos de origem vegetal e como emitir laudos e certificados de análise.

Em 12 de março de 2002 foi aprovado pela Comissão Especial sobre Alimentos Geneticamente Modificados da Câmara dos Deputados, o Projeto de Lei (PL) de autoria do Dep. Confúcio Moura (PMDB/RO), que visa à liberação dos transgênicos no Brasil sem as necessárias avaliações de riscos para a saúde humana, para o meio ambiente e sem garantir ao consumidor o direito à plena informação.

O ministério da Justiça regulamentou e definiu, através da Portaria nº 2.658 de 26/12/2003, o símbolo que comporá a rotulagem tanto dos alimentos e ingredientes alimentares na forma do Decreto nº 4.680 de 24 de abril de 2003 (**Figura 5**) (BRASIL, 2003 d e a).



Figura 5: Símbolo que deverá conter no rótulo de alimentos que contenham OGM em sua composição.

Existe um Projeto do Executivo (PLC nº 9/04) que re regulamenta a produção, manipulação e pesquisa de organismos geneticamente modificados (OGM), ou transgênicos, cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) e reestrutura a Comissão Técnica de Biossegurança (CTNbio).

A Lei de Biossegurança nº 11105 de 24 de março de 2005 estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam

OGM, cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança (PNB) e revoga a Lei nº 8.974(BRASIL, 2005).

O artigo 2º da Lei de Biossegurança trata da responsabilidade "pelos eventuais efeitos ou conseqüências advindas de seu descumprimento"; e o artigo 8º veda, no seu inciso VI, "a liberação ou o descarte no meio ambiente de OGM em desacordo com as normas estabelecidas pela CTNBio e constantes da regulamentação desta Lei".

Por sua vez, o artigo 10 da mesma lei estabelece as competências da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) exigida dentro de toda entidade que utilize técnicas e métodos de engenharia genética, dentre outros, impõe o dever de "notificar à CTNBio, às autoridades de Saúde Pública e às entidades de trabalhadores, o resultado de avaliações de risco a que estão submetidas as pessoas expostas, bem como qualquer acidente ou incidente que possa provocar a disseminação de agente biológico" e "investigar a ocorrência de acidentes e as enfermidades possivelmente relacionados a OGM, notificando suas conclusões e providências à CTNBio" (incisos V e VI, respectivamente).

Outro organismo regulador é a Comissão do Codex Alimentarius que tem por objetivo acordar e recomendar, na forma de diretrizes, os princípios globais que devem ser seguidos por todos os países para testar a Segurança dos Alimentos Derivados de OGM, antes destes serem lançados no mercado. No âmbito das decisões do CODEX Alimentarius, foi elaborada uma lista de métodos validados, a "List of Methods Validated by Inter-laboratory Studies" que está sendo complementada sob a coordenação do Grupo de Trabalho alemão encarregado de propor metodologias relacionada com o Comitê de Métodos Analíticos e Amostragem (Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling).

Um outro destaque necessário é a evolução da legislação sanitária que, inicialmente, assumiu caráter de um estatuto criminal contra a fraude e a propaganda enganosa, e passou a ser uma estrutura legislativa cujo principal objetivo é o de prevenir riscos à saúde dos usuários. Porém algumas questões continuam pendentes. Como criar uma estrutura para reconhecer e eliminar riscos, cada vez mais complexos, em uma área de tecnologia em constante expansão? Como desenvolver e instigar pesquisas de possíveis eventos danosos à saúde, muitas

vezes conhecidos, mas de ação e de controles incertos? Atualmente, a necessidade da regulamentação de produtos é tida não apenas como indiscutível para a maioria dos países, mas como uma tarefa inalienável ao Estado.

A qualidade do produto não se restringe apenas às características intrínsecas do produto, mas é entendida como um binômio indissociável, em cuja avaliação as variáveis eficácia e segurança devem estar sempre presentes. Face à crescente demanda por parte da indústria de alimentos, importadores e exportadores, de mecanismos que permitam atender à legislação brasileira (Lei de Rotulagem) quanto à presença de OGM nos alimentos, é imprescindível que instituições brasileiras (públicas e privadas) sejam capazes de realizar análises não apenas qualitativas, como também quantitativas adequando-se à legislação vigente.

1.8. Aspectos gerais sobre a metodologia de análise de OGM

As questões regulatórias de análise de riscos e rotulagem de OGM são harmonizadas atualmente pelo *Codex Alimentarius*, uma referência global para consumidores, produtores de alimentos, órgãos governamentais relacionados com o controle de alimentos e para o comércio internacional.

A implementação e manutenção de regulamentações necessitam de protocolos de amostras e metodologias analíticas que consideram a determinação precisa do conteúdo de OGM no alimento (MIRAGLIA, 2004).

O primeiro método para identificação de OGM em alimentos foi especialmente desenvolvido para identificar o tomate Flavr SavrTM. Porém, métodos têm sido desenvolvidos para análise de OGM, geralmente baseados na presença de proteínas e DNA.

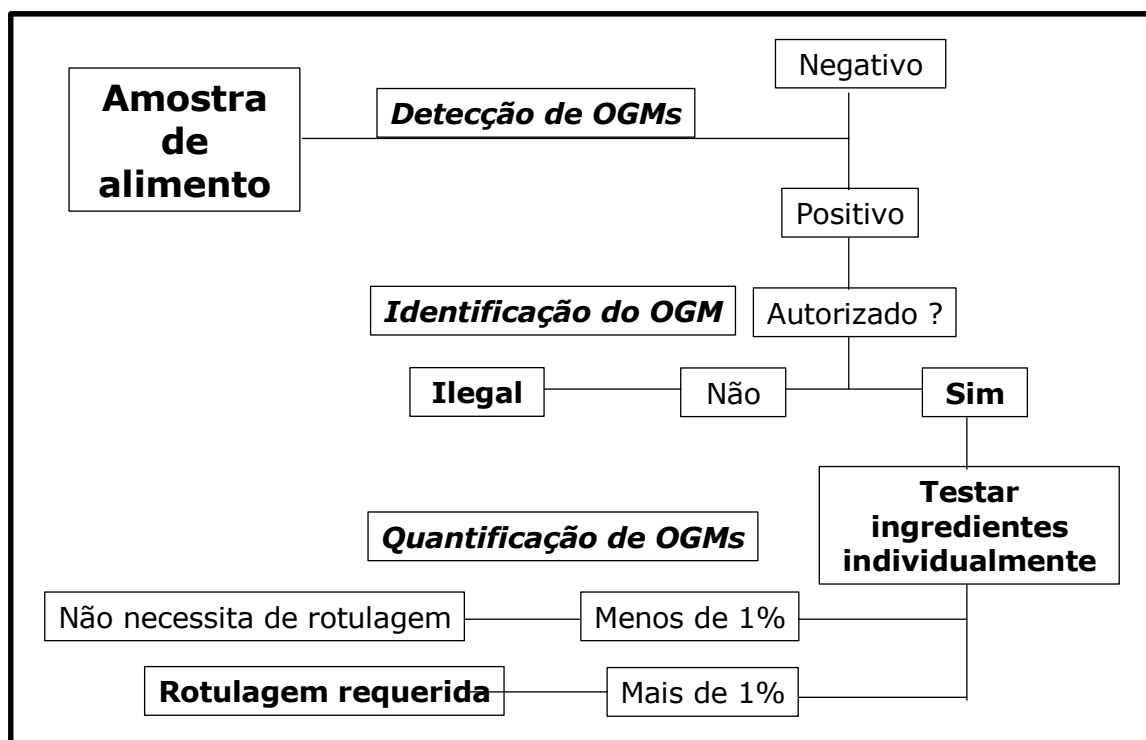
Muitos métodos que focam no fracionamento, separação e perfil de proteínas e peptídeos como ponto isoelétrico, afinidade cromatográfica e abordagem de separação uni ou bi dimensional podem ser aplicáveis para a caracterização de variedades de plantas GM em comparação com uma linha parental não-transgênica (MIRAGLIA, 2004). Porém, para alimentos processados, alimentos com baixo nível de expressão da proteína recombinante em tecidos utilizados na fabricação de

alimentos ou ainda alimentos cuja expressão do gene recombinante é realizada por RNA, tais métodos possuem limitações.

DEISINGH e BADRIE (2005) revisaram várias metodologias que são empregadas na detecção de OGM em alimentos. As principais categorias de estratégias de detecção são métodos baseados na PCR, métodos baseados no DNA que podem ou não envolver o uso da PCR, kits comercialmente disponíveis e outras abordagens incluindo eletroforese, biosensores e “DNA microarrays”.

O método de PCR tem sido o mais aceito pelos países da Comunidade Européia por ser um método preciso, direto e extremamente sensível (BARROS, 2004). Atualmente, a PCR é largamente utilizada em análise de plantas GM, pois permite a detecção rápida de genes em DNA genômico e a análise de um grande número de amostras. A reação da polimerase em cadeia é hoje uma tecnologia com inúmeras aplicações em ciências biológicas, tanto em pesquisa básica como aplicada, tendo proporcionado a seu autor, Kary B. Mullis, no início da década de 90, o prêmio Nobel de medicina. Por meio da PCR, pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, após alguns ciclos de amplificação, gerar 100 bilhões de moléculas similares.

A adequação dos produtos alimentícios à legislação brasileira sobre os limites de OGM para rotulagem é baseada na sua detecção, identificação e quantificação (**Figura 6**). O propósito da detecção é determinar se um produto contém OGM ou não, utilizando-se métodos de triagem. Se o resultado for positivo, deve-se proceder à identificação do OGM e verificação se o mesmo é autorizado e qual a sua concentração em porcentagem no alimento ou ingrediente. Isto exige métodos de quantificação. Um problema geral com estas análises é que, quanto mais processado o alimento, mais difícil é a detecção do OGM. Os métodos analíticos para detecção devem ser sensíveis e confiáveis o suficiente para se obter resultados exatos em todos os laboratórios de controle.



Fonte: Adaptado de ANKLAM et al., 2002

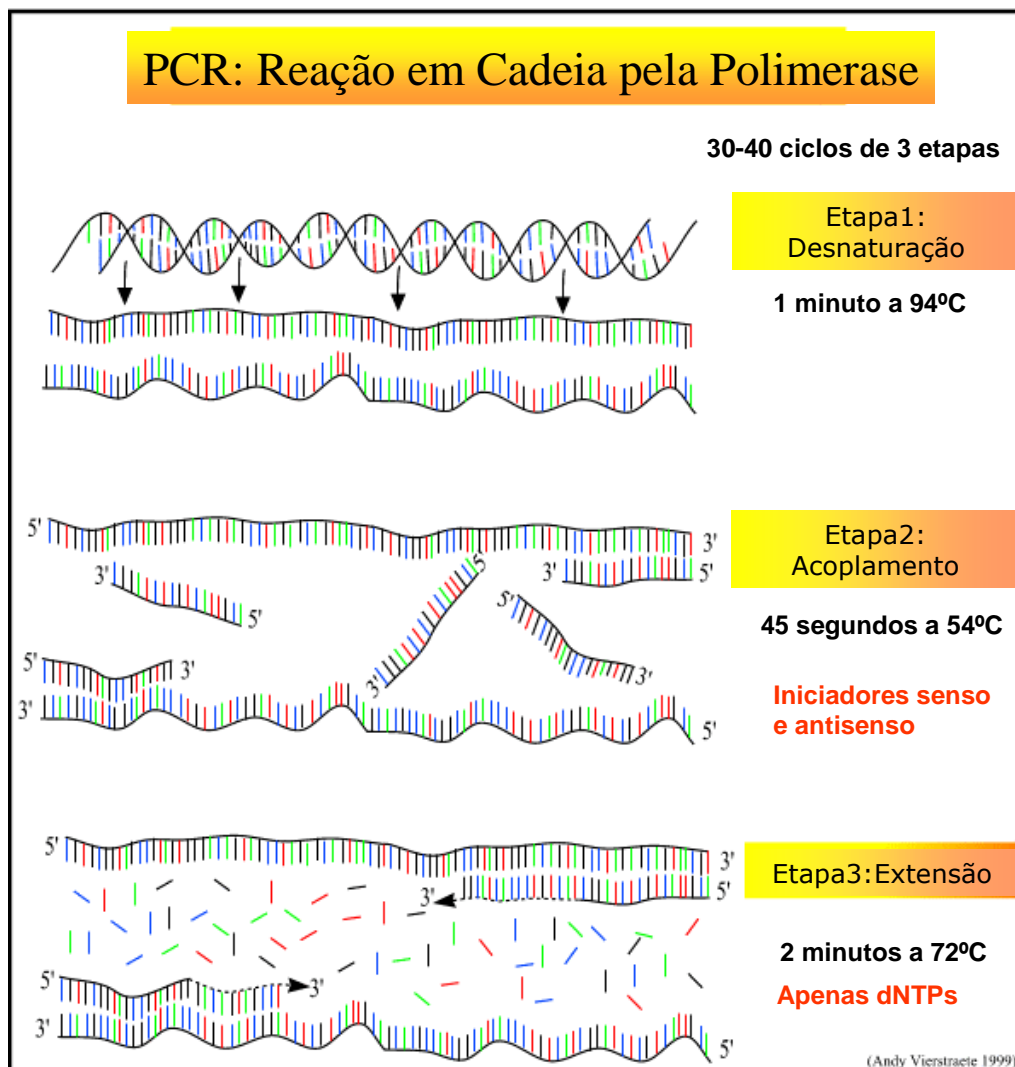
Figura 6: Procedimento Operacional para a Detecção, identificação e quantificação de OGM para cumprimento da Legislação Brasileira (decreto nº4680 de 24.04.2003)

A PCR (*“polymerase chain reaction”*) pode ser definida como um método *in vitro* para produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e seqüência definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde complexo de ácido nucléico. O número de fragmentos amplificados duplica-se a cada ciclo de reação, sendo, portanto, um processo exponencial.

A reação de amplificação é catalisada pela enzima DNA polimerase que alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples, chamado oligonucleotídeo iniciador ou *primer*, quando este está ligado a uma fita-molde ou *template* de DNA. O alongamento é feito pela adição, na extremidade 3' do iniciador, do nucleotídeo complementar ao nucleotídeo correspondente na fita-molde. Os iniciadores são sintetizados artificialmente, tendo como base uma seqüência de nucleotídeos complementares às seqüências que delimitam o fragmento de ácido nucléico a ser amplificado. A PCR é iniciada pela separação das fitas do DNA-molde, através da

elevação da temperatura da reação (desnaturação). A temperatura é então diminuída, para que haja anelamento dos iniciadores com o DNA-molde, e a polimerase possa atuar, estendendo um novo fragmento. O fragmento produzido na reação anterior serve também como molde para a reação seguinte. A PCR envolve, portanto, ciclos repetidos de desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores com suas seqüências complementares e polimerização da fita complementar ao molde. Os segmentos de DNA são sintetizados em uma progressão geométrica, pois a cada ciclo origina-se um novo segmento a partir do inicial e de cada um dos segmentos já produzidos no ciclo anterior (**Figura 7**).

Figura 7: Representação esquemática da amplificação de DNA pela PCR.



Fonte: Adaptado de VIERSTRAETE, A., 1999

O resultado da amplificação de ácido nucléico por PCR pode ser facilmente visualizado por eletroforese em gel de agarose. O sucesso da amplificação depende das condições de reação, da pureza dos reagentes utilizados e dos diferentes parâmetros da reação. Os métodos baseados na PCR, tanto qualitativos como quantitativos, podem ser categorizados em 4 níveis de especificidade (HOLST-JENSEN, 2003):

1º - métodos de triagem: são os de menor especificidade e são direcionados aos elementos genéticos comuns a muitos eventos como os promotores e terminadores. Métodos para triagem não podem ser utilizados para a identificação de um OGM específico, já que a maioria dos OGM disponíveis possuem um ou mais destes elementos. Além disso, estes ocorrem naturalmente em algumas plantas e microrganismos do solo.

2º - métodos gene-específicos: são baseados no gene de interesse que a planta adquiriu ao ser transformada. Esses métodos são mais específicos que os de triagem, porém não informam se o evento está autorizado ou não, já que o mesmo gene pode ser utilizado em diversos eventos de transformação.

3º-métodos construção-específicos: visam junções entre elementos adjacentes do transgene inserido, por exemplo, a junção entre o promotor e o gene de interesse.

4º - métodos evento-específicos: o alvo é a junção encontrada entre o genoma receptor e o DNA inserido no locus de integração sendo, portanto, de maior especificidade. A limitação está na incapacidade de distinguir entre um híbrido contendo dois ou mais OGM, chamados “gene-stacking” ou empilhamento de genes, e a mistura de espécies que originaram o híbrido.

1.9. Aspectos sobre extração de DNA

A eficiência da PCR depende da pureza e da qualidade do DNA . A qualidade do DNA é determinada pelo tamanho do fragmento e o grau de dano devido à exposição ao calor, pH baixo e/ou nucleases que causam hidrólise, depurificação e/ou degradação enzimática. Portanto, a qualidade do DNA varia de acordo com o material a ser analisado, o grau de processamento em que a amostra foi submetida

e o método de extração aplicado.(ANKLAM, 2004) . É importante lembrar que DNA isolados de alimentos processados são de baixa qualidade com fragmentos curtos de 100-400 bp para preparações com proteína de soja, por exemplo. (HEMMER, 1997).

A pureza do DNA pode ser afetada seriamente pelos vários contaminantes das matrizes dos alimentos (VROH, 1996). Contaminantes podem ser substâncias originárias do material em análise, por exemplo polissacarídeos, lipídios, polifenóis (GADANI, 2000) ou reagentes usados durante a etapa de extração de DNA. A *Taq polimerase* , enzima chave usada na reação da PCR é inibida por polissacarídeos, EDTA, fenol, SDS, etc.

Um grande número de métodos tem sido avaliados para o isolamento de DNA.

Em geral, extrações de DNA de vegetais tem sido realizadas segundo as etapas:

1- A quebra da parede celular é geralmente obtida pela trituração do tecido em gelo seco ou nitrogênio líquido;

2- A ruptura da membrana celular é obtida utilizando um detergente (CTAB ou SDS) contendo EDTA e um sal tamponado como Tris-HCl, como qualquer tampão de extração;

3 - A inativação de nucleases endógenas é obtida através da adição de detergentes e de EDTA que seqüestra Mg^{+2} , um co-fator obrigatório de muitas enzimas;

4 - Proteinase K pode ser adicionada para inativação e degradação de proteínas;

5 - Separação de polissacarídeos inibitórios é possível devido ao diferencial de solubilidade de polissacarídeos e DNA na presença de CTAB;

6 - Separação de constituintes celulares hidrofóbicos como lipídios e polifenóis, é alcançada pela extração com um solvente orgânico como clorofórmio;

7 - Finalmente, a separação de um detergente e concentração de DNA é realizada utilizando álcool e precipitação de sal, respectivamente.

1.10. Aspectos sobre Quantificação de OGM por PCR em Tempo Real

Um aspecto fundamental na análise de alimentos GM é a quantificação, uma vez que o limite máximo (1%) de OGM em alimentos é a base para rotulagem no Brasil (BRASIL, 2003 a).

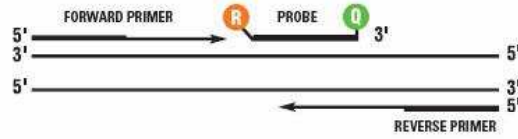
Um pré-requisito essencial para a aplicação das diretivas de rotulagem alimentar é a disponibilidade de métodos quantitativos confiáveis (ALARY, 2002).

A PCR quantitativa competitiva ou a semi-quantitativa tem sido proposta (STUDER, 1998; ZIMMERMANN, 1998). Entretanto, a aplicação da PCR em Tempo Real (HEID, 1996; HIGUCHI, 1993; HOLLAND, 1991) tem aumentado a possibilidade de uma quantificação mais precisa de OGM (VAÏTILINGOM, 1999; WURZ, 1999). Esta técnica foi originalmente desenvolvida em 1992 por Higuchi e colaboradores (HIGUCHI, et al., 1992).

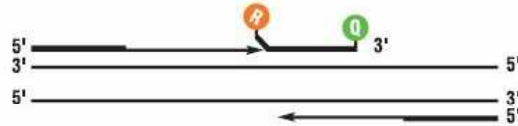
Existem várias abordagens para quantificação de material GM em amostras usando PCR. Em todos os casos, a quantificação por PCR determina a quantidade de DNA GM *versus* uma referência alvo de DNA como o DNA de soja (LIPP et al, 2005). A tecnologia do Real Time-PCR permite o monitoramento da fluorescência associado ao produto de amplificação durante todo o processo da PCR. Esta tecnologia pode ser avaliada com diferentes tipos de fluorescências químicas. São exemplos sondas fluorogênicas (ex.: TaqMan[®], FRET), *Scorpion™ primes* e *SYBR[®]Green* (LIPP et al, 2005). A disponibilidade de vários fluoróforos com comprimentos de onda distintos (como FAM, TET, VIC e JOE) torna possível ensaios multiplex como foi realizado neste trabalho (FAM para detecção do 35S e VIC para detectar a lectina como controle endógeno).

O fluoróforo (TAMRA) é usado como supressor quando a sonda está intacta e o ROX como referência passiva no *mix* da reação (HEID et al., 1996; QUANTITATIVE, 2002). A escolha correta dos fluoróforos é um fator fundamental para que o equipamento não leia também outros componentes do espectro (QUANTITATIVE, 2002).

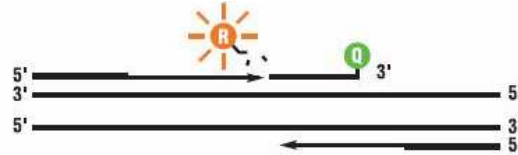
1. Polimerização: Um corante reporter fluorescente(R) e um quelante (Q) são ligados às extremidades 5' e 3' de uma sonda TaqMan®, respectivamente



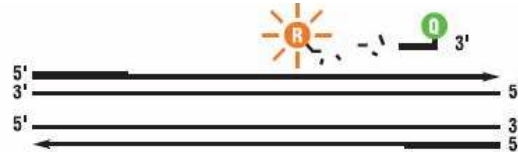
2. Deslocamento da cadeia: Quando a sonda está intacta, a emissão do corante reporter é quelada.



3. Clivagem: Durante cada ciclo de extensão, a DNA polimerase separa o corante reporter da sonda



4. Polimerização completa: Uma vez separada do quelante, o corante reporter emite sua fluorescência característica.



Fonte: SCMS, 2004

Figura 8: Representação das etapas da reação da Real Time-PCR, sistema Taqman®

Na Real Time-PCR é possível a distinção de três diferentes fases: um primeiro estágio latente com flutuações fracas do sinal correspondendo à linha de base ou ruído; uma segunda fase, exponencial; e a terceira fase onde o gráfico atinge um platô (**Figura 9**).

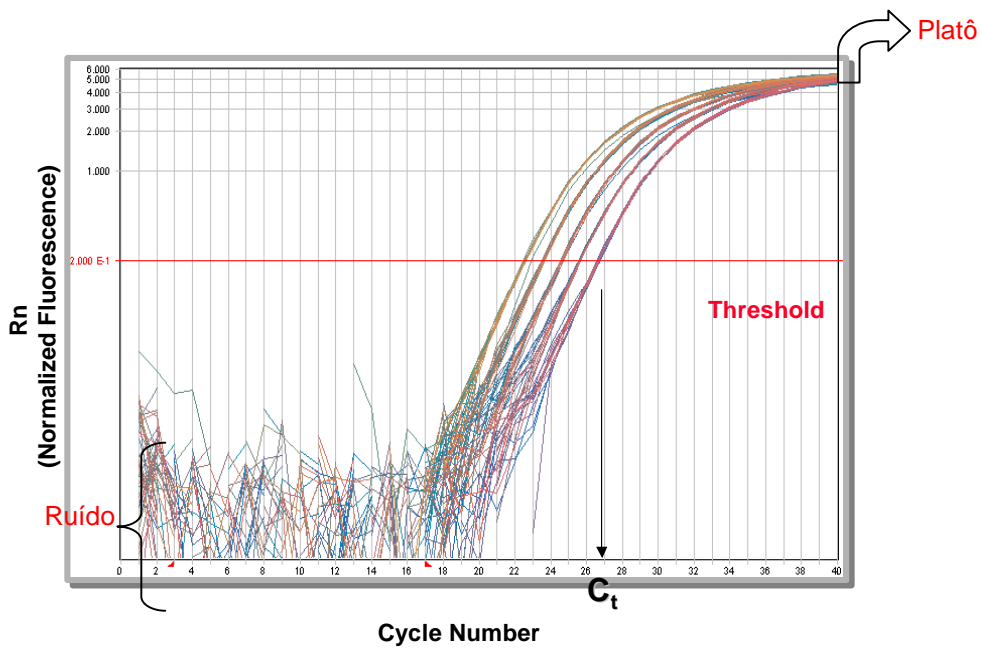


Figura 9: Gráfico de amplificação do Real Time PCR com as fases da reação destacadas

A eficiência da Real Time-PCR reside no fato de que a quantificação não ocorre no final reação (platô), mas no estágio onde o aumento exponencial na quantidade de DNA amplificado atinge um ponto significativamente maior que o ruído. Esta forma de medição aumenta significativamente a precisão da quantificação visto que há uma correlação direta entre a quantidade inicial de DNA e o estágio no qual a amplificação é detectado pelo sistema e mais baixo é valor de Ct. Na prática, a escolha da linha limite, que determina o valor do Ct, dependente do operador, representando um dos elementos subjetivos da Real Time-PCR (WEIGHARDT, 2004).

O método comparativo estabelece a comparação entre a quantidade relativa da seqüência específica com a referência endógena. A curva-padrão é obtida pela leitura de uma série de amostras em diferentes concentrações conhecidas de Materiais de Referência Certificados (MRC) em diferentes concentrações. O resultado é uma única curva-padrão de valores de $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{referência endógena}} - Ct_{\text{OGM}}$) (Figura 10).

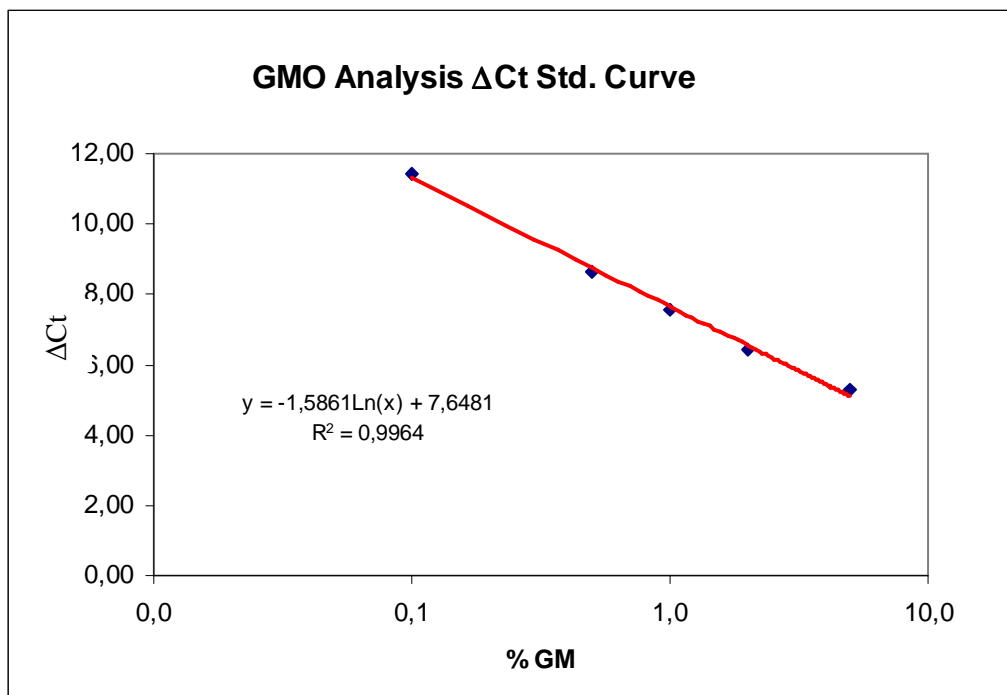


Figura 10: Curva Padrão para determinação do conteúdo de soja RR.

O conteúdo de OGM é obtido pelo cálculo do valor de ΔCt de uma amostra comparando-o com os valores obtidos com os padrões. Para este método ser bem sucedido, a variação da referência endógena e da seqüência específica deveria ser similar. Um método sensível para controlar isto é observar como o ΔCt varia com a diluição do DNA molde. Se as eficiências dos dois amplicons são aproximadamente iguais a curva da análise de regressão (ΔCt versus % OGM em escala logarítmica) deve ser uma reta (inclinação $< 0,1$ ou $R^2 > 0,98$) (QUANTITATIVE, 2002; BROD, 2006; ENGL, 2005).

2 OBJETIVOS:

- Implantar protocolos em biologia molecular para a extração, detecção, identificação e quantificação de alimentos geneticamente modificados;
- Detectar, identificar e quantificar soja RR em alimentos processados;
- Avaliar se alimentos que estão no mercado são ou contém ingredientes alimentares modificados geneticamente de acordo com a legislação brasileira vigente;
- Obter registros para eventuais avaliações/intervenções de Vigilância Sanitária;
- Verificar a adequação da rotulagem à legislação em vigor.

3 METODOLOGIA

3.1.Amostras

As análises foram realizadas em diversos tipos de alimentos como: grãos de soja, sopas desidratadas e enlatadas, extrato de soja em pó, biscoitos, batata frita, salsichas e produtos cárneos, proteínas texturizadas de soja, macarrões instantâneos, misturas de cereais, rações animais, mistura para bolo, sojas crocantes, farinhas de soja, bombons e achocolatados à base de cereais. As amostras foram coletadas em alguns estados brasileiros como Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro no período de 2001 a 2005 e chegaram ao setor de biologia Molecular nas modalidades de análises: fiscal, orientação ou especial.

3.2.Preparo de amostra

O preparo da amostra é um ponto crítico neste método, envolve as etapas de pesagem, trituração, eliminação de possíveis contaminantes (drenagem de salmouras, retirada de películas de embutidos, etc) e homogeneização. Por isso todos os procedimentos devem ser realizados sob rigorosas condições de assepsia ambiental e dos equipamentos para evitar a contaminação acidental das amostras em análise. As etapas de pesagem, trituração e extração de DNA foram realizadas em três ambientes separados fisicamente. É necessário o uso obrigatório de jaleco e luvas descartáveis, que devem ser trocadas após cada etapa de pesagem, trituração e extração. A limpeza da embalagem da amostra foi realizada com auxílio de gaze embebida em álcool a 70%, deixando secar antes de abrir. Todas as partes removíveis dos moinhos foram lavadas, primeiro com detergente neutro e água corrente e depois com água sanitária a 10%, finalizando com água destilada. As espátulas foram expostas, antes da pesagem, à luz ultravioleta durante 15 minutos

O preparo da amostra é um dos fatores que depende uma eficiente extração de DNA. Aspectos da amostra como dimensão, estado físico, composição, devem ser observados. Portanto, o conhecimento sobre o processamento do alimento é fundamental. O preparo da amostra objetiva uma trituração até obtenção de pó seco e fino e/ou homogeneização perfeita.

Alimentos secos em pó como farinhas, extratos, pós para preparo de alimentos foram transferidos para sacos plásticos e homogeneizados manualmente por inversão 50 vezes.

Alimentos sólidos com baixo teor de umidade como biscoitos, massas, sopas desidratadas, grãos e rações para animais foram triturados até a obtenção de um pó fino e transferidos para saco plástico para serem homogeneizados manualmente por inversão 50 vezes.

Alimentos sólidos com alto teor de umidade como produtos cárneos, alimentos congelados, alimentos em conserva foram triturados em liquidificador e transferidos para saco plástico para serem homogeneizados manualmente por inversão 50 vezes.

Alimentos líquidos como sucos a base de frutas foram transferidos em alíquotas de 1 mL para microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos em centrífuga não refrigerada. O sedimento foi utilizado para proceder à extração..

O preparo das alíquotas das amostras para análise foram realizadas em triplicata, pesadas em microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, contendo 100 a 300 mg da amostra homogeneizada.

No caso da extração do material de referência, foi pesado 100 mg do material em microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL.

3.3.Extração de DNA

A implantação do método de extração objetivou um protocolo padronizado que atendesse à diferentes matrizes de alimentos.

O método de escolha foi o CTAB que utiliza o hexadecil-trimetil brometo de amônio como detergente no tampão de extração, porém o protocolo foi estabelecido com algumas modificações como podem ser vistas a seguir:

De 100 a 300 mg da amostra são transferidos para tubo tipo eppendorf de 1,5 ml (em triplicata) e adicionados 1000 µL de tampão CTAB (0,1M Tris-HCl, 20 g/L CTAB, 1,4 NaCl, 20 mM EDTA, pH 8,0) e misturados. Após incubação a 65°C por 60 min, com ocasional homogeneização, a suspensão foi centrifugada a 14 000g por 10 min e 500 µL do sobrenadante foi misturado a 200 µL de clorofórmio e centrifugado pelo mesmo tempo e velocidade anteriores. A fase superior foi transferida para outro tubo, misturada com o dobro de volume de solução de precipitação (5g/L CTAB, 0,04 M NaCl) e incubado por 60 min a temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 350 µL de NaCl 1,2 M. Então, 350 µL de clorofórmio foram adicionados, misturados por 30 segundos e novamente centrifugados. A fase superior foi misturada com o mesmo volume de isopropanol gelado e deixado por volta de 16 horas a -20°C. Após centrifugação (10 min, 14000g a 4°C), o DNA precipitado foi ressuspensão em 50 µL de água livre de Dnase e Rnase e estocado a 4°C até ser utilizado (CARDARELLI, et al., 2005).

O material de referência utilizado foi extraído de 100 mg de material pelo mesmo método e ressuspensão em 100 µL de água livre de Dnase e Rnase.

A presença e integridade do DNA extraído são testadas através de corrida de eletroforese em gel de agarose 0,7% com brometo de etídio 5mg/mL, em tampão TBE 1X pH 8,0. São aplicados 5 µL de DNA diluídos em mesma água utilizada para ressuspender DNA e 2 µL de tampão de corrida.

3.4.Detecção de DNA

Como já foi mencionado, substâncias contidas no alimento, como proteínas, gorduras, polissacarídeos, polifenóis, açúcar caramelizado entre outros, podem inibir a ação da DNA polimerase (AHMED, 2002). Por isso é fundamental a utilização de controles de qualidade para evitar falso-negativos. Esses controles avaliam a qualidade do DNA extraído e são representados por genes conservados de plastos

ou genes específicos da soja como o gene *lec 1* da lectina de soja (HOLST-JENSEN et al., 2003).

As sequências dos pares de iniciadores utilizados e o tamanho dos fragmentos esperado são os seguintes:

Actina (**BRASIL, 2001**)→ 650 pb para soja

ACT-F 5' – GAT CTG GCA TCA CAC CTT CTA C – 3'

ACT-R 5' – AGG AAG CTC GTA GCT CTT CTC – 3'

Lectina (**MEYER, 1996**)→118 pb / iniciadores GMO3/GMO4

GMO3 5'- GCCCTCTACTCCACCCCATCC – 3'

GMO4 5'- GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG- - 3'

3.5. Detecção de OGM pela PCR

A maioria dos OGM aprovados para uso alimentar possui seqüências comuns, como o promotor 35S, proveniente do vírus do mosaico da couve-flor CaMV, o terminador NOS, proveniente do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* e genes de resistência a antibióticos (HOLST-JENSEN et al., 2003).

Na Detecção de OGM, 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 (MEYER, 1999). Se o resultado for positivo, uma PCR qualitativa específica, para identificação deve ser realizada.

As sequências dos pares de iniciadores utilizados e o tamanho do fragmentos esperados foram os seguintes (**Figura 10**):

- **Promotor 35S:**

35S-1/ 35S-2 (LIPP et al, 1999)→195 pb

35S-1 5' – GCT CCT ACA AAT GCC ATC A – 3'

35S-2 5' – GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA – 3'

35S-CF3/ 35S-CR4 (LIPP et al, 2001)→123 pb

35S-CF3 5' – CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG – 3'

35S-CF4 5' – TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C – 3'

- **Terminador nos:**

HA-nos/ 118-FHA (LIPP et al, 2001)→ 118 pb

HA-NOS 5' – GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG – 3'

118-FHA 5' – GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC – 3'

nos-1/nos-3 (LIPP et al, 1999)→ 180pb

nos –1 5' - GAATCCTGTTGCCGGTCTTG – 3'

nos –3 5'-TTATCCTAGTTTGCGCGCTA – 3'

3.6. Identificação de soja tolerante ao herbicida glifosato pelo método da PCR *nested*

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. um método que melhora a seletividade e sensibilidade da reação (ZIMMERMANN, 1998), permitindo que baixos níveis de OGM sejam detectados.

Pares de iniciadores foram desenhados para amplificar especificamente fragmentos cobrindo a junção entre os seguintes elementos genéticos: o promotor CaMV 35S, a seqüência codificadora do peptídeo de endereçamento ao cloroplasto CTP e o gene codificador da CP4-EPSPS (**Figura 11**).

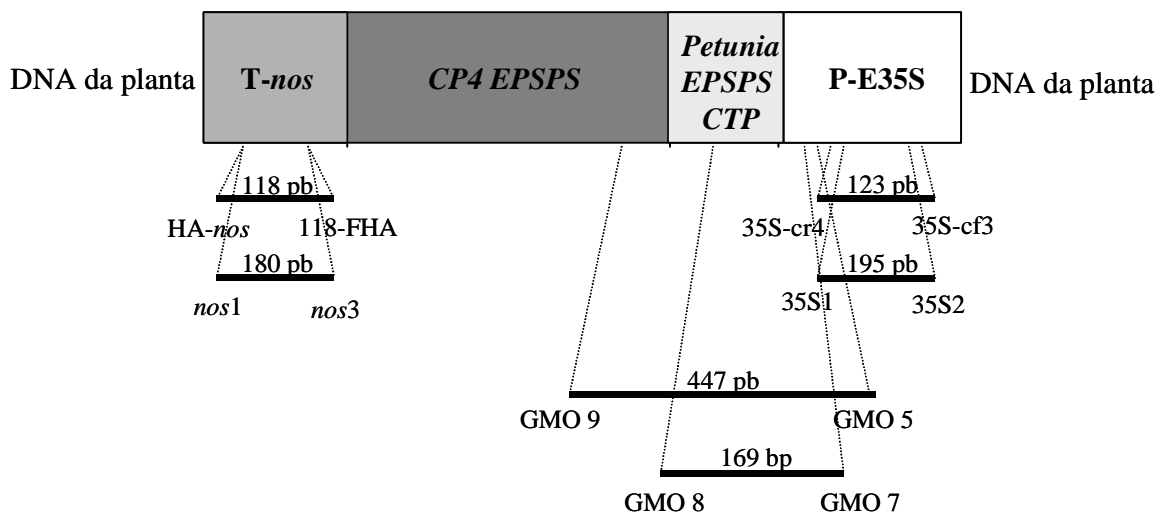


Figura 11: Representação gráfica das regiões de amplificação

As sequências dos pares de iniciadores utilizados e o tamanho dos fragmentos esperados foram os seguintes (MEYER et al, 1997):

- **1ª etapa – GMO9(F)/GMO5(R) → 447 pb**
 GMO9 5'- CATGAAGGACCGGYGGGAGAT-3'
 GMO5 5'- CCACTGACGTAAGGGATGACG – 3'
- **2ª etapa – GMO8(F)/GMO7(R) → 169 pb**
 GMO8 5'- TGGGGTTTATGGAAATTGGAA -3'
 GMO7 5'- ATCCCACTATCCTTCGCAAGA - 3'

3.7. Condições da PCR

As reações de amplificação ocorreram em um volume final de 25 µL contendo tampão de PCR 1X (20mM Tris-HCl , pH 8,4, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂ , 0,16 mM de cada dNTP, 0,24 µM de cada iniciador, 1 unidade de *Taq* DNA polymerase e 2 µL de DNA. As amplificações foram realizadas em um termociclador “GeneAmp PCR System 2400 – Appied Biosystems” com os seguintes programas: **ciclo OGM-lectina** para os iniciadores OGM3/OGM4: desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguida de 40 ciclos de 95°C por 30s, 63°C por 30 s, e 72°C por 30 s, extensão final a 72°C por 3 min; **ciclo OGM-1** para os iniciadores ACT-F/ACT-R, 35S-1/35S-2 e nos-1/nos-2: desnaturação inicial a 94°C por 3 min seguida de 40 ciclos de 94°C por 20s, 54°C por 40 s, e 72°C por 1 min, extensão final a 72°C por 3 min; **ciclo OGM-2** para os iniciadores p35S-cf3/35S-cr4 e HÁ-nos 118-f/HÁ-nos 118-r : desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguida de 50 ciclos de 95°C por 25s, 62°C por 30 s, e 72°C por 45 s, extensão final a 72°C por 7 min; **ciclo nested.soja1** para os iniciadores

GMO5/GMO9: desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, e 72°C por 40 s; extensão final a 72°C por 3 min. Após amplificação com os iniciadores GMO5/GMO9, 1 µL do produto da PCR foi utilizado como molde na *nested* PCR com os iniciadores GMO7/GMO8 e as mesmas condições de reação por 35 ciclos.

3.8. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR (12 µL da reação + 2 µL do tampão corado) foram separados por eletroforese a 400 mA e 80 V por 30 min + 100V por 1,5h em gel de agarose 2%, tampão TBE 1X corado com brometo de etídio. A visualização ocorreu em transluminador UV e as imagens foram fotografadas no analisador de imagens “ImageMaster – VDS – Pharmacia Biotech”.

3.9. Critérios de aceitação na interpretação de resultados

Para a reação ser considerada válida, é necessário que existam bandas específicas e de tamanho esperado nos perfis de eletroforese da amostra e do controle positivo (Material de Referência Certificado) e ausência desta banda no controle negativo (Material de Referência Certificado).

A fim de certificar-se da não contaminação dos reagentes utilizados na extração e no preparo da solução de PCR, foram utilizados Controles dos Reagentes de Extração (CRE) e Controles dos Reagentes do *Mix* (CRM), que correm em paralelo ao ensaio, porém sem a amostra e o DNA da amostra, respectivamente.

Materiais de Referência apropriados para controle positivo e negativo fornecem a base para a validação de procedimentos analíticos e para avaliar a performance de métodos e laboratórios (AHMED, 2002). Os Materiais de Referência Certificados (MRC) mais utilizados atualmente são aqueles produzidos pelo Institute of Reference Materials and Measurements, IRMM, Bélgica (ANKLAM, 2002).

O número de MRC comercialmente disponíveis é limitado e não existem MRC acessíveis a GMO não autorizados. Por isso, novas estratégias para aumentar a avaliação de materiais de referência tem sido explorado, incluindo o uso de material de produtos contaminados (HOLST-JENSEN et al., 2003) e desenvolvimento de plasmídios como material de referência (TAVERNIERS et al., 2001; KURIBARA et al., 2002). Aspectos como ploidia, zigotose, degradação e qualidade do DNA são importantes na produção e escolha do material e referência (CORBISIER, et al., 2002).

3.10. Quantificação de OGM por PCR em Tempo Real

Neste trabalho foi utilizado o sistema TaqMan[®] que utiliza a atividade exonucleásica 5'→3' da *Taq* DNA polimerase para produzir um sinal fluorescente. A sonda é constituída por um oligonucleotídeo, com seqüência de nucleotídeo homóloga à seqüência específica de uma das fitas do amplicon, um fluoróforo que emite fluorescência (*reporter*) e um supressor corespondente (*quencher*). O *quencher* absorve a fluorescência do fluoróforo *reporter* e quando estão próximos não há emissão de sinal fluorescente. Durante a etapa de extensão, a sonda é clivada pela atividade exonucleotídica da polimerase, fazendo com que a emissão fluorescente do *reporter* não seja mais transferida eficientemente para o supressor, resultando em um aumento no espectro de emissão do *reporter* (GARCIA-CAÑAS, 2004; HEID et al., 1996; QUANTITATIVE, 2002).

A emissão foi medida pelo equipamento Sequence Detection System ABI-Prism 7500, também denominado "Real Time Detection System" da Applied Biosystems (**Figura 11**) e o TaqMan[®] GMO Soy 35S Detection Kit, que realiza uma reação de PCR multiplex para os genes da lectina e do promotor 35S derivado do CaMV (VAÏTILINGOM, 1999).



Figura 12: Equipamento “Sequence Detection System ABI-Prism 7500” da Applied Biosystems

Os dados processados pelo equipamento são registrados em um gráfico de amplificação. Os valores de fluorescência são representados por ΔR_n ($\Delta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$), onde R_{n+} = intensidade da emissão do *reporter*/intensidade da emissão do supressor a qualquer tempo em um tubo de reação, e R_{n-} = intensidade da emissão do *reporter*/intensidade da emissão do supressor medido previamente à amplificação no mesmo tubo da reação e plotados no eixo y, *versus* o nº de ciclos plotado no eixo X.

O conteúdo de OGM de uma amostra pode ser determinado através da geração de duas curvas-padrão (referência endógena e seqüência específica) baseadas nas quantidades diferentes de DNA ou através de método comparativo do Ct ($\Delta\Delta C_t$) utilizado no presente trabalho.

A análise de quantificação por PCR em Tempo Real foi realizada em todas as amostras que, após análise qualitativa, contiverem soja geneticamente modificada em sua composição.

As reações de amplificação ocorreram em um volume final de 25 μ L: 22 μ L de “TaqMan GMO 35S Soy PCR Mix”, 0,5 μ L de “AmpliTaq Gold DNA Polimerase e 2,5 μ L de DNA ou do controle positivo ou negativo. As amplificações foram realizadas com as seguintes especificações de termociclagem: desnaturação a 94°C por 9 min seguida de 45 ciclos de 95°C por 20s e 60°C por 60 s.

Finalizada a termociclagem, os valores da “baseline” e “threshold” são ajustados manualmente e a corrida é analisada. Os dados são então, exportados para o programa “Excel” e os valores podem ser obtidos (**Tabela 4**).

Tabela 4: Exemplo de planilha obtida durante a determinação do conteúdo de soja RR

<u>Well</u>	<u>GMO Ct</u>	<u>Reference Ct</u>	<u>ΔCt</u>	<u>sample name</u>	<u>mean ΔCt</u>	<u>stdev ΔCt</u>	<u>%GMO</u>
B7	35,76	26,13	9,63	0,00	9,35	0,40	0,09
B8	36,04	26,97	9,07	0,00			
B9	32,87	26,81	6,06	0,01	6,01	0,07	0,76
B10	33,07	27,11	5,96	0,01			
B11	32,03	27,18	4,85	0,02	4,76	0,13	1,67
B12	32,5	27,84	4,66	0,02			
C1	38,89	35,19	3,70	373,10	4,28	0,82	2,25
C2	38,35	33,49	4,86	373,10			
C3	42,36	39,15	3,21	1783,10	3,01	0,29	5,01
C4	42,81	40,01	2,80	1783,10			
C5	40,16	33,69	6,47	1783,20	6,48	0,01	0,57
C6	40,02	33,54	6,48	1783,20			
C7	39,8	33,18	6,62	1783,30	6,85	0,32	0,45
C8	40,92	33,85	7,07	1783,30			
D1	Undetermin	42,02	#VALOR!	2112,10	#VALOR!	#VALOR!	
D2	43,71	38,99	4,72	2112,10			
D3	41,56	36,38	5,18	2112,20	5,59	0,58	0,99
D4	40,96	34,96	6,00	2112,20			
D5	42,24	37,32	4,92	2112,30	4,73	0,27	1,70
D6	41,24	36,7	4,54	2112,30			
D7	40,7	27,88	12,82	1917,10	12,71	0,16	0,01
D10	42,61	28,92	13,69	1917,20			
D11	43,69	30,27	13,42	1917,30	12,48	1,34	0,01

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 170 amostras: soja em grão (29), bebidas e pós para bebidas (34), ração (6), proteína, farinha e fibra de soja (7), sopas desidratadas (17), sopas em lata (2), produtos cárneos (16), carne vegetal (5), massas (5), biscoitos, batata frita e snack (8), pós para preparo de alimentos (11), mistura de cereais (5), soja frita (9), farinha de trigo (16), perfazendo um total de 75 marcas comercializadas no Brasil (**Tabela 5**). Das 170 amostras, em 161 foi detectada a presença do gene da lectina, confirmando a presença de soja nos produtos. Em 64 produtos foi identificado o gene da soja RR, onde 27 continham teor acima de 1% (**Figura 13**).

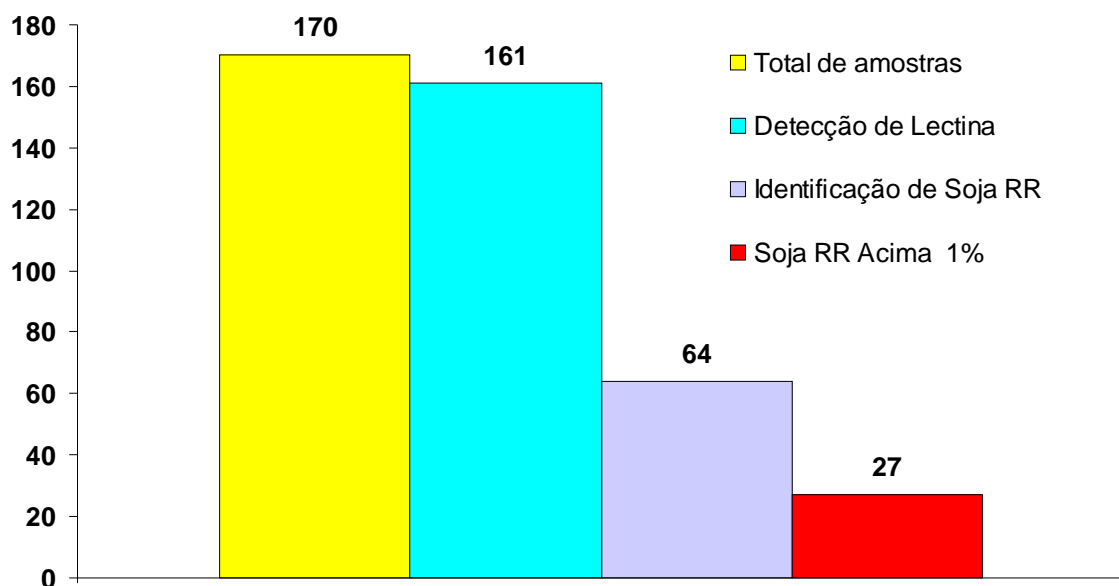


Figura 13: Representação gráfica dos resultados obtidos nas análises.

As extrações de DNA foram realizadas em triplicata e a presença de DNA de soja amplificável foi testada utilizando o par de iniciadores GMO3/GMO4 que amplifica um fragmento de 118 bp (MEYER, 1996) do gene da lectina de soja. Para as amostras que não apresentaram DNA amplificável com os iniciadores para lectina, utilizou-se iniciadores para actina (BRASIL, 2001), pois alguns alimentos podem apresentar resultado falso-negativo por não conter DNA de soja (**Figura 14**).

A escolha do método de extração mais apropriado para análises de rotina deve abranger técnica simples, baixo custo e ser segura (TERRY et al., 2002). A extração de DNA utilizando CTAB mostrou-se eficiente para 161 das 170 amostras analisadas.

Alguns autores estudaram vários métodos de extração (TERRY et al., 2002; PEANO et al., 2004; ZIMMERMANN et al., 1998; DI PINTO et al., 2007; SMITH and MAXWELL, 2007). Porém, no caso da extração e purificação a partir de uma matriz complexa, o método CTAB é mais recomendado que os baseados em resinas ligantes de DNA (OLEXOVÁ et al., 2004)

Todas as amostras que apresentaram DNA amplificável de soja foram submetidas à etapa de detecção de Organismos Geneticamente Modificados.



Figura 14: Gel de agarose mostrando fragmentos de amplificação de lectina de 118bp utilizando iniciadores GMO3/GMO4

1 e 7: Peso molecular 123 bp DNA Ladder GIBCO-BRL; 2 e 6: Controle dos reativos; 3: Controle negativo para soja (milho BT-176 0,5%); 4: Controle positivo para soja (soja RR, 0%); 5: Amostra de alimento que contém soja; 6: Amostra de alimento que não contém soja.

A DETECÇÃO DE OGM foi realizada através da amplificação por PCR do gene promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e do terminador nopalina sintase da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. A visualização de fragmentos de 195 bp, 123 bp, 180 bp 118 bp usando os iniciadores 35S1/S2, P35S-cf3/cr4, HÁ-nos 118f / HÁ-nos 118r e nos-1/nos3, respectivamente, demonstraram a presença desses elementos genéticos. Os iniciadores p35S-cf3/p35S-cr4 e HA-nos 118-f/HA-nos 118-r são recomendados para análise de alimentos processados (Figura 15).

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. O promotor está presente em aproximadamente 75% dos OGM comerciais (KOK et al., 2000), fato que facilita bastante a detecção destes organismos. A principal desvantagem deste método é a ocorrência de falso-positivos, uma vez que essas sequências comuns também ocorrem naturalmente em algumas plantas e microrganismos do solo. Plantas da família das crucíferas, como brócolis, couve-flor, mostarda, entre outros, podem estar infectadas com o vírus do mosaico da couve-flor (CaMV).

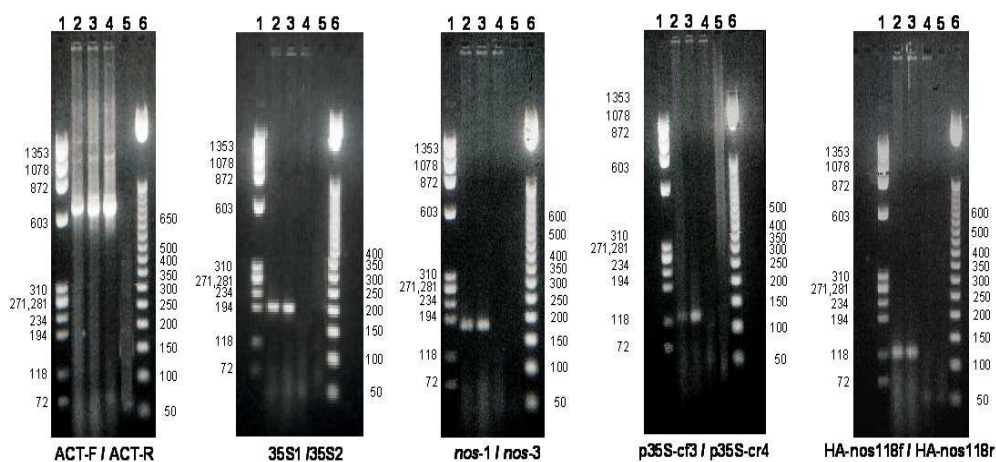


Figura 15: Géis de agarose apresentando diferentes fragmentos de amplificação de acordo com os iniciadores utilizados na DETECÇÃO.

1: Peso molecular ϕ X 174; 2: Padrão de farinha de soja a 1% de OGM; 3: Amostra de alimento que contém OGM; 4: Padrão de farinha de soja a 0% de OGM; 5: Controle dos reativos; 6: Peso molecular de 50 pares de bases.

As amostras que apresentaram resultado positivo no método de DETECÇÃO de OGM, foram submetidas à IDENTIFICAÇÃO DE SOJA RR por *nested* PCR.

A visualização de fragmentos de 169 bp confirmou a presença de soja RR nos seguintes produtos: soja em grão (7/29), bebidas e pós para bebidas (15/34), ração (3/6), proteína, fibra e farinha de soja (5/7), produtos cárneos (6/16), carne vegetal (1/5), sopas desidratadas (6/18), massas (1/5), pós para preparo de alimentos (9/11) e farinha de trigo (11/16) (**Figura 16**).

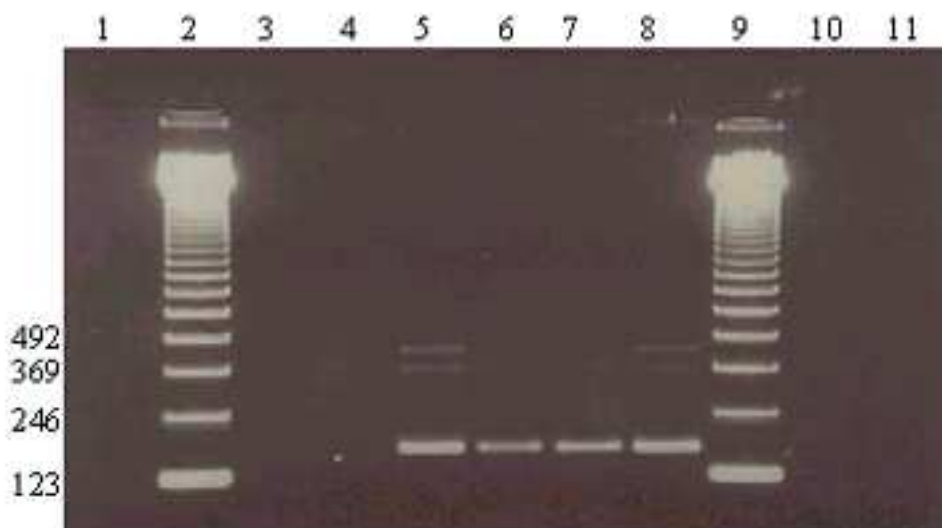


Figura 16: Gel de agarose apresentando fragmentos de amplificação de 169 bp pela *nested* PCR

2 e 9: Peso molecular 123-bp DNA Ladder GIBCO-BRL; 3: Controle dos reativos; 4: Controle de soja-GM negativo (soja RR, 0%); 5: Controle de soja-GM positivo (soja RR, 0,1%); 6, 7 e 8: Amostra de alimento que contém soja RR.

A vantagem da IDENTIFICAÇÃO por *nested* PCR é a elevada especificidade, uma vez que se ocorrer a amplificação de um fragmento falso-positivo pelo primeiro par de iniciadores, a probabilidade de sequências específicas ser amplificada é muito baixa.

Sessenta (60) amostras positivas para soja RR por *nested* PCR foram quantificadas, onde 33 continham teores abaixo de 1%. Vinte e sete (27) amostras continham teores acima de 1% de soja RR, devendo assim, ser rotuladas.

Tabela 5: Resultado de amplificação, detecção, identificação e quantificação das amostras analisadas

Produtos analisados	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas com DNA amplificável/ amostras analisadas	Nº de amostras positivas na DETECÇÃO DE OGM / amostras analisadas	Nº de amostras positivas na IDENTIFICAÇÃO de soja RR / amostras analisadas	Percentual de positividade das amostras para soja RR	Nº de amostras que possuem soja RR acima de 1%
Soja em grão	29	29/29	6/27	7/9	24,13% (7/29)	1
Bebidas e pós p/ bebidas	34	31/34	13/28	15/18	48,38% (15/31)	2
Ração	6	6/6	3/6	3/3	42,85% (3/6)	1
Ptn, farinha e fibra de soja	7	7/7	3/4	5/7	71,42% (5/7)	0
Sopas desidratadas	17	15/17	9/16	6/12	40% (6/15)	3
Sopas em lata	2	2/2	0/2	0/1	0%	0
Produtos cárneos	16	15/16	6/14	6/7	40% (6/15)	0
Produtos com carne vegetal	5	5/5	0/3	1/5	20% (1/5)	0
Massas	5	5/5	1/5	1/4	20% (1/5)	0
Biscoitos, salgadinhos de batata e snacks	8	8/8	0/8	0/3	0%	0
Pós p/ preparo de alimentos	11	11/11	2/3	9/10	81,81% (9/11)	8
Mistura de cereais	5	4/5	0/4	0/1	0%	0
Soja frita	9	9/9	0/9	0/1	0%	0
Farinha de Trigo	16	14/16	4/7	11/15	85,71% (12/14)	12
Total	170	161	44	64	39,26%	27

É importante ressaltar que a metodologia foi implementada por etapas. De modo que ao estabelecer a metodologia de identificação, as amostras analisadas recentemente foram suprimidas da etapa de detecção. Este fato se reflete no número maior de amostras testadas por *nested* PCR que por detecção dos fragmentos do 35S e do *nos*, como foi demonstrado na **tabela 5**.

Foram analisadas vinte e nove (29) amostras de “**soja em grão**” de dezessete (17) marcas diferentes. Seis amostras tiveram resultado positivo com o método de DETECÇÃO DE OGM. Sete amostras tiveram resultado positivo para presença de soja RR e uma estava acima de 1% (**Figura 17-A**).

Através dos resultados das amostras de soja em grãos, observa-se que antes de 2003, ano em que o plantio e a comercialização foram autorizados, apenas uma amostra apresentou resultado positivo (acima de 1%) para soja RR e esta amostra foi realizada a pedido do Ministério Público de Santa Catarina e coletada numa plantação com suspeita de ser transgênica. Após 2003, os resultados mostraram-se bastante diferentes, 6 de 14 amostras (42,85%) apresentaram resultado positivo para soja RR, porém nenhuma destas estava acima de 1%, não necessitando, portanto, de rotulagem.

Os produtos analisados como “**bebidas e pós para bebidas**” compreenderam sucos de frutas a base de soja (9), alimento a base de soro de leite e proteína de soja (3), fórmula infantil a base de proteína isolada de soja (5), alimento para dieta (2), alimento a base de soja (2), pó para preparo de bebidas sabor banana (1), extrato de soja (11) e alimento à base de extrato de malte (1).

Três amostras apresentaram resultado negativo para lectina: dois sucos e o alimento a base de extrato de malte, não sendo realizado o método de DETECÇÃO. Treze amostras apresentaram resultado positivo na etapa de DETECÇÃO DE OGM. Três foram submetidas ao método de IDENTIFICAÇÃO DE OGM sem contudo serem submetidas ao método de DETECÇÃO. Todas as amostras que apresentaram resultado positivo no teste de DETECÇÃO foram identificadas como contendo soja RR juntamente com as três que foram submetidas somente ao método de IDENTIFICAÇÃO. Duas amostras (alimento a base de soja e alimento para dieta) que tiveram resultados negativos para DETECÇÃO foram submetidas ao método de IDENTIFICAÇÃO, apresentando resultados negativos também nesta etapa (**Figura 17-A**).

Com os benefícios atribuídos à soja e o incentivo ao consumo pela mídia, novos produtos a base de soja estão surgindo. Já encontra-se nas prateleiras de supermercados produtos como creme de soja em substituição ao creme de leite, sorvetes, iogurtes, biscoitos, almôndegas, empanados, bebidas a base de soja disponíveis em embalagens do tipo “TETRA PAK” com diversos sabores e diferentes marcas, nas quais encontram-se em sua composição extrato de soja ou proteína isolada de soja.

O uso de matéria-prima de alta qualidade na produção de alimentos é considerada um pré-requisito para se obter um produto genuíno, seguro e de valor nutricional adequado (PEANO, et al., 2004).

O Regulamento Técnico, elaborado pela ANVISA, para produtos protéicos de origem vegetal, fixa a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer produtos como extrato, proteína e farinha de vegetais de acordo com o teor protéico mínimo (RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005). No entanto, não existe legislação específica para os produtos a base de soja e seus derivados, principalmente quanto aos Padrões de Identidade e Qualidade.

Alguns trabalhos utilizam a PCR para questão da autenticidade de produtos (cárneos, peixes e livres de glúten) como fraudes e uso de matérias-primas em substituição às de elevado valor (SUN e LIN, 2003; SAWYER et al., 2003; OLEXOVÁ, et al.2006). Deve-se considerar trabalhos deste tipo para produtos de soja, pois são produtos oferecidos a preço mais elevado quando comparados aos de origem animal e oferecidos muitas vezes em substituição ao leite de vaca para crianças com intolerância à lactose, pessoas com nível elevado de colesterol ou mesmo mulheres com déficit hormonal.

Foram analisadas 6 amostras de **rações** (quatro para gatos e duas para cães) de duas marcas diferentes. Todas as rações analisadas apresentaram resultado positivo para soja e três (50%) apresentaram resultado positivo para soja RR (duas para gatos e uma para cães). Todas as rações analisadas possuem como ingredientes milho e soja e este está presente na forma de farelo ou farinha.

Uma ração para gatos demonstrou presença de soja RR acima de 1%, devendo, portanto, ter em seu rótulo o símbolo e a expressão “contém soja transgênica”, já que o decreto nº 4680 regulamenta o direito à informação quanto

aos alimentos destinados também ao consumo animal (BRASIL, 2003 a) (**Figura 17-A**). Ambas apresentaram resultado positivo para lectina e negativo tanto para DETECÇÃO quanto para IDENTIFICAÇÃO.

Dos 16 “**produtos cárneos**” analisados, quinze (93%) continham soja e nove (56%) apresentaram soja RR em sua composição. Seis amostras foram quantificadas, porém todas estavam abaixo de 1%, não necessitando de rotulagem (**Figura 17-B**).

BROD, 2006 realizou um estudo em Santa Catarina analisando quarenta amostras: aditivos cárneos que continham proteína de soja em sua composição (18), proteína de soja utilizada como ingrediente (14) e produtos cárneos processados (8) e demonstraram presença de soja RR em 45% delas.

Foram analisadas cinco amostras de “**Produtos com carne vegetal**”: salsicha vegetal (1), carne vegetal (1), empanado (1) e almôndega (2). Todas são de mesma marca e possuem em sua composição proteína texturizada de soja. Todas as amostras apresentaram resultado positivo para o gene de lectina. Duas amostras foram submetidas à IDENTIFICAÇÃO sem contudo serem detectadas. Apenas uma amostra (almôndega) apresentou resultado positivo na IDENTIFICAÇÃO, não necessitando, no entanto, de rotulagem (**Figura 17-B**).

Foram analisadas cinco amostras de “**mistura de cereais**”. Quatro apresentaram resultado positivo para lectina, porém nenhuma amostra apresentou resultado positivo na DETECÇÃO e na IDENTIFICAÇÃO (**Figura 17-B**).

Nove amostras de “**soja frita**” foram analisadas, nos sabores de ervas finas, natural, churrasco e laranja com mel e cenoura, em um total de cinco marcas diferentes. Todas apresentaram resultado positivo para lectina, porém nenhuma amostra apresentou resultado positivo na DETECÇÃO e na IDENTIFICAÇÃO (**Figura 17-C**).

A farinha de trigo é um dos principais ingredientes no preparo de pães, bolos, biscoito, massas, salgadinhos, etc, presente, portanto, na maioria das refeições.

Foram analisadas 16 amostras de “**farinha de trigo**” de 10 marcas diferentes. Quatorze amostras apresentaram resultado positivo para o gene da lectina, mostrando a presença de soja nestes produtos, e doze (12) amostras apresentaram

resultado positivo para soja RR, indicando presença de soja geneticamente modificada. Todas as amostras positivas para soja RR necessitavam de rotulagem por estarem acima do valor permitido (**Figura 17-C**).

A Instrução normativa nº 08, de 02 de junho de 2005 define as características de identidade e qualidade da farinha de trigo, aplicável a farinha de trigo orgânica, não-orgânica e a que for proveniente de trigo geneticamente modificado e conceitua farinha de trigo como o produto elaborado com grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) ou outras espécies de trigo do gênero *Triticum*, ou combinações por meio de trituração ou moagem e outras tecnologias ou processos. No item 4, do mesmo documento, referente aos “requisitos gerais”, estabelece a não permissão da comercialização de farinha de trigo que apresentar características macroscópicas, microscópicas, microbiológicas e substâncias nocivas à saúde acima dos limites estabelecidos por legislação específica vigente (BRASIL, 2005 a).

Na Portaria nº 354 de 18 de julho de 1996 (revogada), a farinha de trigo era classificada de acordo com seu uso e era permitido o uso de farinha de fava ou de soja enzimaticamente ativa até um máximo de 1% como ingrediente opcional. Já na Instrução Normativa nº 08 de 2005, a classificação é dividida em 3 tipos, de acordo com os limites de tolerância. Para a farinha de trigo adicionada de outros vegetais, a denominação de venda deverá estar identificada na rotulagem de forma clara com a expressão “Farinha de trigo com + o nome comum da espécie adicionada” (BRASIL, 1996 e BRASIL, 2005 a).

Como foram apresentados nos resultados, 87,5% das amostras de farinha de trigo analisadas apresentaram soja em sua composição e 85,71% destas amostras apresentaram soja RR. O uso da soja no processamento da farinha de trigo (lipoxigenase) já é bem estudado e muito comum como melhoramento da atividade reológica da massa (ARAÚJO et. al.,1996).

A soja utilizada no processamento do trigo é considerada como coadjuvante de fabricação, no processo de branqueamento, não sendo obrigatório a declaração no rótulo da farinha de trigo. Porém, não existe controle na quantidade adicionada. E como se trata de um grão de custo menor do que o trigo, a soja pode estar sendo utilizada para adulterar o trigo como ingrediente de menor valor. Portanto, a presença de soja nas duas amostras analisadas de farinha de trigo integral permanece sem explicação.

Como exemplo da amplitude desta falta de informação, sabe-se que doenças alérgicas representam um problema de saúde pública, atingindo mais de 20% da população. Estima-se que 10% da população humana seja hipersensível a determinadas substâncias presentes em alimentos. A soja faz parte do grupo de alimentos com maior registro de casos de alergia. A recomendação médica básica é evitar o consumo desses alimentos, mas como os consumidores poderão selecionar produtos como a farinha de trigo, por exemplo, que não fornecem informações adequadas quanto aos ingredientes utilizados (Gazzoni, 2005; ASBAI, 2005)

Cinco (5) amostras de **Proteína Vegetal Texturizada** (PVT), uma (1) **farinha de soja tostada e moída** e uma (1) **fibra de soja** foram analisadas. Todas apresentaram resultado positivo para o gene da lectina. Cinco amostras (71%) apresentaram resultado positivo na IDENTIFICAÇÃO. Uma PVT e a farinha de soja tostada e moída apresentaram resultado negativo na IDENTIFICAÇÃO. Nenhuma amostra necessitava de rotulagem. Oito amostras continham farinha de trigo em sua composição (**Figura 17-A**).

Foram analisadas dezessete (17) “**sopas desidratadas**” de cinco marcas diferentes. Doze amostras continham soja ou seus derivados em sua composição. Destas, cinco (5) continham farinha de trigo além da soja. E cinco continham somente farinha de trigo. No entanto, quinze amostras apresentaram resultado positivo para lectina (todas as amostras que continham farinha de trigo, apresentaram resultado positivo). Nove apresentaram resultado positivo na DETECÇÃO (quatro amostras continham somente farinha de trigo). E somente seis apresentaram resultado positivo na identificação (quatro amostras continham somente farinha de trigo). Quatro amostras foram quantificadas. (três amostras quantificadas que continham somente trigo, todas três apresentaram resultado acima de 1%) Destas, três apresentaram valor acima de 1% (**Figura 17-A**).

Foram analisadas duas (2) “**sopas em lata**” de mesma marca, porém de sabores diferentes, aspargos e cogumelo. Em suas composições haviam , respectivamente, proteína de soja isolada, farinha de trigo e proteína concentrada de soja e farinha de trigo, dentre outros ingredientes (**Figura 17-A**).

As amostras de “**massa**” compreenderam macarrão instantâneo (2) e macarrão instantâneo em copo (3). Todas as amostras apresentaram resultado positivo para lectina, porém somente uma apresentou resultados positivos na

DETECÇÃO e IDENTIFICAÇÃO. A QUANTIFICAÇÃO não foi realizada (**Figura 17-B**).

A categoria de amostras “**Biscoitos, salgadinho de batata, snacks**” compreenderam salgadinho de batata(3), salgadinho de trigo (1), bombom recheado (2), biscoito (2).

Todas as amostras apresentaram DNA amplificável. Somente as amostras de salgadinho de batata apresentaram resultado negativo para lectina (em sua composição não continha soja ou seus derivados). Não houve amostras positivas na DETECÇÃO nem na IDENTIFICAÇÃO (**Figura 17-C**).

É interessante ressaltar que todos os biscoitos e bombons analisados possuíam trigo em sua composição.

As amostras “**pós para preparo de alimentos**” compreenderam mistura para bolo(6), farinha de soja, pó para preparo de alimentos (1), mistura para quiche (1), mistura para panqueca (1), mistura para bolinho de chuva (1). Nenhuma possui derivados de soja no rótulo, porém todas as amostras apresentaram resultado positivo para lectina. Nove apresentaram resultado positivo na identificação. Oito destas amostras continham soja RR em teores acima de 1% (**Figura 17-C**).

Todos os “preparados à base de farinha de trigo para a alimentação humana”, conhecidos comercialmente como mistura para bolos, quiches, bolinho de chuva apresentaram resultados positivos para o gene da soja RR e todos deveriam conter no rótulo a presença da soja. Considera-se que farinhas de trigo contendo soja RR estão sendo utilizadas como matéria-prima para fabricação de produtos, sem monitoramento. Já houve caso em que um produtor recebeu uma multa no estado de São Paulo por seus produtos do tipo mistura para bolo e pães apresentarem soja RR, contra-argumentando que seu produto não continha soja. Portanto, os mesmos continham farinha de trigo (www.greenpeace.org.br, 2002).

O cenário dos produtos contendo soja RR foi bastante diferente quando comparados os resultados de amostras analisadas antes e após 2003, ano em que foi liberado o plantio e a comercialização da soja RR. Das 68 amostras analisadas antes de 2003, 12 continham soja RR e 3 estavam acima de 1%. Foram elas: soja em grão (100%), pó para preparo de bebida (4%) e sopa desidratada (100%). Após 2003, 52 de 102 amostras analisadas continham soja RR e 24 estavam acima de

1%. Foram as seguintes amostras: 12 de farinha de trigo (34%, 46%, 50%, 67% e oito amostras com 100%), 2 de sopa desidratada (ambas com 100%), 5 de mistura para bolo(19%, 61% e 3 amostras com 100%), ração para gatos (10%), fórmula infantil (13%), mistura para quiche (52%), mistura para panqueca (60%), mistura para bolinho de chuva (86%).

De acordo com a Lei de rotulagem para OGM, os seguintes produtos deveriam conter o símbolo e o dizer “contém soja transgênica”: Soja em grão (1), bebidas e pós para bebidas (2) e ração para gatos (1), sopa desidratada (3), pós para preparo de alimento (8) e farinha de trigo (12).

Não há necessidade de rotulagem quando os produtos são livres de OGM. Porém, alguns produtos analisados: soja em grão (4), bebidas e pós para para bebidas (10), empanado vegetal (1), almôndega (1)e soja crocante (5) possuíam a informação de isento de OGM e no entanto, nove destes produtos continham soja RR (4 sojas em grão, 4 bebidas e uma almôndega).

De acordo com a RDC nº259 de 20 de setembro de 2002, alimentos embalados não devem conter a utilização de vocábulos que possam tornar a informação falsa, incorreta, insuficiente, ou que possa induzir o consumidor a equívoco, confusão ou engano , em relação à verdadeira natureza, composição, procedência, tipo, qualidade, validade, rendimento ou forma de uso do alimento; atribua efeitos ou propriedades que não possuam ou não possam ser demonstradas (BRASIL, 2002).

A rotulagem de alimentos é o principal meio de comunicação entre o produtor e o consumidor e vem ganhando importância e tendo muitas publicações específicas sobre o assunto, que buscam acompanhar com constante preocupação a segurança do consumidor, a diversidade de produtos que vêm sendo desenvolvido pela indústria de alimentos.

Atualmente as empresas alimentícias têm demonstrado um maior controle na utilização de grãos e subprodutos da soja. Produtores têm declarado a segregação de grãos de soja geneticamente modificado na produção de alimentos. Empresas têm realizado termos de compromisso tendo como objeto a comprovação da não utilização de Organismos Geneticamente Modificados ou seus derivados no produto.

Com o surgimento e comercialização da soja RR, alguns aspectos que implicam em saúde pública devem ser considerados:

- Aumento do limite de tolerância do glifosato para soja RR;
- A autenticidade de produtos à base de soja deve ser avaliada;

- A comercialização de produtos contendo soja RR sem a rotulagem requerida.

Até o momento apenas dois outros grupos abordaram a distribuição de alimentos derivados de soja RR comercializados no Brasil. Greiner et al analisaram em 2000, 100 produtos derivados de soja e encontraram soja RR em 6 amostras de farinha de soja, 3 alimentos de “tofu” e 4 produtos de padaria. Dos quais, cinco amostras estavam abaixo de 4% e oito acima de 4%. Em 2001 repetiram as análises e encontraram resultados bastante diferentes: 7 amostras de farinha de soja, 6 produtos de padaria, 2 alimentos de “tofu”, 1 amostras de comida vegetariana, 1 sobremesa, 1 amostras de isolado protéico e 3 sopas desidratadas. Das quais, 8 amostras estavam abaixo de 4% e 13 acima de 4%. Brod et al, 2005 encontraram soja RR em 15 amostras de extrato de soja, 12 amostras de proteína de soja, 4 amostras de farinha de soja e 3 amostras de produtos cárneos processados. E em outro estudo encontraram 25 de 37 amostras de proteína de soja, onde 2 estavam com percentual acima de 1% e 15 de 25 amostras de extrato de soja estavam com percentual abaixo de 1%.

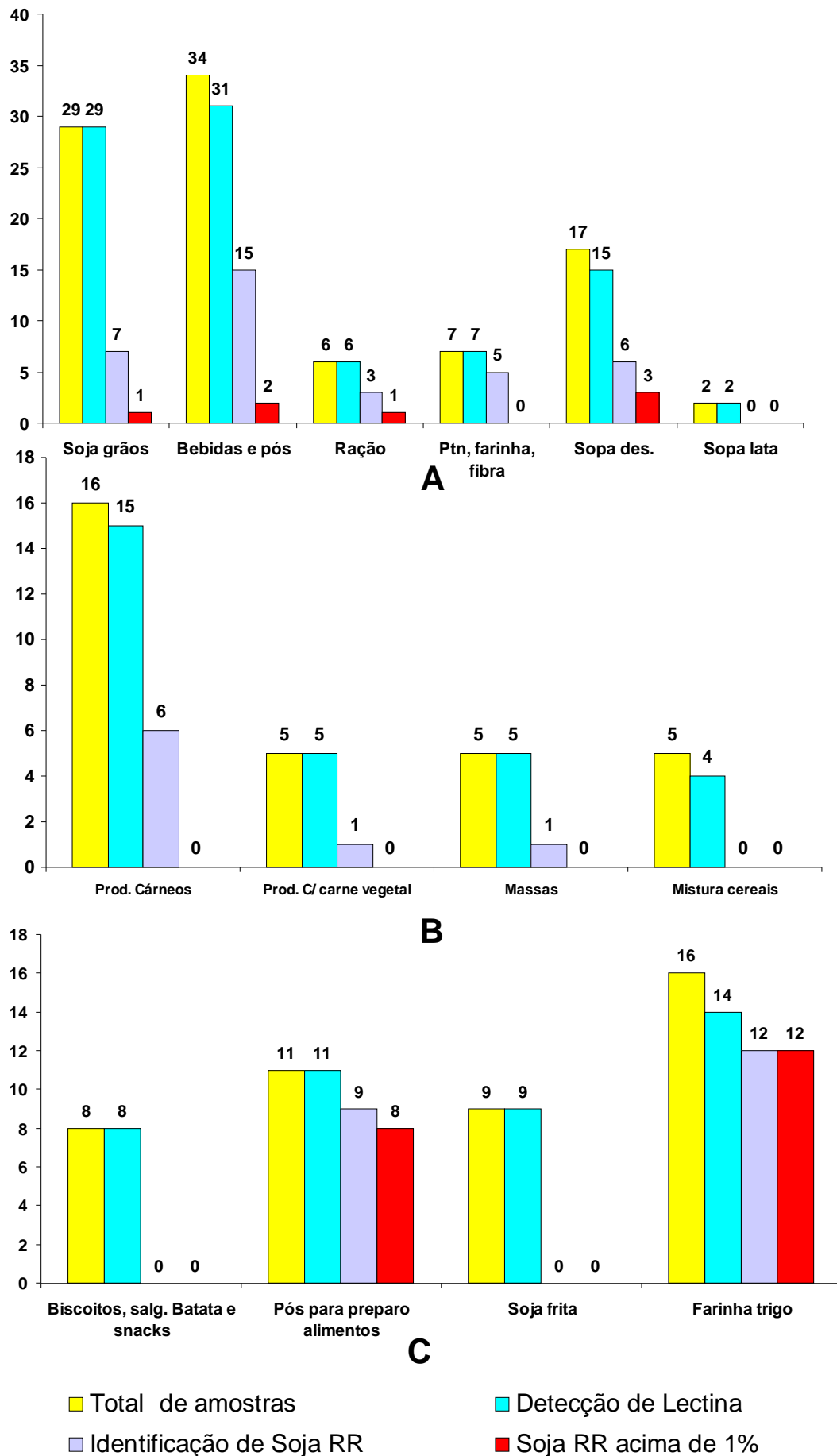


Figura 17: Representação gráfica dos resultados obtidos nas análises por categoria de alimento.

5. CONCLUSÃO

Foram implementadas metodologias para extração, detecção, identificação e quantificação de soja RR em alimentos e todas mostraram-se adequadas para a maioria dos produtos analisados.

Os resultados apresentados neste trabalho confirmaram a presença de soja RR em 64 das 170 amostras (soja em grão, bebidas e pós para bebidas, ração, proteína, farinha e fibra, sopas desidratadas, produtos cárneos, produtos com carne vegetal, massas, pós para preparo de alimentos e farinha de trigo) e revelaram que 27 das 60 amostras quantificadas deveriam conter a informação no rótulo, pois estavam com teores de OGM acima de 1%.

As amostras das categorias “sopas em lata”, “biscoitos, salgadinhos de batata e snacks”, “mistura de cereais” e “soja frita” não apresentaram resultado positivo para soja RR.

A maioria dos alimentos processados consumidos atualmente contém soja ou seus derivados como ingredientes em sua composição. Os resultados mostram a utilização de soja geneticamente modificada na formulação de vários tipos de produtos alimentícios. Porém a declaração no rótulo, tanto da soja como ingrediente como da soja RR de acordo como decreto vigente, não está sendo realizada.

Os resultados dessas análises já moveram algumas ações no Ministério Público e algumas multas já foram aplicadas à empresas produtoras de alimentos no Estado de São Paulo.

Alimentos estão sendo comercializados no Brasil com percentual acima de 1%, sem a rotulagem requerida, ferindo o direito de escolha do consumidor e descumprindo a legislação vigente.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F.E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends In Biotechnology**, 20(5),215-223, 2002.

AMARANTE Jr., O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, L. R. Glifosato propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quimica Nova**, Vol.25, nº4,589-593, 2002.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B.M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.333, n.5, p.276-282, 1995.

ANKLAM, E.; GADANI, F.; HEINZE P.; PIJNENBURG H.; VAN DEN EEDE, G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products- REVIEW, **European Food and Research Technology**, 214:3-26, 2002.

ALARY, R.; SERIN A.; MAURY, D.; BEN JOUIRA, H.; SIRVEN, J.P.; GAUTIER, M.F.; JOUDRIER, P. Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. **Food Control** 13:235-244, 2002.

ARAÚJO, ADEMIR SÉRGIO FERREIRA DE. Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações, 2002. Disponível em: www.teses.usp.br. Acesso em 15/02/2005.

ARAÚJO, W.M.C.; CIACCO, C.F.; ESTEVES, W.; CAMARGO, C. R. de O. Efeito da adição de farinha de soja desengordurada na massa de farinha de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 16 (1): 26-31, jan-maio 1996.

ASBAI (Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia). Alergia Alimentar. Disponível em: <http://www.sbai.org.br> . Acesso em 11/11/2005

AXELROD, B; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S. Lipoxygenases in soybean. **Methods Enzymology**, New York, v.71, p.441-451, 1981.

BARROS, E. G. D.; MOREIRA M. A. – Alimentos transgênicos – Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista/qd385/transgenicos4.htm>. Acesso em: 09/09/2004.

BRASIL, 2003a. Decreto nº 4.680 de 24/04/2003. Regulamenta o direito à informação quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25/04/2003.

BRASIL, 1995a. Decreto nº 1.752 de 20/12/1995. Regulamenta a lei nº 8.974 e dispõe sobre a vinculação, competência e composição da Comissão técnica Nacional de Biossegurança.

BRASIL, 1969. Decreto-Lei nº 986 de 21/10/1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Disponível em < <http://e-legis.bvs.br> > Acesso em 15/10/2006.

BRASIL, 2001. Instrução Normativa nº 20 de 11/12/2001. Dispõe sobre as normas para avaliação da segurança alimentar de plantas geneticamente modificadas ou de suas partes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15/01/2002.

BRASIL, 2005a. Instrução Normativa nº 08 de 02/06/2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da farinha de trigo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03/06/2005.

BRASIL, 2003b. Lei nº 10.688 de 13/06/2003. Estabelece normas para comercialização da produção de soja da safra de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16/06/2003.

BRASIL, 2003c. Lei nº 10.814 de 15/12/2003. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF n. 244 de 16/12/2003.

BRASIL, 2005. Lei nº 11.105 de 24/03/2005. Lei de Biossegurança. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28/03/2005.

BRASIL, 1990. Lei nº 8.078 de 11/09/1990. Dispõe sobre a Proteção do Consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12/09/1990.

BRASIL, 2003f. Medida Provisória nº 131, de 25/09/2003. . Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2004, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF de 26/09/2003.

BRASIL, 2003g. Medida Provisória nº 131, de 26/03/2003. . Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja safra de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF de 26/09/2003.

BRASIL, 1995. Lei nº 8.974 de 05/01/1995. Regulamenta os incisos II e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados, autoriza o Poder Executivo a criar, no âmbito da Presidência da República, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06/01/1995.

BRASIL, 2004. Medida Provisória nº 223 de 14/10/2004. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15/10/2004.

BRASIL, 2003d. Portaria nº 2658 de 22/12/2003 M.J. Regulamenta o emprego do símbolo no rótulo dos produtos transgênicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26/12/2003.

BRASIL, 1996. Portaria nº 354 de 18/07/1996. Regulamenta a norma técnica referente à farinha de trigo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22/07/1996.

BRASIL, 2003. RE nº 165 de 29/08/2003. Estabelece a inclusão das culturas: aveia preta, azevém, soja, coco, fumo e mamão com seus os LMR e intervalos de segurança. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02/09/2003.

BRASIL, 2002. RDC nº 259 de 20/09/2002. Estabelece a aplicação de rotulagem a todo alimento que seja comercializado, qualquer que seja sua origem, embalado na ausência do cliente, e pronto para oferta ao consumidor. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23/09/2002.

BRASIL, 2005. RDC nº 268 de 22/09/2005. Fixa a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os produtos protéicos de origem vegetal. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> .Acesso em: 18/08/2006.

BROD, FÁBIO CRISTIANO ANGONESI. **Detecção por PCR e quantificação por PCR em Tempo Real de soja Roundup Ready em proteína texturizada de soja, extrato de soja e ingredientes alimentares**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Florianópolis, 2006.

CABRAL, L. C.; MODESTA, R. C. D. Soja na alimentação humana. EMBRAPA/CTAA. Rio de Janeiro, 1981. 54p. (documentos, 1).

CARDARELLI, P.; BRANQUINHO, M.R.; FERREIRA R.T.B.; CRUZ, F.P.; GEMAL, A.L. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, 16,859-866, 2005.

CARTAGENA PROTOCOL ON BIOSAFETY. Convention on Biological Diversity, United Nations Environment Programme (UNEP), 2000.

CE - REGULAMENTO (CE) nº 1831/2003 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. Relativo à rastreabilidade e rotulagem de organismos geneticamente modificados e à rastreabilidade dos gêneros alimentícios e alimentos para animais produzidos a partir de organismos geneticamente modificados e que altera a diretiva 2001/18/CE. **Journal Oficial da União Européia**. L 268/24,PT, 2003.

CHIARELLO, M. D. A soja e os alimentos funcionais: oportunidades de parcerias em P&D para os setores público e privado. **Revista Parcerias Estratégicas**, Brasília, n.15, p.48-60, out. 2002.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36,n.1,p.315-324, jan-fev, 2006.

CORBISIER, P.; TRAPMANN, S.; GANCSBERG, D.; VAN IWAARDEN, P.; HANNES, L.; CATALANI, P.; LE GUERN, L.; SCHIMMEL, H. 2002. Effect of DNA fragmentation on the quantification of GMO. **European Journal of Biochemistry** 269 (Suppl 1), 40.

CTNBio. Comissão Nacional Técnica de Biossegurança. Disponível em: http://www.furg.br/furg/admini/cibio/com_nac.htm Acesso em 06 de outubro de 2003.

DEISINGH, A. K.; BADRIE, N. Deteccion and approaches for genetically modified organisms in food. **Food Research International**, 38:639-649, 2005.

Di PINTO, A., et al. A comparision of DNA extraction methods for food analysis. **Food Control**, 18: 76-80. 2007.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=bioss:::23>. Acesso em: 15/09/2005.

EMBRAPA. Reunião anual de pesquisa de soja da região sul – 2000. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/i_soja.htm>. Acesso em: 14/07/2003.

ENGL, 2005. EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical methods of GMO Testing. 2005 Disponível em: < <http://gmo-crl.jrc.it/guidancedocs.html>> Acesso em: 20/09/2006.

GADANI F.; BINDLER; PIJNENBURG H.; ROSSI L.; ZUBER J. **Beitr Tabakforsch Int** 19:85-96, 2000.

GARCÍA-CANÁS, V.; CIFUENTES, A.; GONZÁLEZ, R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44, p.425-426, 2004.

GAZZONI, D. L. Soja e alergia. Disponível em: <http://agrolink.com.br> Acesso em: 27/05/05

GREINER, R; KONIETZNY, U; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. **Food Control**,16,753-759, 2005.

GUERRANTE, R. D. S. et al –Transgênicos: a difícil relação entre a ciência, a sociedade e o mercado. In: Bioética e biorrisco, abordagem transdisciplinar. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2003.

GIÚDICE, M. P., BORÉM A., SILVA P. H. A.,MONTEIRO J. B., COSTA N. M. B., OLIVEIRA J. S. - **Alimentos Transgênicos** – 291p. Viçosa,MG, 2000.

www.Greenpeace.org.br. Acesso em : 15/10/2002

HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, Chicago, v.52, n.11, p.63-70,1998.

HEMMER, W. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS-repot 2/1997, Agency for Biosafety Research and Assessment of Tecnology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss national Science Foundatin, Basel, Switzerland, 1997.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real Time quantitative PCR. **Genome Research**, 6:986-994, 1996.

HIGUCHI,R; FOCKLER,C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis. Real Time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, 11, 1026-1030, 1993.

HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; GELFAND, D.H. Detection of especific polymerase chain reaction product by utilizing the 50-60 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, 88, 7276-7280, 1991.

HOOGERHEIDE, H.C. Dris para avaliação do estado nutricional da soja em duas regiões do cerrado brasileiro. Piracicaba, 94p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior Agricultura "Luiz de Queiroz", 2005.

HOST-JENSEN, A; RONNING,S.B.; LOVSETH, A.; BERDSL, K.G. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (OGM). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 375:985-993, 2003

JAMES, C. **Prévia: Situação Global da Comercialização de Lavouras Geneticamente Modificadas (GM)**, 2005.

KLEBA, J.B. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.15, n.3,p. 9-42, set/dez 1998.

KOK, E.J.; AARTS, H.J.M.; VAN HOEF, A.M.A.; KUIPER, H. A. 2000. DNA methods: critical review of innovative approaches. **Journal of AOAC International** 85, 797-800.

KURIBARA, H.; SHINDO, Y.; MATSUOKA, T.; TAKUBO, K.; FUTO S.; AOKI, N.; HIRAO, T.; AKIQAMA, H.; GODA, Y.; TOYODA, M.; HINO, A. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. **Journal of AOAC International** 85, 1077-1089, 2002.

LAJOLO, F.M.; NUTTI, M. R. **Transgênicos: Bases científicas da sua segurança** – São Paulo: SBAN, 112p, 2003.

LIPP M.; BRODMANN P.; PIETSCH K.; PAUWELS J.; ANKLAM E. – IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder – **Journal of AOAC International** Vol. 82, No. 4, pp 923-928, 1999.

LIPP, M.; BLUTH, A.; EYQUEM, F.; KRUSE, L.; SCHIMMEL, H.; VAN DEN EEDE, G.; ANKLAM, E. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. **European Food Research and Technology** 212:497-504, 2001.

LIPP, M.; SHILLITO, R.; GIROUX, R.; SPIEGELHALTER, F.; CHARLTON, S.; PINERO, D. & SONG, P. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of AOAC International.**, 88 (1): 136-155, 2005.

LUTHY, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. **Food Control** v.10, p 359-361,1999.

MARINS, B.R. – **Análise do hábito de leitura e entendimento/recepção das informações contidas em rótulos de produtos alimentícios embalados, pela população adulta freqüentadora de supermercados, no município de Niterói/RJ.** Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, 2004.

MEYER, R.; JACCAUD, E. Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans.Proceedings of the **EURO FOOD CHEM IX Conference**, Interlaken, Switzerland, Event nº 220 1:23-28, 1997.

MEYER, R. et al. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products – **Zeitschrift fiir Lebensmittel – Untersuschung und - Forschung A** 203:339-344, 1996.

MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of OGMs in food. **Food Control**. V.10, p.391-399, 1999

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Herbicidas em alimentos. Editora Varela, SP. 104 páginas, 1997.

MIRAGLIA, M; BERDAL, K.G.; BRERA, C.; CORBISIER, P.; HOLST-JENSEN, A; KOK, E.J.; MARVIN, H.J.P.; SCHIMMEL, H.; RENTSCH, J.; van RIE, J.P.P.F. & ZAGON, J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology** 42: 1157-1180, 2004.

MIYASAKA, S. A soja no Brasil central (compact disc). Biblioteca Virtual de Publicações Técnicas, São Paulo: FUNDAÇÃO CARGILL, 1986.

MONDINI L.; MONTEIRO, C. A. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). **Revista de Saúde Pública**, 28 (6): 433-9, 1994.

MONSANTO company, 2000. Updated Molecular Characterization and Safety Assessment of Roundup Ready[®] Soybean Event 40-3-2. Disponível em: <http://www.agbios.com/docroot/decdocs/gts40-3-2-update.pdf>. Acesso em 13/06/2006.

MORAIS, A.A.C.; COELHO, D. T.; SILVA, A.L. **A soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Medsi, 1996. 259p.

OLEXOVÁ L.; DOVICOVICOVÁ L.; KUČHTA, T. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. **European Food Research and Technology** 218:390-393, 2004.

OLEXOVÁ, L.; DOVICOVICOVÁ L. ; SVEC, M; SIEKEL, P.; KUČHTA ,T. Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. **Food Control** 17, 234-237, 2006.

PEANO, C.; SAMSON, M.C.; PALMIERI, L.; GULLI, M. & MARMIROLI, N. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and Mon-GMO foodstuffs with four different extraction methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52:6962-6968. 2004.

QUANTITATIVE detection of Roundup ready soybean by Real-Time PCR. In: TRAINING course on The Analysis of Food Samples For The Presence Of Genetically Modified Organisms: User Manual. Ispra, Italy. European Commission Joint Research Centre, session 11, 2002.

RACKIS, J. J.; SESSA, D. J.; HONIG, D. H. Flavor problems of vegetable food proteins. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Chicago, v.56, p-262-271, 1979.

SANTÁNA, L. F. R.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA , M. G. A.; GOMES, M. R. A . Valor nutritivo e fatores antinutricionais de multimisturas utilizadas como alternativa alimentar. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.3, p. 129-135, 2000.

SÃO PAULO (ESTADO). Lei nº 10.467, de 20 de dezembro de 1999. Dispõe sobre a impressão de aviso nas embalagens que contenham alimentos geneticamente modificados.

SAWYER, J.; WOOD, C.; SHANAHAN, D.; GOUT, S.; McDOWELL, D. **Food Control**, 14, 579-583, 2003.

SCHUSTER, I. Histórico da soja. Disponível em: <http://www.coodetec.com.br/sojasaude/historia.htm>. Acesso em: 10/03/2005.

SCMS - SEALY CENTER FOR MOLECULAR SCIENCE - THE UNIVERSITY OF TEXAS MEDICAL BRANCH. TaqMan Chemistry, 2004 . Disponível em: <http://www.scms.utmb.edu/genomics/taqsybr.htm>. Acesso em 13/06/2006

SMITH, D.S.; MAXWELL P.W. Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. *Food Control* 18, 236-242, 2007.

SOUZA, LÚCIA DE. Liberação da soja transgênica no Brasil, vantagem ou não?. Disponível em: www.anbio.org.br/noticias/lucia.htm. Acesso em: 30/11/2002.

SUN, YU-LING; LIN, CHICH-SHENG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1771-1776, 2003.

TAVERNIERS, I.; WINDELS, P.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *European Food Research and Technology* 213, 417-424, 2001.

TERRY, C. F.; HARRIS, N.; PARKES, H.C. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC International*, 85 (3): 768-774. 2002.

TOZZINI A.C. Detección de OGMs en la Cadena Agroalimentaria. In: ECHENIQUE, V. et al. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Buenos Aires: INTA, p.409-424, 2004.

VAÏTILINGOM M., PIJNENBURG, H. GENDRE F., BRIGNON, P. Real-time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in Some Representative Foods – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 5261-5266, 1999.

VIERSTRAETE, A., 1999. Principle of the PCR. Disponível em: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. Acesso em 13/06/2006.

VROH BI I.; HARVENGT L.; CHANDELIER A.; MERGEAI G.; DU JARDIN P. *Plant Breeding* 115:205-206, 1996.

(World Health organization. Em glyfosate: Environmental health Criteria 159; Geneva:WHO,1994.

WEIGHARDT, F.; BARBATI, C.; PAOLETTI, C.; QUERCI, M.; KAY, S.; de BEUCKELEER, M.; Van den EEDE, G. Real-Time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 zea mays event, **Journal of AOAC International**, 87 (6):1342-1355, 2004.

WURZ, A.; BLUTH,A.; ZELTZ, P.; PFEIFER, C.; WILLMUND, R. Quantitative analysis of genetically modified organisms in processed food by PCR-based methods. **Food Control**, 10:385-389,1999.

ZIMMERMANN, A.; LÜTHY, J.; PAULI, U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. **Zeitschrift fiir Lebensmittel – Untersuschung und - Forschung A**, 207:81-90.1998.