

MARCIO ANTONIO SILVA PIMENTA

DETECÇÃO DE TRANSGÊNICOS EM SOJA E PRODUTOS DERIVADOS  
NO BRASIL

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de "*Doctor  
Scientiae*".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003

MARCIO ANTONIO SILVA PIMENTA

DETECÇÃO DE TRANSGÊNICOS EM SOJA E PRODUTOS DERIVADOS  
NO BRASIL

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de "*Doctor  
Scientiae*".

APROVADA: 29 de agosto de 2003.

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Conselheiro)

---

Prof. Aluizio Borém de Oliveira  
(Conselheiro)

---

Pesq. Marta Fonseca Martins Guimarães    Pesq. Luiz Carlos Bhering Nasser

---

Prof. Maurilio Alves Moreira  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, hoje e sempre.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Maurilio Alves Moreira, pela orientação segura desde a Iniciação Científica, pelos ensinamentos, pela confiança, incentivo e, sobretudo, pela amizade, que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelas sugestões interessantes, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao professor Aluízio Borém de Oliveira e, aos pesquisadores Luiz Carlos Bhering Nasser e Marta Fonseca Martins Guimarães, pelas sugestões apresentadas e pela amizade.

À minha querida mãe Tereza Silva Trindade, pelas palavras carinhosas e confortáveis nos momentos difíceis.

Aos colegas de república, Daniel, Hannuar, Lucas e Newton, pela amizade, companheirismo, festas e pelos momentos divertidos.

Aos funcionários Aloísio, Edson, Fausto, Gláucia, Pedro e Sandra, pelo convívio e pela amizade.

A todos os colegas de laboratório (Biomol, Proteína e Seq-DNA), pelo companheirismo e pela amizade.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

MARCIO ANTONIO SILVA PIMENTA, filho de Antonio Francisco Pimenta (*in memoriam*) e Tereza Silva Trindade, nasceu em 23 de janeiro de 1972, em Aguanil, Estado de Minas Gerais.

Cursou o primeiro grau em Aguanil e o segundo, em Viçosa, MG.

Em março de 1991, ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, diplomando-se em 1995.

Em março de 1996, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na UFRV, concluindo-o em 17 de julho de 1998.

No período de setembro de 1998 a julho de 1999, foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial (DTI) no projeto “Desenvolvimento de variedades de soja com alto teor protéico para a agroindústria”, no BIOAGRO/UFV, tendo como instituição financiadora a Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda. – COODETEC.

Em agosto de 1999, ingressou no Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento da UFRV, submetendo-se à defesa de tese em 29 de agosto de 2003.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1. Obtenção de organismos geneticamente modificados - OGMs..	5
2.2. Sistemas de detecção de Organismos Geneticamente Modificados.....	7
2.2.1. Detecção baseada na presença de proteínas.....	7
2.2.2. Detecção baseada na presença de DNA exógeno.....	9
2.2.2.1. PCR competitivo.....	10
2.2.2.2. PCR em tempo real (Real Time PCR).....	10
2.3. Tolerância ao herbicida Roundup (Glifosato).....	12
2.4. Resistência a insetos pragas.....	12
2.5. Situação global de culturas transgênicas comercializadas em 2002.....	13
2.5.1. Área global.....	13
2.5.2. Distribuição de culturas transgênicas por países.....	13
2.5.3. Distribuição de transgênicos por culturas.....	13
2.5.4. Distribuição de culturas transgênicas por características.....	14
2.5.5. Culturas transgênicas prevalentes em 2002.....	14
2.5.6. Transgênicos no Brasil.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
DETECÇÃO, PELO LABORATÓRIO DE ANÁLISES GENÉTICAS, DE RESÍDUOS DE TRANSGÊNICOS EM SOJA GRÃO, FARELO E RAÇÃO NO PERÍODO DE 2000 a 2002.....	22
RESUMO .....	22
INTRODUÇÃO .....	23

	Página
MATERIAL E MÉTODOS .....	24
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS CÁRNEOS PARA ANÁLISES QUANTITATIVAS DE OGMS.....	37
RESUMO .....	37
INTRODUÇÃO .....	38
MATERIAL E MÉTODOS .....	40
RESULTADOS.....	44
DISCUSSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANÁLISE DE SEMENTES DE SOJA TRANSGÊNICA UTILIZADAS NO PLANTIO DA SAFRA 2002/2003 PELOS PRINCIPAIS ESTADOS PRODUTORES.....	54
RESUMO.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	61
DISCUSSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
3. RESUMO E CONCLUSÕES .....	73

## RESUMO

PIMENTA, Marcio Antonio Silva, D. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003. **Detecção de transgênicos em soja e produtos derivados no Brasil**. Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Aluizio Borém de Oliveira.

A área global cultivada com transgênicos em 2002 continuou a crescer pelo sexto ano consecutivo, com uma taxa de mais de 10% ao ano, atingindo, em 2002, 58,7 milhões de hectares. No Brasil, o cultivo comercial e o consumo de transgênicos estão suspensos até a presente data, no entanto cultivos clandestinos de soja transgênica têm sido identificados, sobretudo nos estados do sul do país. Inicialmente, este trabalho teve como objetivo oferecer um enfoque sobre a comercialização de soja transgênica e produtos derivados (farelo e ração) no Brasil, com base em amostras enviadas por várias empresas, durante os anos de 2000, 2001 e 2002, ao Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética. Foram analisadas amostras de grãos de soja, farelo e rações à base dessa leguminosa. O método utilizado nas análises foi o da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). “Primers” específicos foram utilizados para detecção do gene RR (“Roundup Ready”), do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e da região terminadora NOS do gene da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*. Como resultados foram identificadas, no ano de 2000, amostras positivas apenas em grãos de soja (77,8%) e farelo (22,2%). Em 2001, 70,8% das amostras positivas foram de grãos de soja, 12,5% de farelo e 16,7% de rações à base de soja. Já, em 2002, 34,9% das amostras positivas foram de grãos de soja, 45% de farelo e 20,1% de ração. Devido à dificuldade em se obter quantidades significativas de DNA em condições de serem analisadas, a partir de alimentos processados, este trabalho teve como segundo objetivo ajustar uma metodologia de extração de DNA para produtos alimentícios processados cárneos para análise quantitativa. Para isso, foram testadas modificações em dois métodos de extração de DNA: o

método Wizard (Promega) e o PrepMan Ultra (Applied Biosystems). As modificações no método Wizard incluíram o uso de um volume 1,5 vez maior do tampão de extração que o recomendado pelo fabricante, um maior tempo de incubação (por mais de 12 horas) e a eluição final do DNA em um volume menor de água do que o sugerido. No método do PrepMan Ultra foram testados dois volumes diferentes do reagente de extração, 200 e 400  $\mu$ L. A reação de PCR em tempo real foi realizada usando-se o sistema ABI Prism SDS 7000 (Applied Biosystems). Os resultados permitiram concluir que a extração de DNA de produtos cárneos utilizando o método Wizard com as modificações propostas, foi mais eficiente que a extração usando o PrepMan Ultra. O presente estudo teve como terceiro objetivo avaliar a real situação do plantio de sementes fiscalizadas e certificadas de soja geneticamente modificada, na safra de 2002/2003, por meio da análise de 2.466 amostras coletadas por laboratórios de análises de sementes dos Estados do Mato Grosso (42%), Rio Grande do Sul (39,5%) e Minas Gerais (10,1%) e pela cooperativa COODETEC, do Estado do Paraná (8,4%). O método empregado nas análises foi o PCR qualitativo, com o uso de “primers específicos”. Detectou-se a presença de soja transgênica apenas nas amostras coletadas no Estado do Rio Grande do Sul (19,69% das amostras analisadas).

## ABSTRACT

PIMENTA, Marcio Antonio Silva, D. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2003. **Detection of transgenic in soybean and in derived products in Brazil.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and Aluizio Borém de Oliveira.

The global area cultivated with transgenic plants in 2002 continued to grow for the sixth consecutive year, with a rate of more than 10% a year, reaching in 2002, 58.7 million hectares. In Brazil, the commercial cultivation and consumption of transgenic are suspended to the present date, however, illegal cultivations of transgenic soybean have been identified, mostly in the southern states. Initially, this work had as objective offer a vision of the commercialization of transgenic soybean and derived products (soy flour and soybean based ration) in Brazil based on samples analyzed by the Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, a private laboratory incubated at the Federal University of Viçosa, sent by several companies during the years of 2000, 2001 and 2002. Samples of soybean grains, soy flours and rations were analyzed. The method used the polymerase chain reaction (PCR). Specific primers were used for the detection of the RR gene ("Roundup Ready"), the promoter 35S of cauliflower mosaic virus and the NOS terminator region of nopaline sintase gene of *Agrobacterium tumefaciens*. As results it was identified in the year of 2000 positive samples in soybean grains (77.8%) and soy flour (22.2%). In 2001, 70.8% of positive samples were from soybean grains, 12.5% from soy flour and 16.7% from soybean based rations. In 2002, 34.9% of the positive samples were from soybean grains, 45% from soy flour and 20.1% from rations. Due to the difficulty in obtaining significant amounts of DNA in conditions to be analyzed, starting from processed foods, this work had as a second objective to adjust a methodology of DNA extraction for processed meat products containing soybean products for quantitative analysis. Several modifications were tested in two methods of DNA extraction, the Wizard method (Promega) and

PrepMan Ultra (Applied Biosystems). The modifications in the Wizard included the use of a bigger volume of the extraction solution (1.5 x recommended by the manufacturer), a larger time of incubation (more than 12 hours) and, the final elution of DNA in a smaller volume of water than recommended. In the PrepMan Ultra method, two different volumes from the extraction reagent, 200 and 400  $\mu$ L were tested. The real time PCR reaction was accomplished using the ABI Prism SDS 7000 system (Applied Biosystems). The results allowed concluding that the extraction of DNA of meat products using the Wizard method with the proposed modifications was more efficient than the extraction using the PrepMan Ultra. The present study had also as a third objective to evaluate the real situation of the use of fiscalized and certified genetically modified soybean seeds in the agricultural year 2002/2003, through the analysis of 2466 samples collected by laboratories of seed analyses in the states of Mato Grosso (42%), Rio Grande do Sul (39,5%), Minas Gerais (10,1%) and Paraná (8,4%). The method used to analyze the samples was the qualitative PCR using "specific" primers. The presence of transgenic soybean seeds was detected only in samples collected in the state of Rio Grande do Sul (19.69% of the analyzed samples).

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta das moléculas que carregam a informação genética provocou uma revolução nas ciências da vida. Contando com as vantagens da universalidade do código genético, os pesquisadores vêm alcançando sucesso ao associar seqüências vindo de diferentes organismos usando técnicas de biologia molecular e ao integrar DNA "estranho" (DNA exógeno) no genoma de qualquer organismo. Esses organismos geneticamente modificados (OGMs) têm a capacidade de sintetizar novas proteínas, as quais conferem a eles novas propriedades (GACHET et al., 1999).

Atualmente, é possível a transferência de genes, previamente caracterizados e geneticamente manipulados em laboratório, entre organismos de diferentes espécies por vias não sexuais. Essa nova ferramenta da genética molecular permite a introdução de características desejáveis em espécies de interesse econômico, levando ao desenvolvimento de organismos geneticamente modificados ou transgênicos, sejam eles animais, plantas ou microrganismos (BARROS e MOREIRA, 2000).

A obtenção de transgênicos envolve: (1) o isolamento do gene de interesse, (2) a sua manipulação em laboratório para associar a ele elementos que direcionem a sua expressão, (3) a sua transferência e incorporação ao genoma do organismo de interesse e (4) a seleção e regeneração do OGM obtido. O organismo transformado é, então, submetido a uma série de testes que determinam a sua viabilidade e sua capacidade de gerar descendentes férteis que possam transmitir a característica de interesse para gerações futuras.

A biotecnologia tem possibilitado a modificação de espécies de interesse agrônomo de maneira bastante precisa, por meio de técnicas de transformação, proporcionando, assim, a obtenção de plantas transgênicas. Os primeiros cultivos transgênicos obtidos foram o tomate, a batata, a soja, a

canola e o algodão, liberados para comercialização a partir de 1994 (DUIJN et al., 1999).

É possível, de modo bastante preciso, dizer se um alimento é derivado de uma planta transgênica, de uma planta não transgênica ou de uma mistura de ambas. Essencialmente, existem dois métodos que podem ser utilizados para esse fim: o método imunológico e a Reação em Cadeia da DNA Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” - PCR). O primeiro baseia-se na detecção, por anticorpos específicos, da proteína que é codificada pelo transgene ou pelo gene marcador, o segundo método detecta o transgene, ou seja, o segmento de DNA que foi introduzido na planta. A quantificação de ingredientes derivados de OGMs é baseada na técnica de PCR, permitindo a detecção dos produtos amplificados com sondas fluorescentes. O DNA-alvo é quantificado por meio da medição do aumento da quantidade de fluorescência durante o PCR, o qual é proporcional ao número de moléculas inicial (KOK et al., 2002).

Entre os métodos de detecção, a técnica que tem sido utilizada para analisar organismos geneticamente modificados é a do PCR, a metodologia mais aceita internacionalmente para análise de transgênicos e emissão de laudos, por causa de sua alta sensibilidade e especificidade e por necessitar de pequena quantidade de DNA (ALARY et al., 2002).

A identificação de organismos geneticamente modificados pela técnica de PCR detecta diretamente o DNA, ou seja, a seqüência de DNA específica do transgene, de parte dele, da região promotora, da região terminadora ou do gene marcador. Esse método tem sido o mais aceito pelos países da Comunidade Européia para análise de alimentos transgênicos. Baseia-se na amplificação de um fragmento de DNA específico contido no transgene ou em algum segmento de DNA exógeno a ele associado. A amplificação é feita pela reação em cadeia da DNA polimerase, que utiliza pequenos fragmentos específicos de DNA que flanqueiam a região do DNA que se deseja amplificar. As características mais marcantes do método de detecção de transgenes baseado na reação de PCR são a sua precisão e a sua sensibilidade, altamente desejáveis nesse tipo de análise (ANKLAM et al., 2002).

Os métodos de PCR para detecção de OGMs dividem-se em duas grandes categorias: métodos qualitativos e quantitativos. Os primeiros servem para comprovar a mera presença ou ausência de elementos transgênicos que podem ser comuns a muitos OGMs, como o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor – CaMV ou o terminador NOS da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, ou exclusivos de um OGM em particular. Os métodos quantitativos, por sua vez, permitem conhecer exatamente a concentração do OGM presente em determinada amostra e podem ser abordados por dois sistemas: (1) é co-amplificado um gene endógeno da planta junto com o transgene que se detectam em fase exponencial, requerendo um aparelho de PCR que permita monitorar a reação em tempo real (Real Time PCR) (DUIJN et al., 2002); ou (2) é co-amplificado um transgene (DNA-alvo) junto com quantidades conhecidas de DNA de uma seqüência gerada artificialmente (competidor), que utilize os mesmos “primers” (PCR competitivo) (HARDEGGER et al., 1999).

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1 - Fornecer uma visão sobre a comercialização de soja transgênica e seus derivados (farelo e ração) no Brasil com bases em amostras de diferentes origens, no período de 2000 a 2002, recebidas pelo Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, empresa incubada no Sistema de Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa, credenciada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - Portaria Nº 27, de 15 de maio de 2003.

2 - Ajustar uma metodologia de extração de DNA para produtos alimentares cárneos processados para posterior detecção quantitativa de OGMs pelo procedimento TaqMan<sup>®</sup>.

3 - Avaliar as situações real e atual do plantio de sementes de soja fiscalizadas, certificadas e geneticamente modificadas, na safra 2002/2003,

por meio da análise de sementes amostradas por laboratórios de análises de sementes dos Estados do Mato Grosso, Rio Grande do Sul e de Minas Gerais, bem como por uma cooperativa de pesquisa e produção de sementes do Estado Paraná.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Obtenção de organismos geneticamente modificados - OGMs

O avanço das técnicas de Biologia Molecular nas últimas décadas permitiu a transferência de material genético (DNA) entre organismos por vias não sexuais, dando origem aos organismos geneticamente modificados (OGMs) ou transgênicos. Atualmente, é possível transferir genes entre organismos da mesma espécie, entre espécies, gêneros e até mesmo entre reinos diferentes.

Após o primeiro relato de transformação e regeneração de plantas de *Nicotiana tabacum* (HORSCH et al., 1985), ficou evidente que a transformação genética de qualquer outra planta seria rotina em poucos anos. A transformação genética pode ser definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucléicos em um genoma receptor (TACCHINI e WALBOT, 1986), excluindo-se a introdução por fecundação. Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas, com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

Existem diversas técnicas que podem ser usadas na transformação genética de plantas, as quais podem ser agrupadas em duas categorias: transferência direta e indireta de genes. A transferência indireta é aquela em que, para intermediar a transformação, utiliza-se um vetor, por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* e *rhizogenes*. O método mais utilizado na obtenção de plantas transgênicas, em nível acadêmico, tem sido a transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Entretanto, algumas espécies, em particular as monocotiledôneas, são pouco suscetíveis à infecção por *Agrobacterium*. Essa constatação foi um estímulo ao desenvolvimento de outros métodos de transformação, conhecidos como métodos diretos (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

A transferência direta de DNA é baseada em métodos físicos ou químicos, podendo-se citar como exemplos a transformação com polietilenoglicol (PEG), a eletroporação e a aceleração de partículas (biobalística).

1) Polietilenoglicol: alguns polímeros, como o polietilenoglicol (PEG), o polivinil álcool (PVA) ou o DEAE-dextrana, podem ser usados como agentes químicos que permitem a passagem passiva do DNA para dentro da célula vegetal. No contato dos protoplastos com os polímeros, a permeabilidade da membrana citoplasmática é aumentada pela interação das cargas positivas dos polímeros com as cargas negativas do DNA e da membrana, facilitando a penetração deste. Os polímeros também protegem o DNA exógeno contra a ação das nucleases da célula vegetal (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

2) Eletroporação: a eletroporação consiste em submeter uma mistura de DNA e protoplastos a um campo elétrico de intensidade controlada, durante um curto espaço de tempo. Esse choque elétrico provoca, na membrana plasmática dos protoplastos, a formação de zonas de permeabilização aos ácidos nucleicos. Se esse choque não é muito intenso, o fenômeno é reversível, e a membrana plasmática retoma seu estado inicial, resultando em protoplastos contendo o DNA exógeno e perfeitamente viáveis (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

3) Biobalística: a aceleração de partículas consiste na utilização de microprojéteis cobertos com moléculas de DNA que são acelerados a alta velocidade, o que permite sua penetração em células intactas, atravessando a parede celular e a membrana plasmática, sem destruí-las. Os microprojéteis utilizados são de ouro ou de tungstênio, nos quais são adsorvidas as moléculas de DNA. Os aparelhos usados para acelerar as micropartículas envolvidas pelo DNA podem ter propulsão a ar, a pólvora, a gás hélio ou a eletricidade (RECH e ARAGÃO, 1998; BRASILEIRO e DUSI, 1999).

## **2.2. Sistemas de detecção de organismos geneticamente modificados**

### **2.2.1. Detecção baseada na presença de proteínas**

As proteínas heterólogas que as plantas geneticamente modificadas sintetizam podem ser detectadas por métodos bioquímicos ou imunológicos. Pelo método imunológico, existem pelo menos três técnicas que permitem detectar a proteína ou a enzima codificada pelo transgene ou pelo gene marcador: a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), a técnica de *Western Blot* e a técnica da tira de fluxo lateral.

A detecção bioquímica de proteínas transgênicas pode ser realizada utilizando-se cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta resolução ou eletroforese capilar (CRESPO et al., 2003).

No *Western Blot*, as proteínas são extraídas da amostra e imobilizadas numa membrana. As proteínas ligadas à membrana são imersas numa solução contendo um anticorpo que reconhece a proteína-alvo. Ao anticorpo é ligada uma enzima que catalisa a formação de um composto corado, cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de proteína (CRESPO et al., 2003).

No ensaio de ELISA, utiliza-se o mesmo princípio, mas o anticorpo está ligado ao plástico dos poços das microplacas em vez de se ligar à membrana. No ensaio de ELISA, inicialmente um extrato protéico obtido da amostra é adicionado a uma placa de poliestireno e as proteínas são adsorvidas (imobilizadas) na placa. Em seguida, uma solução contendo anticorpo específico para a proteína de interesse (anticorpo 1) é adicionada à placa, onde o anticorpo se liga de modo específico à proteína. Um segundo anticorpo (anticorpo 2) é, então, adicionado à placa, o qual reconhece especificamente o anticorpo 1. Ao anticorpo 2 encontra-se conjugada uma substância fluorescente que permite a sua detecção de maneira visual ou através de equipamentos específicos. Assim, se a proteína de interesse estiver presente no extrato, o anticorpo 1 se ligará a ela. Ao anticorpo 1 se ligará o anticorpo 2, dessa maneira, a presença da

proteína pode ser determinada e, conseqüentemente, confirmar se o alimento é derivado de transgênicos ou não (BARROS, 2000).

Com relação aos testes imunológicos, existe ainda a possibilidade de se utilizarem testes rápidos em tira de fluxo lateral *strip tests*, que já estão sendo comercializados e podem ser realizados no próprio local de coleta da amostra, o que está sendo utilizado na detecção de OGMs em grãos e folhas (CRESPO et al., 2003). Essa técnica também se baseia na interação antígeno-anticorpo. A tira é normalmente constituída de celulose, em que na sua extremidade superior existe um material poroso e absorvente. Pouco abaixo dessa região encontra-se embebido o anticorpo de captura, e no terço inferior da tira está embebido o anticorpo de detecção ligado a uma substância que promova o aparecimento de cor. O anticorpo de detecção é específico para a proteína de interesse (BARROS, 2000).

No teste da tira de fluxo lateral, a extremidade inferior da tira é imersa em um tubo contendo o extrato protéico do material que se quer analisar, em uma solução tampão. Se a proteína de interesse estiver presente na amostra, ela migrará para a parte superior da tira, sendo arrastada pelo tampão que tende a subir por capilaridade. Da mesma forma, o anticorpo de detecção também migrará e à medida que a proteína migra, moléculas do anticorpo de detecção a ela se ligam. O complexo proteína-anticorpo vai se tornando cada vez maior até que não consegue mais migrar e, com isso, forma uma faixa. Da mesma forma, as moléculas do anticorpo de detecção que não se ligarem à proteína continuarão migrando para a parte superior da tira, onde serão “capturadas” pelo anticorpo de captura, formando uma segunda faixa. O anticorpo de detecção encontra-se ligado a uma substância que promove o aparecimento de cor. Como interpretação do teste, a presença de uma única faixa (na parte superior da tira) indica que o teste foi negativo. No entanto, a presença de duas faixas indica que o teste foi positivo (BARROS, 2000).

### **2.2.2. Detecção baseada na presença de DNA exógeno**

Nas amostras em que existe DNA geneticamente modificado, todo o DNA exógeno é, em princípio, passível de ser detectado: seqüências de promotores, genes de interesse introduzidos, sinais de terminação e genes marcadores usados para seleção das plantas modificadas em laboratório. A extração de DNA de gêneros alimentícios e ingredientes alimentares geneticamente modificados é um ponto crítico para todos os passos analíticos subseqüentes, tanto para a detecção qualitativa quanto para a análise quantitativa. Uma análise qualitativa de um alimento dá uma indicação sobre a presença de um OGM, podendo este ser autorizado ou não, mas, para responder à necessidade de rotulagem, é necessário um teste quantitativo subseqüente (CRESPO et al., 2003).

Alguns métodos analíticos que utilizam a reação em cadeia da DNA polimerase tem sido desenvolvidos para detectar qualitativamente a presença de seqüências modificadas de ácidos nucléicos em alimentos transgênicos (EHLERS et al., 1997; KOPPEL et al., 1997). Na detecção em nível de DNA, dois diferentes métodos quantitativos são disponíveis, que podem ser baseados no PCR competitivo (WURZ et al., 1999) ou no PCR em tempo real – Real Time PCR (VAITILINGOM et al., 1999).

O mais importante pré-requisito para a aplicação de métodos de detecção baseados em PCR é o completo conhecimento da construção genética exógena dentro do OGM a ser detectado e a habilidade em extrair quantidades significativas de DNA amplificável da amostra a ser investigada. Fornecidos esses dois pré-requisitos, a detecção baseada em PCR pode rapidamente ser desenhada para, virtualmente, qualquer OGM (WURZ et al., 1999).

Até recentemente, apenas métodos qualitativos para detecção de OGMs tinham sido padronizados. Variações entre laboratórios são grandes, como variações na eficiência de extração de DNA e efeitos inibitórios que podem ocorrer, necessitando, assim, de um monitoramento cuidadoso. Métodos quantitativos de análises usando PCR têm sido desenvolvidos. Esses métodos possuem a vantagem de diminuir as variações entre

laboratórios. Em geral, com alimentos processados é mais difícil obter quantidades significativas de DNA amplificável, pois tratamento térmico, atividades enzimáticas ou valores de pH ácidos podem promover fragmentação e outras modificações do DNA (WURZ et al., 1999).

#### **2.2.2.1. PCR competitivo**

No PCR competitivo, o DNA-alvo é co-amplificado na mesma reação de PCR juntamente com um DNA-padrão interno, sendo uma quantidade conhecida desse padrão adicionada a cada reação. Esse DNA (padrão interno) é específico para cada modificação genética e pré-sintetizado e clonado, usualmente, em um plasmídeo. Este é normalmente organizado para conter a mesma seqüência de DNA modificada presente no alvo, mas modificado para produzir uma deleção ou adição de 20-25 pares de bases na parte do DNA que não está envolvida no anelamento do *primer*. Conseqüentemente, os mesmos *primers* amplificarão ambas as seqüências de DNA presentes no OGM específico e no padrão interno. O fragmento de DNA amplificado no padrão interno é de 20 a 25 pb menor que o fragmento produzido pelo DNA-alvo, tornando, assim, possível a sua diferenciação através da eletroforese. O DNA do padrão interno age como um competidor na seqüência-alvo durante o PCR (WISEMAN, 2002).

#### **2.2.2.2. PCR em tempo real (Real Time PCR)**

Outro procedimento de PCR quantitativo, usando equipamentos de detecção de fluorescência, tem se mostrado extremamente preciso e menos trabalhoso (HEID et al., 1996). Essa técnica, mais bem conhecida como TaqMan (HOLLAND et al., 1991), é baseada no uso de uma sonda fluorescente que hibridiza dentro da seqüência-alvo através de *primers* de PCR usuais.

Três sondas químicas correntemente usadas para a detecção dos produtos de PCR em tempo real são: a sonda de hidrólise (TaqMan<sup>TM</sup>), a sonda “hairpin” e a sonda de hibridização. Todas elas eliminam os processos

pós-PCR, permitindo uma análise em tempo real dos produtos de PCR produzidos durante a amplificação num sistema fechado (JORDAN, 2003). Além do TaqMan™, outros sistemas de detecção, como “Molecular Beacons”, “Scorpions” e sondas de hibridização também têm sido desenvolvidos, os quais não utilizam da atividade 5'-exonuclease da DNA polimerase. Finalmente, a utilização de corantes fluorescentes que se ligam à DNA fita dupla, como SYBR Green, tem mostrado útil na detecção da formação de produtos durante o PCR (GIULIETTI et al., 2001).

A química é a chave para o sistema de detecção. A tecnologia TaqMan™ (tecnologia mais usada na identificação de OGMs) utiliza a atividade 5'-exonuclease da DNA polimerase para hidrolisar uma sonda de hibridização ligada ao *amplicon*-alvo. A sonda TaqMan é desenhada para anelar na seqüência-alvo entre os *primers Forward* e *Reverse*. Esta técnica usualmente utiliza a *Taq* ou *Tth* polimerase, porém qualquer enzima com as propriedades da atividade 5'-exonuclease pode ser empregada (GUT et al., 1999).

A especificidade desse método dá-se através do uso de uma sonda de oligonucleotídios que hibridiza no *amplicon* durante a fase de anelamento/extensão do PCR. A sonda TaqMan™ contém um corante fluorescente repórter na sua extremidade 5' e a emissão do sinal fluorescente pelo repórter é “impedida” por um segundo corante fluorescente *quencher* presente na extremidade 3'. Se nenhum *amplicon* complementar à sonda for amplificado durante o PCR, a sonda permanecerá desligada. Como a atividade exonuclease 5'-3' da *Taq* ou da *Tth* polimerase é dupla-fita específica, a sonda desligada permanece intacta, e nenhuma fluorescência do repórter é detectada (HEID et al., 1996).

Contrariamente, se o *amplicon* correto for amplificado, a sonda irá hibridizar com este *amplicon* depois do passo de desnaturação. Ela permanece hibridizada (dupla fita) enquanto a polimerase faz a extensão dos *primers* até atingir a sonda hibridizada, quando, então, a DNA polimerase, com a sua atividade exonuclease 5'-3', hidrolisa a extremidade 5' da sonda, liberando o nucleotídio contendo o corante *repórter*. Isso faz com que os corantes *repórter* e *quencher* se separem, e com isso o *repórter* emite

fluorescência. Os sinais fluorescentes são enviados, via fibra ótica, para a câmera CCD do equipamento, onde são analisados através de "softwares". O "software" calcula o ciclo de entrada de cada reação para a qual existe um relacionamento linear com a quantidade inicial do DNA (BUSTIN, 2000).

### **2.3. Tolerância ao herbicida Roundup (glifosato)**

Introduzida em 1996, a soja Roundup Ready permite aos agricultores aplicarem o herbicida Roundup sobre a soja sem causar danos às plantas que estão em crescimento. A soja Roundup Ready tem uma única proteína heteróloga: a enzima CP4 EPSPS. A proteína CP4 EPSPS torna as plantas tolerantes ao glifosato, o princípio ativo do herbicida Roundup Ready. Funcionalmente, a proteína é similar (exceto quanto à sua tolerância ao glifosato) às proteínas EPSPS presentes em todos os vegetais e em microrganismos, como as leveduras, e têm um histórico de consumo seguro (COSTA e BORÉM, 2003). O DNA inserido na soja Roundup contém apenas o promotor E35S, o gene *cp4 epsps*, o peptídeo de trânsito CTP4 e o terminador NOS 3' (BERGER, 1998). Além da soja, o algodão, a canola e o milho também foram modificados geneticamente para tolerância ao herbicida Roundup e já foram introduzidos no mercado (JAMES, 2002).

### **2.4. Resistência a insetos pragas**

É possível o controle de diversos insetos pragas com a utilização de genes provenientes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), uma bactéria gram-positiva que ocorre naturalmente em diferentes tipos de solos e regiões do mundo. Três exemplos de culturas que foram geneticamente modificadas com genes de resistência a insetos são: 1) o algodão Bollgard, que foi modificado com o gene *cryIA(c)*, oriundo de *Bacillus thuringiensis* subesp. *Kurstaki* (*Btk*) estirpe HD-1, em que o promotor E35S e o gene *nptII* fazem parte da inserção de DNA exógeno introduzido; 2) a batata com o gene *cryIIIA*, oriundo de *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebriones* (*Btt*). O DNA introduzido na batata NewLeaf inclui também o promotor E35S e o gene de seleção *nptII*; e 3) o

milho Yieldgard/Maisgard com o gene *cryIA(b)*, com a ressalva de que no milho o DNA exógeno inclui apenas o gene de interesse e o promotor E35S (BERGER, 1998).

O milho Yieldgard é resistente a insetos lepidópteros, particularmente a broca europeia do milho, devido à inserção e expressão de uma sequência codificadora para a  $\delta$ -endotoxina sintética *cryIA(b)* (ZIMMERMANN et al., 1998).

## **2.5. Situação global de culturas transgênicas comercializadas em 2002**

### **2.5.1. Área global**

A área global estimada de culturas transgênicas em 2002 foi de 58,7 milhões de hectares ou 145 milhões de acres. No período de 1996 a 2002, a área global com transgênicos aumentou 35 vezes, passando de 1,7 milhão de hectares em 1996 para 58,7 milhões em 2002. Essa alta taxa de adoção reflete a crescente aceitação dos transgênicos pelos produtores, que usam a tecnologia em países industrializados e em desenvolvimento (JAMES, 2002).

### **2.5.2. Distribuição de culturas transgênicas por países**

Em 2002, quatro países foram responsáveis por 99% da área global de transgênicos plantada no mundo, sendo dois deles países industrializados, Estados Unidos e Canadá, e os outros dois em desenvolvimento, Argentina e China. Desses quatro países, os Estados Unidos cultivaram 66%, a Argentina 23%, o Canadá 6% e a China 4% da área global de transgênicos (JAMES, 2002).

### **2.5.3. Distribuição de transgênicos por cultura**

A distribuição global da área com transgênicos para as quatro principais culturas evidencia claramente a predominância da soja, ocupando 62% da área global em 2002, sendo toda ela tolerante a herbicida. Em

termos globais, a soja transgênica ocupou 36,5 milhões de hectares em 2002, vindo o milho transgênico em segundo lugar, com 12,4 milhões; em terceiro lugar o algodão, com 6,8 milhões; e em quarto lugar a canola, com 3,0 milhões (JAMES, 2002).

#### **2.5.4. Distribuição de culturas transgênicas por características**

Durante o período de 1996 a 2002, tolerância a herbicida tem sido a característica prevalente e a resistência a insetos, em segundo lugar. A tolerância a herbicida introduzida na soja, no milho e no algodão ocupou 75% dos 58,7 milhões de hectares, com 10,1 milhões destes plantados com milho *Bt*, enquanto a tolerância a herbicida e a resistência a insetos do algodão e milho ocuparam 8% da área global de transgênicos em 2002 (JAMES, 2002).

#### **2.5.5. Culturas transgênicas prevalentes em 2002**

A soja tolerante a herbicida foi a cultura transgênica mais cultivada, sendo plantada legalmente em sete países em 2002: Estados Unidos, Argentina, Canadá, México, Romênia, Uruguai e África do Sul. Em termos globais, a soja tolerante a herbicida ocupou 36,5 milhões de hectares, representando 62% da área de 58,7 milhões de hectares em todas as culturas. O milho *Bt* foi a segunda cultura, com 7,7 milhões de hectares, o equivalente a 13% da área total e sendo plantado em sete países: Estados Unidos, Canadá, Argentina, África do Sul, Espanha, Honduras e Alemanha. As outras cinco culturas (milho tolerante a herbicida, algodão tolerante a herbicida, algodão *Bt*/tolerante a herbicida e milho *Bt*/tolerante a herbicida) ocuparam 4% da área global cultivada com transgênicos em 2002 (JAMES, 2002).

### 2.5.6. Transgênicos no Brasil

A regulamentação do plantio e uso dos transgênicos no Brasil ainda não está definida, mas prevalece a decisão judicial que proíbe a produção e a comercialização de produtos geneticamente modificados no país até que sejam definidas regras e normas de rotulagem adequadas. A comercialização de produtos importados no país contendo resíduos de transgênicos também é ilegal (CIOCCARI, 2003).

O Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003, estabelece que, na comercialização de alimentos e ingredientes alimentares, tanto nos produtos embalados quanto nos produtos a granel ou *in natura*, o rótulo da embalagem ou do recipiente em que estão contidos deverá constar uma das seguintes expressões: “(nome do produto) transgênico”, “contém (nome do ingrediente ou ingredientes) transgênico(s)” ou “produto produzido a partir de (nome do produto) transgênico”. No caso de alimentos e ingredientes alimentares que não contenham nem sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados será facultada a rotulagem (DECRETO, 2003).

Segundo estimativas da Associação Brasileira dos Produtores de Sementes (ABRASEM), o maior índice de utilização de sementes de soja transgênica ocorre no Rio Grande do Sul. Pelas estimativas da Abrasem, baseadas nas quedas de vendas de sementes fiscalizadas, o estado plantou, na safra 2002/2003, apenas 25% da área de soja com sementes fiscalizadas/certificadas (MATO, 2003).

No Brasil, o cultivo da soja transgênica está proibido por uma liminar judicial. No entanto, cultivos clandestinos de soja transgênica têm sido identificados, sobretudo no Rio Grande do Sul, usando sementes contrabandeadas da Argentina. Estima-se que nesse estado 70% da produção de 2003 tenha sido de soja transgênica. Em outros estados, como Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, já existe o plantio, ainda que em pequenas áreas, cujas sementes são contrabandeadas da Argentina e também do Paraguai (GUIMARÃES, 2003). Devido a esse plantio considerado ilegal, o governo brasileiro emitiu a Medida Provisória 113, de

26 de março de 2003, liberando a comercialização da soja transgênica da safra 2002/2003, autorizando a sua venda até 31 de janeiro de 2004 (MEDIDA, 2003).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARY, R.; SERIN, A.; MAURY, D.; 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: p. 235 – 244, 2002.

ANKLAM, E.; HEINZE, P.; KAY, SIMON & Van den Eede, G. Validation studies and proficiency testing. **Journal of AOAC International**. v. 85, n. 3, p. 809 – 815, 2002.

BARROS, E. G. Detecção de resíduos de transgênicos em alimentos. In: BORÉM, A. et al. (ed.). Alimentos Transgênicos. p. 127 – 143. Universidade Federal de Viçosa. 2000.

BARROS, E. G. & MOREIRA, M.A. Alimentos transgênicos. **Química e Derivados**. n. 385, Agosto/2000, p. 12 – 20, 2000.

BERGER, G. U. Uso de plantas transgênicas e seus benefícios para a agricultura. In: BORÉM, A. et al. (ed.). Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade intelectual na agropecuária. **BIOWORK I**. p. 59-69, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C., ed. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 309p., 1998.

BRASILEIRO, A. C. M. & DUSI, D. M. A. Transformação Genética de Plantas. In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, v. 2. Brasília: EMBRAPA – SPI. p. 679 - 736, 1999.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**. 25: p. 169 – 193, 2000.

CIOCCARI, V. Produtos brasileiros usam ingredientes transgênicos. Disponível em: <[http:// www.cesamep.hpg.ig.com.br/bdalitra.htm](http://www.cesamep.hpg.ig.com.br/bdalitra.htm)>. Acesso em 26 junho 2003.

COSTA, N.M.B & BORÉM, A. Biotecnologia e nutrição. São Paulo: Editora Nobel. 214 p., 2003.

CRESPO, M. T.B.; PERES, C.M.; PEREIRA, C.I. & RODRIGUES, F.S. Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. Disponível em: <[http://dequim.ist.utl.pt/bbio/69/pdf/detecção\\_OGMs\\_em\\_alimentos.pdf](http://dequim.ist.utl.pt/bbio/69/pdf/detecção_OGMs_em_alimentos.pdf)>. Acesso em 18 abril 2003.

Decreto nº 4.680, de 24.04.2003. Disponível em: [http://www.mct.gov.br/legis/decretos/4680\\_2003.htm](http://www.mct.gov.br/legis/decretos/4680_2003.htm). Acesso em 22 agosto 2003.

DUIJN, G.; BIERT, R.; MARCELIS, H. B.; PEPPELMAN, H. & HESSING, M. Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**. 10: p. 375 – 378, 1999.

DUIJN, G.; BIERT, R.; MARCELIS, H. B.; BOEIJEN, I.; ADAN, A. J.; JHAKRIE, S. & HESSING, M. Detection of genetically modified organisms in foods by protein – and DNA – based techniques: bridging the methods. **Journal of AOAC International**. v. 85, n. 3, p. 787 – 791, 2002.

EHLERS, B.; STRAUCH, E.; GOLTZ, M.; KUBSCH, D.; WAGNER, H.; MAIDHOF, H.; BENDIEK, B.; APPEL, B. & BUHK, H. J. Identification of

genetically modified maize by PCR. **Bundesgesundheitsblatt**. 4/97, p. 118-121, 1997.

GACHET, E.; MARTIN, G. G.; VIGNEAU, F. & MEYER G. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. **Trends in Food Science & Technology**. 9: p. 380 – 388, 1999.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R. & MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**. 25: p. 386-401, 2001.

GUIMARÃES, J.S. Plantio de soja transgênica avança e supera o da tradicional. Disponível em: < [http:// www.srb.org.br/index.php3?news=1856](http://www.srb.org.br/index.php3?news=1856)>. Acesso em 21 junho 2003.

GUT, M.; LEUTENEGGER, C. M.; HUDER, J. B.; PEDERSEN, N. C. & LUTZ, H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. **Journal of Virological Methods**. 77: p. 37-46, 1999.

HARDEGGER, M.; BRODMANN, P. & HERRMANN, A. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. **Food Res. Technol**. 209: p. 83 – 87, 1999.

HEID, C. A.; STEVENS, S. J.; LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Res**. 6: p. 986-994, 1996.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R. & GELFAND, D. H. Detection of specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5' – 3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 88, p. 7276-7280, 1991.

HORSCH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMAN, N. L.; EICHOLTZ, D.; ROGERS, S. G. & FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**. 227: p. 1229 – 1231, 1985.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2002. ISAAA Briefs n. 27, International Services for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, New York. 2002.

JORDAN, J. A. Real-time detection of PCR products and microbiology. Disponível em: <[http://webcd.usal.es/web/transgen00/Unidades/documen01/transgenicos-pdf/real\\_timedet.pdf](http://webcd.usal.es/web/transgen00/Unidades/documen01/transgenicos-pdf/real_timedet.pdf)>. Acesso em 18 abril 2003.

KOK, E. J.; AARTS, H. J. M.; VAN HOEF, A. M. A. & KUIPER, H. A. DNA Methods: Critical Review of Innovative Approaches. **Journal of AOAC International**. v. 85, n. 3, p. 797 – 800, 2002.

KOPPEL, E.; STADLER, M.; LUTHY, J. & HUBNER, P. Sensitive method for the detection of the genetically engineered soybean Roundup Ready<sup>TM</sup>. **Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.** 88, p. 164-175, 1997.

Mato Grosso é o que mais utiliza sementes de soja fiscalizadas. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/atual/mtsemfis.htm>>. Acesso em 15 julho 2003.

Medida Provisória nº 113, de 26.03.2003. Disponível em: <[http://www.mct.gov.br/legis/mp/mp113\\_2003.htm](http://www.mct.gov.br/legis/mp/mp113_2003.htm)>. Acesso em 22 agosto 2003.

RECH, E. L. & ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília – DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenargen. 309p., 1998.

TACCHINI, P. & WALBOT, V. Transformation of plants. **Nestlé Research News**. p. 19 – 29, 1986.

VAITILINGOM, 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 Food Chemistry**. 47: p. 5261 – 5266, 1999.

WISEMAN, G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**. V. 85, n. 3, p. 792 – 796, 2002.

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

ZIMMERMANN, A.; HEMMER, W.; LINIGER, M.; LUTHY, J. and PAULI, U. A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested PCR-system. **Lebensm. Wiss. u. Technol**. 31: p. 664 – 667, 1998.

**DETECÇÃO, PELO LABORATÓRIO DE ANÁLISES GENÉTICAS, DE  
RESÍDUOS DE TRANSGÊNICOS EM SOJA GRÃO, FARELO E RAÇÃO  
NO PERÍODO DE 2000 a 2002**

**RESUMO**

A demanda por análises de resíduos de transgênicos em matérias-primas e em alimentos no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos, principalmente após a constatação do cultivo ilegal da soja transgênica resistente ao herbicida glifosato nos estados do sul do país. A maior parte dessas análises tem sido demandada por empresas exportadoras de grãos de soja e produtos derivados para os países da Europa e Japão. Este trabalho objetivou fornecer uma visão sobre a comercialização de soja transgênica e produtos derivados, farelo e ração, no Brasil, com bases em amostras analisadas que foram enviadas por várias empresas, durante os anos de 2000 a 2002, ao Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, empresa incubada no sistema de Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa. Para isso, foram analisadas, neste trabalho, amostras de soja em grão, e farelo de soja e de rações à base de soja, sendo o método utilizado nas análises o da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). O DNA das amostras foi extraído usando-se o “kit” Wizard PCR Preps (PROMEGA). “Primers” específicos foram empregados na detecção do gene RR (Roundup Ready), do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e da região terminadora NOS. Como controle foi utilizada uma seqüência específica constituída pela região do gene que codifica a proteína de reserva lectina de soja. Como resultados foram identificadas, no ano de 2000, amostras positivas apenas em soja grão (77,8%) e farelo de soja (22,2%). Em 2001, 70,8% das amostras positivas foram de soja grão, 12,5% de farelo de soja e 16,7% de rações à base de soja. Já, em 2002, 34,9% das amostras positivas foram de soja em grãos, 45% de farelo de soja e 20,1% de ração à base de soja. Os resultados indicaram que a demanda na AgroGenética por análises em produtos derivados de grãos de soja (farelo e ração) cresceu significativamente no período de 2000 a 2002, no Brasil, e também que esses produtos derivados (farelo e ração) tiveram aumento crescente na porcentagem de transgênicos nesse período.

## INTRODUÇÃO

A área global estimada de culturas transgênicas em 2002 foi de 58,7 milhões de hectares. No período de 1996 a 2002, a área global de cultivos transgênicos aumentou de 35 vezes, passando de 1,7 milhão de hectares em 1996 para 58,7 milhões em 2002. Essa alta taxa de adoção reflete a crescente aceitação dos transgênicos pelos produtores (James, 2002).

O complexo soja (grão, farelo e óleo) foi um dos principais destaques da balança comercial do agronegócio brasileiro em 2002, quando as exportações do setor atingiram US\$ 6 bilhões. Com a safra recorde de soja estimada em 50,3 milhões de toneladas, projetaram-se para o ano de 2003, exportações de US\$ 7,78 bilhões em todo o complexo soja (Exportações, 2003).

Segundo os registros de exportação concedidos pela Secretaria de Comércio Exterior (Secex) foram registradas exportações de 15,1 milhões de toneladas de soja em grão até o final de maio de 2003, volume 66,7% superior ao registrado no mesmo período em 2002. As exportações de farelo de soja atingiram 7,93 milhões de toneladas até o final de maio de 2003, 31,8% acima do volume registrado no mesmo período, em 2002 (Registros, 2003).

A necessidade de monitorar e verificar a presença e a quantidade de organismos geneticamente modificados (OGMs) nas culturas agrícolas e nos produtos derivados tem gerado grande demanda por métodos analíticos capazes de detectar, identificar e quantificar o DNA introduzido, ou a(s) proteína(s) expressa(s) na planta transgênica. Métodos analíticos adequados não são necessários apenas para produtos agrícolas ainda não processados, mas também para ingredientes processados e altamente refinados (Anklam & Neumann, 2002).

No Brasil, a demanda por análises de resíduos de transgênicos em matérias primas e em alimentos tem aumentado significativamente nos últimos dois anos, sobretudo após a detecção do cultivo ilegal de variedades de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato nos estados do sul do

país, destacando-se o Rio Grande do Sul. Inicialmente, essa demanda era exclusiva para atender ao mercado de exportação de grãos e de produtos derivados, principalmente o mercado europeu. No momento, existe uma demanda crescente por essas análises também para atender o mercado interno de comercialização de alimentos.

Este trabalho objetivou analisar o comércio de soja transgênica e produtos derivados (farelo e ração) no Brasil, com base em amostras analisadas, que foram enviadas por várias empresas, durante os anos de 2000 a 2002, ao Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, empresa incubada no sistema de Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa, credenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material analisado**

O material utilizado nas análises do presente trabalho constituiu-se de amostras de grãos de soja, farelo e rações à base de soja enviadas, para análise, a AgroGenética, durante os anos de 2000 a 2002. A maior parte dessas análises foi e continua sendo, demandada por empresas exportadoras de grãos de soja e produtos derivados para a Europa e o Japão. Amostras de soja sabidamente transgênicas e não-transgênicas também tiveram seu DNA analisado junto com o material em estudo, sendo utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente (padrões certificados FLUKA).

### **Amostragem**

As amostras foram coletadas pelas empresas e enviadas, para análise, na AgroGenética. No processo de coleta, amostras compostas foram formadas, das quais, uma de aproximadamente 1 kg, foi enviada para

análise. O número de amostras simples utilizadas na composição da amostra composta foi em função do tamanho do lote que representavam.

### **Preparo, extração e quantificação do DNA**

Após seu recebimento, as amostras contendo aproximadamente 1,0 kg foram homogeneizadas e, 250 gramas foram pesados e moídos até se transformarem em um pó fino. Deste, três sub-amostras, cada uma contendo 200 mg, foram utilizadas na extração de DNA. Este foi extraído pelo “Kit” Wizard PCR Preps (PROMEGA), segundo as recomendações do fabricante.

Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria, no equipamento SmartSpec 3000 Spectrophotometer (BioRad). Em seguida, foi diluído para uma concentração de 100 ng/ $\mu$ L, sendo utilizados cerca de 300 ng desse DNA para cada reação de PCR.

### **Amplificação e análise do DNA das amostras**

Foram utilizadas três condições diferentes de amplificação, sendo cada uma delas ajustada para permitir amplificação, com *primers* específicos, das seqüências comumente encontradas em organismos geneticamente modificados. As seqüências analisadas foram as seguintes: (1) a região do promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor); (2) uma região compreendida entre o promotor 35S e a seqüência do gene EPSPS (específica para amostras contendo a soja RR - Roundup Ready); e (3) a seqüência terminadora NOS, do gene da nopalina sintase. Como controle endógeno, utilizou-se uma seqüência específica dentro da região codificadora do gene que codifica a proteína de reserva lectina de soja. As amostras foram amplificadas pela técnica de PCR, no termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 9600 PCR system (Applied Biosystems).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% contendo 10 mg/mL de brometo de etídio imerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Os fragmentos de DNA

foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com o sistema Eagle Eye II (Stratagene) de fotodocumentação.

## RESULTADOS

No presente estudo foram escolhidos três produtos (soja em grão, farelo e ração à base de soja), para se ter uma visão da demanda por análises e do nível de utilização e presença de soja transgênica na matéria-prima (farelo de soja) e em alimentos (rações) de grande importância, principalmente para animais monogástricos, comercializados no mercado interno brasileiro e enviados para exportação, durante o período de 2000 a 2002. Esses três produtos, soja em grão, farelo e rações à base de soja, tiveram um comportamento bastante interessante ao longo dos três anos analisados. A Figura 1 ilustra a análise eletroforética do produto de amplificação (fragmento de 180 pb) obtido com o *primer* RR de DNA extraído de soja RR e de amostras de DNA de soja RR. A Figura 2 mostra a tendência de demanda das análises realizadas para cada produto ao longo dos três anos amostrados.

No ano de 2000, a maior demanda por análises de resíduos de transgênicos foi de soja em grão, sendo 73,9% das análises realizadas com este produto. O farelo de soja ficou em segundo lugar, com 23,3% ; e a ração à base de soja, com apenas 2,8% do total analisado. A demanda por análises de soja em grão foi novamente maior em 2001 (55,2%); o farelo de soja continuou em segundo lugar, com 23,6%. O destaque foi para as amostras de ração à base de soja, as quais aumentaram para 21,2% em 2001. Em 2002, a demanda por análises de soja em grão foi novamente maior, sendo esse valor de 47,2%. O farelo de soja continuou em segundo, atingindo 35,2% das análises, e a ração à base de soja permaneceu em terceiro lugar, com 17,6% da demanda (Figura 2).

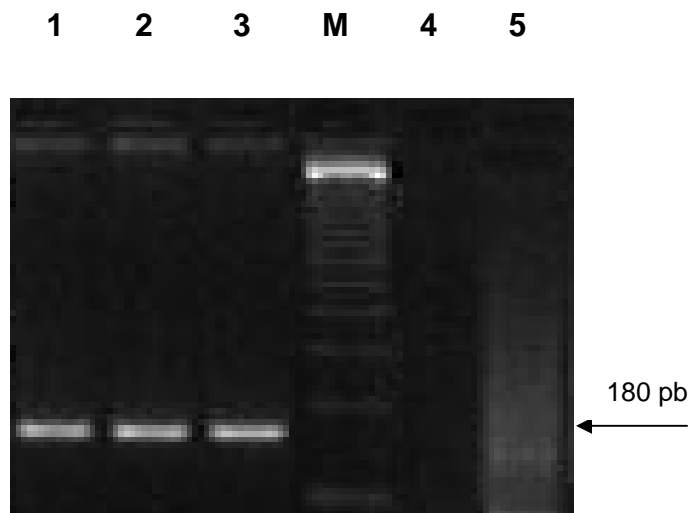


Figura 1 - Análise eletroforética do produto de amplificação obtido com o *primer* RR (fragmento de 180 pb). A coluna 1 corresponde ao DNA de soja RR, colunas 2 e 3 (DNA de amostra positiva para soja RR), coluna 4 (branco) e coluna 5 (DNA de soja normal). A coluna M corresponde ao DNA do fago lambda (marcador de peso molecular).

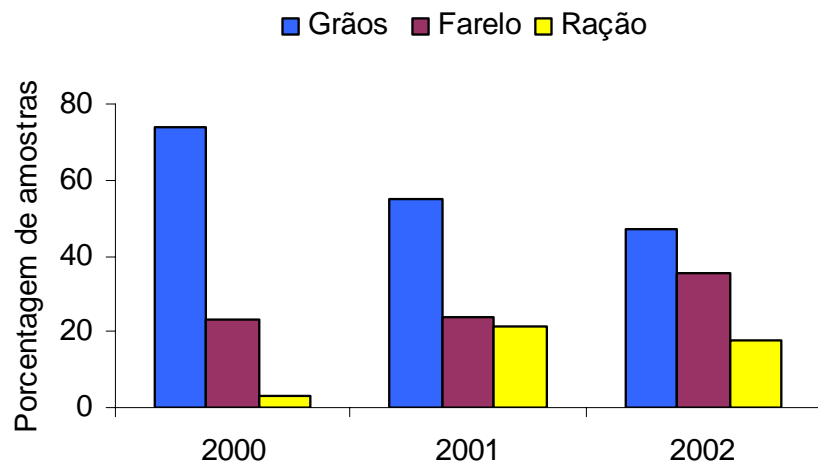


Figura 2. Proporção percentual da demanda de análise de resíduos de OGMs realizadas pelo Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética em soja em grão, farelo de soja e ração à base de soja ao longo dos anos de 2000, 2001 e 2002.

## Soja em grão

As análises de resíduos de OGMs em amostras de soja em grão foram as que obtiverem maior demanda no ano de 2000 (Figura 2). No entanto, das amostras de grãos analisadas em 2000, apenas 13% foram consideradas transgênicas (Figura 3). Essas amostras foram enviadas a AgroGenética por empresas de inspeção de soja e farelo, que são credenciadas para realizarem vários testes nesses produtos e fornecerem laudos de qualidade destes em atendimento às normas de importação de diferentes países europeus. A presença de resíduos de transgênicos foi detectada apenas em amostras de soja em grão, sendo isso talvez justificado devido ao fato desse produto ter sido o de maior demanda para análises no ano de 2000.

No ano de 2001, a proporção de análises de soja em grão novamente foi maior do que nos outros produtos (Figura 2), embora tenha sido proporcionalmente menor do que no ano de 2000. Das amostras de soja em grãos analisadas em 2001, 35,4% foram transgênicas (Figura 3), demonstrando um aumento de aproximadamente três vezes a proporção de soja transgênica de 2001 em relação ao ano de 2000.

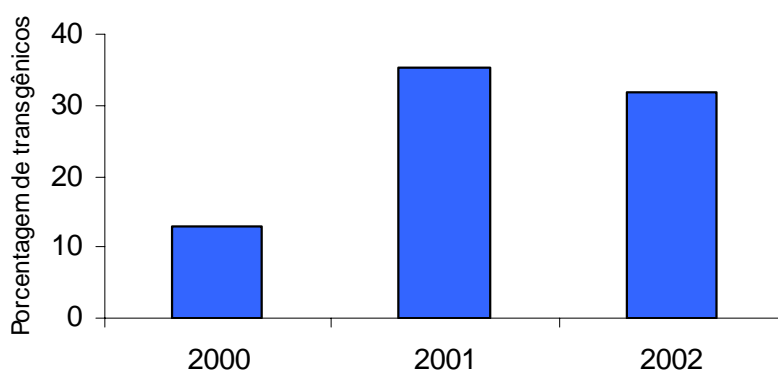


Figura 3 - Porcentagem de amostras transgênicas detectadas nas amostras de soja em grãos recebidas pelo Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, ao longo dos anos de 2000, 2001 e 2002.

Em 2002, o percentual de análises de soja em grão foi menor do que nos anos de 2000 e 2001 (Figura 2). A porcentagem detectada de transgênicos em grãos de soja foi menor em 2002 quando comparada com 2001, atingindo aproximadamente 31,7% das amostras de soja grão analisadas (Figura 3).

Embora a proporção da demanda por análises de soja em grão tenha diminuído ao longo dos anos de 2000, 2001 e 2002, o número de amostras de soja em grão analisadas aumentou, tendo em vista que essa proporção é calculada em relação aos três produtos analisados, soja em grão, farelo e ração (Fonte: AgroGenética/2003). Assim, além do número de amostras de soja em grão para análise ter aumentado ao longo desses três anos, este foi acompanhado pelo incremento no número de amostras que deram resultados positivos com relação à presença de OGM nos anos de 2000 e 2001, conforme pode ser visto na Figura 3.

### **Farelo de soja**

No ano de 2000, 23,3% do total das análises realizadas foram em amostras de farelo de soja, sendo o segundo produto com maior demanda de análise (Figura 2). Das amostras analisadas nesse ano, 11,8% foram transgênicas (Figura 4). Da mesma forma que para a soja em grão, as amostras de farelo foram, em sua maioria, enviadas a AgroGenética para análises por empresas de inspeção, credenciadas para tal, bem como para o fornecimento de laudos, em grãos e farelo de soja, requeridos pelos importadores, em sua maioria os países europeus.

A proporção de análises em farelo de soja foi ligeiramente maior no ano de 2001 em relação a 2000 (Figura 2). No entanto, em 2000 apenas 11,8% das amostras de farelo de soja analisadas foram transgênicas, enquanto no ano de 2001, das amostras de farelo analisadas, 14,6% eram transgênicas (Figura 4). A baixa porcentagem de resíduos de transgênicos nesse farelo em 2000 pode ser devida ao fato de que a quantidade de soja transgênica comercializada no país ainda era pequena, oriunda da safra

colhida naquele ano, o que é coerente com a baixa porcentagem de resíduos de transgênicos (13%) detectados na soja em grão no referido ano (Figura 3).

A segunda maior demanda proporcional por análises de transgênicos no ano de 2002 foi do farelo de soja (Figura 2), com 35,2% do total das análises realizadas. Das análises de farelo de soja nesse ano, 54,7% foram transgênicas (Figura 4). Esse aumento na porcentagem de transgênicos em amostras de farelo de soja foi bastante coerente com o da demanda por análises desse produto (Figura 2).

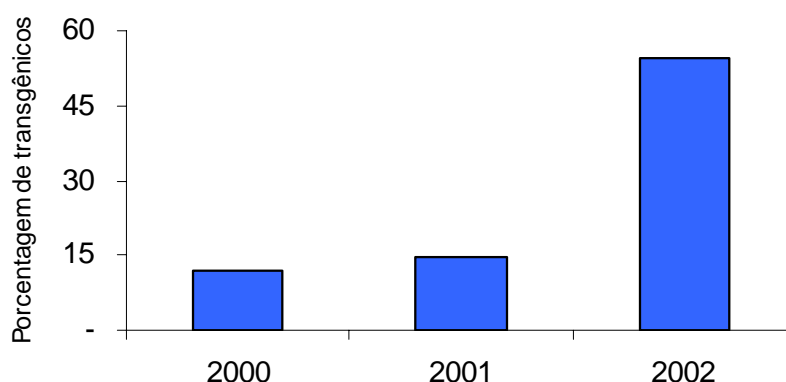


Figura 4 - Porcentagem de amostras transgênicas de farelo de soja do total de amostras enviadas para análise no Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética nos anos de 2000, 2001 e 2002.

Embora no ano de 2000 apenas 11,8% das amostras de farelo de soja analisadas tenham sido transgênicas, os anos seguintes apresentaram um comportamento bem diferente desse produto. Em 2001, 14,6% das amostras de farelo foram transgênicas, já no ano de 2002 aproximadamente a metade (54,7%) foi transgênica. A porcentagem de amostras transgênicas de farelo de soja detectada em 2002 foi bem superior à encontrada na soja em grão nesse mesmo ano (Figuras 3 e 4), embora a proporção de amostras analisadas tenha sido maior de soja em grão (Figura 2).

## **Ração à base de soja**

Em 2000, não foi detectada nenhuma amostra de ração à base de soja contendo resíduos de transgênicos (Figura 5). Tal resultado pode ser atribuído à pequena proporção de análises para esse produto naquele ano, a qual foi de aproximadamente 2,8% (Figura 2).

No ano de 2001, 21,6% das amostras de ração à base de soja analisadas foram transgênicas (Figura 5), sendo a proporção porcentual de amostras de rações analisadas também bem maior, atingindo cerca de 21,2% (Figura 2). Assim, esse aumento na porcentagem de resíduos de transgênicos em rações foi coerente com a maior demanda por análises desse produto no referido ano.

A demanda por análises de ração à base de soja foi menor do que a de soja em grão e farelo de soja ao longo dos três anos analisados (Figura 2). Do total de amostras de ração examinadas em 2002, aproximadamente 49% destas foram transgênicas (Figura 5).

Embora a demanda por análises de ração à base de soja tenha sido menor do que a de soja em grão e farelo de soja ao longo dos três anos analisados, ela foi crescente ao longo de 2000 e 2001 (Figura 2). O crescimento na demanda por análises de rações foi acompanhado pelo aumento na porcentagem de amostras de rações contendo resíduos de transgênicos ao longo dos anos avaliados (Figura 5). Os resultados indicam que, com o incremento na demanda por análises de rações, houve também aumento na porcentagem de amostras de rações transgênicas (Figura 5).

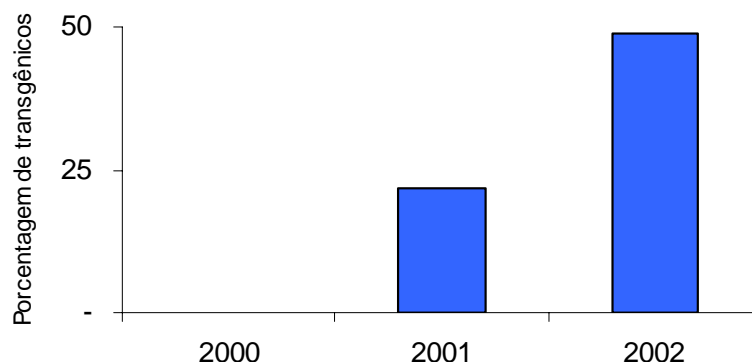


Figura 5 - Porcentagem de amostras transgênicas nas amostras de ração a base de soja enviada para análise no Laboratório de Análises Genéticas ao longo dos anos de 2000, 2001 e 2002.

## DISCUSSÃO

Dos três itens analisados no presente estudo, soja em grão, farelo de soja e ração à base de soja, apenas o farelo teve aumento crescente na demanda por análises ao longo dos três anos avaliados (Figura 2). A soja em grão, embora proporcionalmente, tenha tido diminuição na demanda por análises ao longo dos anos estudados (Figura 2), foi o produto que teve o maior número de amostras analisadas no período de 2000 a 2002.

A demanda, em termos proporcionais, por análises em grãos de soja foi diminuindo ao longo dos três anos avaliados (Figura 2). Entretanto, a porcentagem de amostras transgênicas não teve o mesmo comportamento, sendo ela crescente ao longo dos anos de 2000 e 2001 (Figura 3). Em 2002, a proporção de análises em grãos de soja foi maior que aquela em farelo de soja (Figura 2). No entanto, mesmo assim a porcentagem de grãos de soja transgênicos ainda foi menor que a de farelo transgênico (Figuras 3 e 4).

O farelo de soja teve 11,8% de amostras transgênicas em 2000. Entre 2001 e 2002, houve crescimento acentuado de amostras de farelo de soja transgênica, chegando a aproximadamente 54,7% em 2002 (Figura 4). Essa

alta porcentagem de amostras de farelo de soja transgênicas pode ser atribuída à grande demanda por análises registrada para esse produto nesse ano (Figura 2). A porcentagem de amostras de farelo de soja transgênicas foi crescente ao longo dos três anos avaliados, atingindo, em 2002, mais da metade das demais analisadas (Figura 4).

De maneira diferente aos demais itens, as amostras de ração à base de soja analisadas no ano de 2000 foram todas não transgênicas (Figura 5). Já em 2001 e 2002 foram detectadas amostras transgênicas de forma crescente entre esses dois anos (Figura 5). A não detecção de amostras de ração transgênica em 2000 pode ser devida ao fato de que, nesse ano, apenas 2,8% das amostras analisadas foram de ração ou, ainda, ao fato de o farelo de soja transgênica não ter sido utilizado na produção de ração naquele ano.

Os resultados do presente estudo evidenciam que a demanda por análises de produtos derivados de soja tem aumentado ao longo dos anos (Figura 2), indicando o interesse das empresas em analisar não somente soja em grão, mas também seus derivados (farelo e ração). Além disso, a porcentagem de amostras transgênicas também aumentou significativamente nesses produtos derivados, conforme pode ser visto nas Figuras 4 (farelo) e 5 (ração).

O complexo soja (grão, farelo e óleo) é o mais importante da pauta de exportações do agronegócio brasileiro, com 22% do total exportado em 2001, passando a 25% em 2002 (Estudo, 2003). A indústria avícola, principal consumidora de farelo de soja do país, teme restrições da União Européia, que absorve 27% das exportações brasileiras e proíbe a importação de frango alimentado com ração transgênica (MP, 2003).

O Brasil deverá assumir, em 2003, a posição de maior exportador mundial de soja, superando pela primeira vez os Estados Unidos. O país deverá exportar 37,4 milhões de toneladas de produtos do complexo soja, seguido dos Estados Unidos com 33,9 milhões de toneladas e da Argentina com 32,4 milhões (Liderança, 2003). No caso da soja, projetam-se exportações de US\$ 7,78 bilhões para todo o complexo soja para o ano de 2003 (Exportações, 2003). Quanto ao farelo de soja, o maior comprador

brasileiro é a União Européia, com seus 15 países membros, para onde cerca de 70% do farelo de soja nacional é destinado (China, 2003).

Nos Estados Unidos, desde a introdução da soja transgênica, o seu volume de exportações de grãos de soja para a Europa caiu de 9,2 milhões de toneladas em 1996 para 6,8 milhões em 2000. No Brasil, as exportações de grãos de soja não transgênica para a Europa, nesse período, aumentaram de 3,1 milhões para 6,3 milhões de toneladas (Miklasevicius, 2003).

A produção mundial de soja é dominada por três países, Estados Unidos, Brasil e Argentina, que juntos respondem por 90% da produção mundial. O Brasil é o único em que a produção de soja geneticamente modificada ainda não foi liberada (Bardou, 2003). Assim, o país por ser um grande produtor e exportador desse produto, e ao não plantar soja transgênica poderá ter vantagens econômicas na comercialização de sua safra, principalmente para os mercados europeu, chinês e japonês, em que a comercialização de transgênicos em grão ou na forma de derivados ainda não é permitida.

Os resultados do presente estudo evidenciam aumento crescente de amostras transgênicas de soja em grão, farelo de soja e ração à base de soja no período de 2000 a 2002, demonstrando que o Brasil tem cultivado soja transgênica de forma ilegal em suas áreas de cultivo com soja ou, então, parte dessa soja está sendo contrabandeada de países que a cultivam, a exemplo da Argentina.

Deve-se considerar também que, no caso do farelo de soja e das rações à base deste produto, a presença de soja transgênica pode ser devida à mistura, uma vez que, no processo de obtenção de tais produtos pelas indústrias, ocorre, inevitavelmente, a miscelânea de grãos de soja adquirida de vários produtores, o que pode levar à contaminação de lotes. Assim, no caso das indústrias de processamento e de alimentos à base de soja, uma possível garantia de uso de soja não transgênica seria iniciada pela adoção de medidas de rastreabilidade já no momento da aquisição de grãos oriundos de vários produtores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anklam, E. & Neumann, D. A. Method development in relation to regulatory requirements for detection of GMOs in the food chain. **Journal of AOAC International**. v. 85, n. 3, p. 754 – 756, 2002.
- Bardou, A. Projeto proíbe transgênicos no Paraná. Disponível em: <[http://www.jornadadeagroecologia.com.br/news\\_detail.asp?cod=207](http://www.jornadadeagroecologia.com.br/news_detail.asp?cod=207)>. Acesso em 16 julho 2003.
- China é a “chave” para a soja brasileira na Ásia. Disponível em: <<http://br.news.yahoo.com/021212/13/9ovf.html>>. Acesso em 17 julho 2003.
- Estudo de comércio e preferências tarifárias concedidas pelos Estados Unidos aos países das Américas. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/spa/complexo\\_soja.htm](http://www.agricultura.gov.br/spa/complexo_soja.htm)>. Acesso em 14 julho 2003.
- Exportações do complexo soja devem crescer 30%. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/indicadoresrurais/2003/janfev/balanca.htm>>. Acesso em 25 junho 2003.
- James, C. Global status of commercialized transgenic crops: 2002, ISAAA Briefs, n. 27, Preview, International Services for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY,. 24 p., 2002.
- Liderança I – Brasil já é o maior exportador do complexo soja do mundo. Disponível em: <<http://www.global21.com.br/materias/materia.asp?cod=4541&tipo=noticia>>. Acesso em 10 julho 2003.

Miklasevicius, J. Proibição de transgênicos beneficia Brasil, diz Greenpeace.

Disponível em:

<<http://www.estadao.com.br/ciencia/noticias/2002/jun/10/252.htm>>.

Acesso em 17 julho 2003.

MP dos transgênicos sofre críticas. Disponível em:

<<http://www.anbio.gov.br/noticiasepressas>>. Acesso em 20 julho 2003.

Registros mostram exportações aceleradas em 2003. Disponível em:

<[http://www.massey.com.br/portugues/commodity\\_destaque.asp?idcategoria=44&nome=soja](http://www.massey.com.br/portugues/commodity_destaque.asp?idcategoria=44&nome=soja)>. Acesso em 14 julho 2003.

# OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS CÁRNEOS PARA ANÁLISES QUANTITATIVAS DE OGMs

## RESUMO

Em geral, com alimentos processados é mais difícil obter quantidades significativas de DNA em condições de serem analisadas quanto à presença de OGMs, pois esses alimentos possuem níveis variados de processamento, incluindo tratamentos físicos, químicos e enzimáticos. Tratamentos térmicos, atividades enzimáticas ou valores de pH ácidos podem ocasionar a fragmentação e outras modificações do DNA. Assim, o presente trabalho teve como objetivo ajustar uma metodologia de extração de DNA em produtos alimentícios processados cárneos para análise quantitativa. Para isso foram testadas modificações em dois métodos de extração de DNA, o método Wizard (Promega) e o PrepMan Ultra (Applied Biosystems). As modificações no método Wizard incluíram o uso de um volume 1,5 vez maior de tampão de extração, maior tempo de incubação e a eluição final do DNA em um volume menor do que o recomendado pelo fabricante. No método PrepMan Ultra, foram testados dois volumes diferentes do reagente de extração, 200 e 400  $\mu\text{L}$ . Foram analisados diversos produtos alimentares cárneos, visando identificar a presença de DNA de soja na sua composição. A reação de PCR em tempo real foi realizada usando o sistema ABI Prism SDS 7000 (Applied Biosystems). Todas as modificações nos métodos de extração permitiram a amplificação do DNA, no entanto as alterações no método Wizard indicaram maior eficiência na extração de DNA. As modificações no PrepMan Ultra não evidenciaram efeito significativo, em que o uso do menor volume do reagente de extração foi mais eficiente na extração de DNA. Os resultados permitiram concluir que as modificações propostas no método Wizard possibilitaram maior eficiência na extração de DNA em produtos alimentícios cárneos.

## INTRODUÇÃO

A necessidade de monitorar tanto a presença quanto a quantidade de organismos geneticamente modificados (OGMs) nas culturas agrícolas e nos produtos derivados tem gerado a demanda por métodos analíticos capazes de detectar, identificar e quantificar o DNA introduzido ou a(s) nova(s) proteína(s) expressa(s) na planta transgênica. Métodos analíticos adequados não são necessários apenas para produtos agrícolas *in natura*, mas também para ingredientes processados e altamente refinados, nos quais a detecção de OGMs é mais difícil (Anklam & Neumann, 2002).

Com exceção dos ingredientes *in natura* (grãos e farelo), a maioria das amostras de alimentos contém material com nível variado de processamento industrial, incluindo tratamentos físicos, químicos e enzimáticos. Esses tratamentos degradam e modificam o DNA e, ou, a proteína presente na amostra. Incluem tratamentos térmicos prolongados, que resultam na degradação do DNA e na desnaturação de proteínas, depurinação e hidrólise do DNA em baixos valores de pH e, ou, degradação enzimática (Terry et al., 2002).

Dois métodos de isolamento de DNA são correntemente usados na maioria dos materiais *in natura*, como soja, milho e derivados como lecitina de soja, óleo e produtos alimentícios. Um deles é o método do CTAB, baseado em protocolos clássicos, em que as amostras alimentares são incubadas na presença de CTAB (detergente) e desproteinizadas com clorofórmio e o DNA, precipitado com isopropanol. O outro método, Wizard – Promega, usa uma resina que se liga ao DNA para purificá-lo diretamente de uma solução obtida depois dos tratamentos enzimático com proteinase K e químico com SDS da amostra alimentar (Meyer, 1999).

No processo de detecção de transgênicos, o objetivo é determinar se um produto contém resíduos de transgenes ou de suas proteínas, podendo ser utilizada para isso a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) ou ensaios imunobiológicos como o de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) em material *in natura*. O ensaio imunobiológico é baseado na ligação

específica entre uma proteína e um anticorpo. Assim, qualquer mudança conformacional na estrutura do epítipo da proteína levará a um teste ineficaz. As mudanças conformacionais são induzidas freqüentemente durante o processamento dos alimentos, por essa razão, os alimentos processados são geralmente analisados por PCR (Van Den Eede et al., 2002).

Na detecção de transgênicos por meio da análise do DNA, o procedimento de PCR quantitativo que usa os sistemas ABI Prism (PCR em tempo real) tem-se mostrado preciso e pouco trabalhoso. Tal procedimento, também conhecido como TaqMan, é baseado no uso de sondas fluorescentes que hibridizam dentro da seqüência alvo flanqueada por *primers* específicos (Vaitilingom et al., 1999).

### **Considerações sobre o PCR em tempo real**

A reação no PCR em tempo real baseia-se no uso de sondas fluorescentes que hibridizam dentro da seqüência alvo flanqueada por *primers* específicos (Vaitilingom et al., 1999). São duas sondas utilizadas, uma para o controle endógeno, a qual hibridiza dentro de uma seqüência do gene constitutivo que codifica para a proteína de reserva lectina de soja. A outra sonda é específica para hibridizar dentro de uma seqüência de DNA presente em OGMs, sendo essa seqüência correspondente ao promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor) (Alary et al., 2002). A sonda no sistema endógeno é marcada com o corante fluorescente VIC<sup>TM</sup> e, no 35S, com o corante 6-carboxi-fluoresceína (FAM). Esse “kit” é comercializado pela Applied Biosystems.

No presente estudo, a sonda de interesse é então, aquela que hibridiza dentro da seqüência presente no gene constitutivo (gene da proteína lectina de soja), isto é, no sistema endógeno, a qual permite determinar a quantidade de DNA total que foi submetida ao PCR através dos valores obtidos de Ct para o corante fluorescente VIC<sup>TM</sup>. Esse valor de Ct é definido como sendo o ciclo no qual o sinal fluorescente ultrapassa a linha de corte (Wiseman, 2002).

Este trabalho objetivou ajustar uma metodologia de extração de DNA para produtos alimentares processados cárneos para posterior detecção quantitativa de OGMs pelo procedimento TaqMan. Para isso foram testadas modificações em dois métodos de extração de DNA, o método Wizard (Promega) e o PrepMan Ultra (Applied Biosystems).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Produtos alimentares analisados**

Os produtos alimentares analisados foram: mortadelas Bolognella e Confiança suína, almôndegas bovina e de frango, salsichas Viena e Hot Dog, carne de ave empanada, mini chicken turma da Mônica, Chester lanche, presunto Perdigão e hambúrguer bovino.

### **Amostragem**

As amostras analisadas de cada produto consistiram de aproximadamente 1 kg cada, sendo todas do mesmo lote ou da mesma data de fabricação. No processo de amostragem, todas as amostras foram coletadas de uma única vez, tendo sua embalagem totalmente fechada e nenhuma delas com data de validade vencida.

### **Preparo das amostras**

Inicialmente, as amostras foram descongeladas e moídas no processador de alimentos Master R 17633 (Walita) até se transformarem em uma massa fina e uniforme. Dessa massa, duas sub-amostras, cada uma de 300 mg aproximadamente, foram usadas para a extração de DNA pelo método Wizard (Promega). Da mesma forma, quatro sub-amostras, cada uma contendo 20 mg, foram utilizadas na extração com o PrepMan Ultra (Applied Biosystems).

## **Composição dos alimentos analisados**

Os produtos cárneos analisados no presente estudo continham na sua composição ingredientes à base de soja. Assim, todos os produtos cárneos foram examinados para verificar a possível presença de soja transgênica em sua composição, caracterizando o alimento como não transgênico ou transgênico, conforme o caso.

## **Extração de DNA**

O DNA utilizado no presente estudo para testar a eficiência na extração dos métodos avaliados foi o DNA de soja, que faz parte da composição dos produtos cárneos analisados, embora no processo de extração se obtenha DNA total. Na extração de DNA foram utilizadas as metodologias Wizard (Miniprep) e PrepMan Ultra, sendo testada algumas modificações em cada uma dessas técnicas, de acordo com as descrições a seguir:

### **(1) Extração pelo método Wizard modificado**

Foram pesados 300 mg das amostras em um microtubo de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 1.290 µL do tampão de extração contendo Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; SDS 1%; 150 µL de guanidina-HCl 5 M; e 60 µL de proteinase K (20 mg/mL). As amostras foram misturadas com o auxílio de um Vortex por dois minutos até sua completa homogeneização. Em seguida, as amostras foram mantidas sob agitação a 55 °C/180 rpm, por uma noite. Após o período de incubação, foram colocadas sob a bancada, a fim de atingir a temperatura ambiente, sendo, logo após, centrifugadas a 14.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C, por 15 minutos. Uma seringa de 3 mL foi encaixada a uma minicoluna Wizard, e esse conjunto foi acoplado ao aparelho *Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold* (Promega). Depois da centrifugação, 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo contendo 1 mL de resina Wizard

e misturado, com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, essa mistura foi transferida para o conjunto seringa acoplada à minicoluna aplicando-se vácuo no aparelho *Vac Man* até que todo o líquido passasse pela coluna, para que o DNA ligado à resina ficasse retido. Foram adicionados 2 mL de isopropanol 80% à seringa e aplicado vácuo novamente. Em seguida, o conjunto seringa – minicoluna foi retirado do *Manifold* e a minicoluna, separada e colocada em um novo microtubo de 2 mL e centrifugado por dois minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, a minicoluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, adicionando-lhe 50 µL de água milliQ autoclavada aquecida a 70 °C. Depois de dois minutos, a minicoluna presa ao microtubo foi centrifugada por dois minutos a 14.000 rpm, sendo em seguida descartada e a solução contendo DNA armazenada a 4 °C.

Após a extração, o DNA foi submetido a uma diluição em água de 1:10 (7 µL de DNA: 63 µL de água) e quantificado em espectrofotômetro SmartSpec 3000 Spectrophotometer (BioRad). Na reação de PCR quantitativo foram utilizados 5 µL da solução contendo DNA.

## **(2) Extração pelo método PrepMan Ultra (PMU)**

A extração de DNA pelo método PrepMan Ultra foi realizada utilizando dois volumes diferentes do reagente PrepMan Ultra, 200 e 400 µL, conforme descrição a seguir. A recomendação do fabricante é o uso de 200 µL do reagente em produtos crus, ou levemente processados como o farelo. Como este não era o caso, foram testados volumes diferentes do reagente, objetivando uma maior eficiência no processo de extração de DNA.

Aproximadamente 20 mg da amostra moída foram pesados em um microtubo de 2 mL, adicionando-lhe 200 ou 400 µL do reagente PrepMan Ultra. A extremidade superior dos microtubos de 2 mL foi vedada com plástico parafilme “M”, de modo a evitar possível contaminação da amostra. Em seguida, as amostras foram misturadas em vórtex até sua completa ressuspensão. No passo seguinte, foram fervidas por 15 minutos, sendo agitadas manualmente a cada cinco minutos. Após este período, as amostras foram então retiradas e resfriadas a temperatura ambiente por 5

minutos. Em seguida, foram centrifugadas por cinco minutos a 14.000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415 C, após o que foram removidos 100 µL do sobrenadante para um novo microtubo e armazenado a 4 °C até a sua utilização no PCR em tempo real.

### **Preparo das reações**

As reações foram preparadas em câmara de fluxo laminar. Todo o material utilizado no preparo das reações foi inicialmente limpo com papel umedecido em álcool e posteriormente submetido a uma esterilização na câmara de fluxo laminar sob luz ultravioleta, por 10 minutos. Todo o material usado no preparo das reações foram separados dos demais, a fim de evitar possíveis contaminações. As pipetas eram exclusivamente usadas nas reações de PCR em tempo real, as ponteiros continham filtro protetor, e as placas de reação de PCR eram descartáveis.

### **PCR em tempo real**

A reação de PCR em tempo real foi realizada usando o sistema ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A reação foi realizada em um volume de 50 µL, o qual continha 44 µL de TaqMan GMO Mix (Applied Biosystems), incluindo os oligonucleotídeos e os *primers*, dNTPs e sondas, específicos para o controle endógeno e para a seqüência correspondente ao promotor 35S do CaMV; 1 µL da AmpliTaq Gold DNA polimerase (5U/µL) e 5 µL de DNA. As condições de reação foram as seguintes: uma etapa inicial a 94 °C por 10 minutos, para ativação da enzima; e 40 ciclos de PCR nas seguintes condições: 95 °C por 20 segundos, 60 °C por um minuto e 72 °C por 30 segundos. No PCR em tempo real, duas regiões foram analisadas, a região do promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor), que está presente na maioria dos OGMs comercializados; e uma seqüência endógena de DNA, a qual faz parte da seqüência codificadora do gene para a proteína de reserva da soja lectina (controle endógeno).

## RESULTADOS

Foram avaliadas modificações em dois métodos de extração de DNA, o método Wizard (Promega) e o método PrepMan Ultra (Applied Biosystems), com o objetivo de permitir maior eficiência na extração de DNA de produtos alimentícios. Os alimentos analisados continham, na sua composição, ingredientes à base de soja, sendo analisados 11 produtos alimentícios diferentes.

Inicialmente, apenas dois produtos alimentícios foram estudados com as modificações nos métodos de extração de DNA propostas, sendo eles as salsichas dos tipos Viena e Hot Dog.

As recomendações do método Wizard são para produtos em pó, como grãos de soja e de milho moídos (Spoth e Strauss, 2003). Assim, como o material analisado neste estudo são produtos alimentícios que apenas possuem, na sua composição, ingredientes que possam conter OGMs, as modificações propostas nos métodos tiveram como objetivo aumentar a eficiência na extração de DNA.

### **Extração pelo método Wizard modificado**

No PCR em tempo real, uma maneira de saber se a quantidade de DNA que foi colocada na reação é suficiente para permitir uma análise que forneça segurança nos resultados obtidos é por meio da avaliação do valor de Ct para o VIC<sup>TM</sup> (controle endógeno da reação).

Nos dois produtos inicialmente analisados, salsichas Viena e Hot Dog, a concentração de DNA obtida foi suficiente para permitir sua amplificação pela técnica de PCR em tempo real. Os valores de Ct para o VIC<sup>TM</sup> (controle endógeno/lectina) ficaram entre 25,80 e 26,18 ciclos (média de 26) para a salsicha Viena e entre 25,50 e 26,70 ciclos (média de 26,10) para a Hot Dog (Quadro 1). Esses valores indicaram, portanto, que a quantidade de DNA na reação foi satisfatória, uma vez que, em amostras de DNA extraídas de grãos e farelo de soja analisadas no laboratório, os valores do Ct de VIC<sup>TM</sup> ficaram em torno de 24 ciclos (Applied Biosystems-comunicação pessoal).

Quadro 1 – Valores do Ct de VIC™ médios encontrados na reação de PCR em tempo real para as amostras de salsichas Viena e Hot Dog.

<b>Produto</b>	<b>Método de extração</b>	<b>Ct VIC<sup>1</sup></b>	<b>Ct VIC<sup>2</sup></b>
Salsicha Viena	Wizard	25,80	26,00
		26,18	
Salsicha Hot Dog	Wizard	26,70	26,10
		25,50	
Salsicha Viena	PrepMan Ultra (200 µL)	28,50	28,45
		28,40	
	PrepMan Ultra (400 µL)	29,50	30,20
		30,90	
Salsicha Hot Dog	PrepMan Ultra (200 µL)	29,30	29,30
		29,30	
	PrepMan Ultra (400 µL)	29,90	30,95
		32,00	

<sup>1</sup>- Média obtida de cada repetição de extração (duplicata de reação).

<sup>2</sup>- Média total da amostra (duplicata de extração).

Após a extração e análise do DNA das salsichas Viena e Hot Dog, por meio da reação de PCR em tempo real, os outros produtos também tiveram seu DNA extraído pelo método Wizard, com as mesmas modificações. Os resultados obtidos dos novos produtos foram semelhantes aos encontrados nas salsichas Viena e Hot Dog, indicando, assim, que as modificações propostas no método de Wizard também podem ser aplicadas na extração de DNA desses produtos (Quadro 2).

Quadro 2 – Valores do Ct de VIC™ médios encontrados na reação de PCR em tempo real para produtos cárneos utilizando o método Wizard.

<b>Produto</b>	<b>Ct VIC <sup>1</sup></b>	<b>Ct VIC <sup>2</sup></b>
Mortadela Bolognella	26,20 26,60	26,40
Mortadela Confiança Suína	23,70 24,20	23,95
Almôndega Bovina	24,05 24,20	24,10
Almôndega de Frango	26,70 26,50	26,60
Carne de Ave Empanada	25,20 24,80	25,00
Mini Chiken Turma da Mônica	23,20 25,90	24,55
Chester Lanche	25,32 25,80	25,60
Presunto Perdigão	24,50 23,60	24,00
Hamburger Bovino	24,60 23,99	24,30

<sup>1</sup>- Média obtida de cada repetição de extração (duplicata de reação).

<sup>2</sup>-Média total da amostra (duplicata de extração).

## Extração pelo método PrepMan Ultra

De maneira semelhante à extração pelo método Wizard, apenas as amostras de salsichas Viena e Hot Dog foram estudadas quanto às modificações propostas na extração de DNA pelo PrepMan Ultra. A extração de DNA utilizando o PrepMan Ultra havia sido otimizada apenas em grãos de soja e farelo, sendo o volume do reagente sugerido pelo fabricante na extração de DNA de 200  $\mu\text{L}$  para 20 mg de pó da amostra. Assim, como os produtos analisados no presente estudo são diferentes de amostras na forma de pó, dois volumes do reagente de extração de DNA foram avaliados, 200 e 400  $\mu\text{L}$ .

Amostras de DNA de salsicha Viena extraídas com 200  $\mu\text{L}$  do PrepMan Ultra tiveram valores de Ct variando de 28,40 a 28,50 ciclos (média de 28,45) (Quadro 1) para o controle endógeno (VIC<sup>TM</sup>). Tais valores foram maiores que aqueles obtidos na extração pelo método Wizard. Na extração com 400  $\mu\text{L}$  do PrepMan, o Ct de VIC<sup>TM</sup> foi ainda maior que o encontrado com 200  $\mu\text{L}$ , variando de 29,50 a 30,90 ciclos (média de 30,20) (Quadro 1).

As amostras de DNA extraídas de salsicha Hot Dog com 200  $\mu\text{L}$  do PrepMan também apresentaram um Ct de VIC<sup>TM</sup> maior (média de 29,30 ciclos) que o encontrado na extração com o método Wizard. Amostras de DNA extraídas com 400  $\mu\text{L}$  do reagente, além de mostrar maiores valores para o Ct de VIC<sup>TM</sup> que aqueles encontrados com 200  $\mu\text{L}$ , foram maiores que os obtidos na extração realizada com 400  $\mu\text{L}$ , na amostra de salsicha Viena. O Ct de VIC<sup>TM</sup> na extração com 400  $\mu\text{L}$  do reagente na amostra de salsicha Hot Dog variou de 29,90 a 32,0 ciclos (média de 30,95) (Quadro 1).

De maneira semelhante ao resultado obtido na extração de DNA nas amostras de salsichas com o método Wizard, os valores do Ct de VIC<sup>TM</sup> encontrados na extração de DNA com 200 e 400  $\mu\text{L}$  do PrepMan Ultra indicaram que a quantidade de DNA na reação foi satisfatória, uma vez que, em amostras de grãos e farelo de soja analisadas no laboratório, os valores do Ct de VIC<sup>TM</sup> ficaram em torno de 24 ciclos. Tais resultados evidenciam

que houve extração de DNA das amostras de salsichas nos dois volumes testados, porém a quantidade (concentração) de DNA extraída foi menor em comparação com o método Wizard, o que pode ser observado pelo maior valor do Ct de VIC™ obtido com o método PrepMan Ultra.

Como o método Wizard mostrou-se mais eficiente na extração de DNA das amostras de salsichas Viena e Hot Dog, ele foi testado nos demais produtos analisados no presente estudo (Quadro 2). O método PrepMan Ultra não foi testado nos demais produtos avaliados por ter apresentado menor eficiência na extração de DNA.

O método Wizard mostrou ser eficiente na extração de DNA nos demais produtos analisados, com os valores do Ct de VIC™ variando de 23,95 (mortadela Confiança suína) a 26,60 (almôndega de frango) (Quadro 2). Os valores do Ct de VIC™ de todos os produtos ficaram próximos dos encontrados nas salsichas Viena e Hot Dog (Quadro 1). Os resultados indicaram que o método Wizard, com as modificações propostas, também foi eficiente na extração de DNA dos demais produtos cárneos.

## DISCUSSÃO

Os dois métodos de extração testados com modificações, Wizard e PrepMan Ultra, foram otimizados e indicados para serem usados na extração de DNA de amostras classificadas como material *in natura*, isto é, aquelas cuja estrutura básica é um pó. No entanto, o material analisado no presente estudo constitui-se de produtos alimentícios, em que a quantidade do DNA alvo presente é muito pequena, necessitando, assim, de aperfeiçoamento nessas metodologias, a fim de aumentar sua eficiência na extração de DNA.

As alterações realizadas nos dois métodos no presente estudo permitiram que os dois métodos de extração de DNA possam ser utilizados, através de modificações na recomendação feita por seus fabricantes. Essas modificações na metodologia básica de extração tiveram como finalidade

melhorar a eficiência de cada método, bem como verificar qual deles permitiria maior eficiência na extração de DNA em alimentos cárneos.

Os valores encontrados para o Ct de VIC<sup>TM</sup> com o método PrepMan Ultra foram maiores que os obtidos com o Wizard nas duas amostras de salsichas analisadas, Viena e Hot Dog. Além disso, esses valores foram maiores quando foi utilizado 400 µL do reagente PrepMan Ultra. Com o volume de 200 µL, os valores foram menores, mas mesmo assim superiores àqueles encontrados pelo método Wizard modificado (Quadro1). Resultados semelhantes foram observados quando se analisaram os outros alimentos que também fizeram parte do presente estudo.

Na análise dos resultados da reação no PCR em tempo real com amostras de grãos e farelo de soja, os valores de Ct de VIC<sup>TM</sup> ficaram em torno de 24. Esse valor serve como referência para uma possível comparação entre metodologias de extração de DNA, em que o valor do Ct de VIC<sup>TM</sup> apresentado por cada método permite a dedução sobre qual metodologia apresenta maior eficiência na extração de DNA. Assim, comparando os resultados do presente estudo, pode-se concluir que as modificações realizadas no método Wizard permitiram maior eficiência na extração de DNA. Embora os valores para o Ct de VIC<sup>TM</sup> encontrados pelo método Wizard tenham sido menores que aqueles encontrados no PrepMan Ultra (Quadro 1), mesmo assim estes ainda foram maiores do que os valores observados em amostras de grãos e farelo de soja analisadas no laboratório.

Os valores do Ct de VIC<sup>TM</sup> encontrados pelo método Wizard, por estarem acima do normalmente conseguido em amostras de grãos e farelo de soja, indicaram a necessidade de se obterem amostras de DNA mais concentradas para serem usadas na reação. Uma maneira de aumentar a concentração de DNA nas amostras seria através da sua eluição final em volume menor. Assim, a eluição do DNA presente na minicoluna Wizard passou a ser feita em um volume de 30 µL. Essa redução no volume de eluição permitiu concentrar o DNA, fazendo com que o valor de VIC<sup>TM</sup> em todas as amostras analisadas (Quadro 2), ficasse próximo do valor encontrado em amostras de grãos e farelo de soja (Ct de VIC<sup>TM</sup> próximo de

24), embora alguns produtos tenham apresentado valores de VIC™ em torno de 26 (Quadro 2).

O método Wizard, segundo recomendações do fabricante, também foi testado na extração de DNA de amostras de tofu, farelo de soja e lecitina. Os resultados indicaram que a utilização do método, tal como recomendado, resultou em baixa extração de DNA para análise por PCR nesses produtos (Zimmermann et al., 1998, citado por Meyer, 1999). No entanto, o método Wizard mostrou ser eficiente na extração de DNA de grãos moídos de quatro variedades diferentes de milho (Brodmann et al., 2002).

No método Wizard, as recomendações do fabricante incluem a utilização de 860 µL do tampão de extração, 100 µL de Guanidina-HCl e 40 µL de Proteinase K. O tempo de incubação recomendado é de três horas. Essas recomendações são para amostras de grãos de soja e de milho moídas (Spoth & Strauss, 2003).

As modificações no método Wizard propostas no presente estudo incluíram o uso de um volume 1.290 µL do tampão de extração, 150 µL de Guanidina-HCl e 60 µL de Proteinase K, maior tempo de incubação (durante a noite) e a eluição final do DNA em volume menor (30 µL). No método PrepMan Ultra, foram testados dois volumes diferentes do reagente de extração, 200 e 400 µL. No método Wizard, as modificações permitiram uma maior eficiência na extração de DNA de produtos cárneos, em comparação com as modificações no PrepMan Ultra.

As modificações propostas para o método Wizard foram feitas por se tratar de produtos cárneos, cuja a quantidade de DNA de interesse é pequena. Assim, o uso de volume maior dos reagentes teve como objetivo aumentar o potencial de extração dos mesmos, permitindo maior extração. Já o maior tempo de incubação (durante a noite) teve como objetivo permitir melhor atuação da proteinase K, uma vez que os produtos analisados contêm alto teor de proteína. Por fim, o DNA foi eluído em um volume menor (30 µL) permitindo maior concentração do DNA extraído dos produtos cárneos em análise.

O objetivo do procedimento de extração é o de isolar DNA de integridade adequada, pureza e quantidades suficientes para permitir as

análises subseqüentes (Terry et al., 2002). Assim, os resultados permitem concluir que a extração de DNA de produtos cárneos utilizando o método Wizard, com as modificações propostas, foi mais eficiente que a extração usando o PrepMan Ultra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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: p. 235 – 244, 2002.
- ANKLAM, E. & NEUMANN, D. A. Method development in relation to regulatory requirements for detection of GMOs in the food chain. **Journal of AOAC International**. v. 85, n. 3, p. 753 – 756, 2002.
- BRODMANN, P. D.; ILG, E. C.; BERTHOUD, H. & HERRMANN, A. Real – time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. **Journal of AOAC International**. v. 85, n. 3, p. 646 – 653, 2002.
- MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. **Food Control**. 10: p. 391 – 399, 1999.
- SPOTH, B. & STRAUSS, E. Screening for genetically modified organisms in food using Promega's wizard resin. Disponível em: <[http://www.promega.com/pnotes/73/8235\\_23/8235\\_23.pdf](http://www.promega.com/pnotes/73/8235_23/8235_23.pdf)>. Acesso em 20 julho 2003.
- 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**. v. 85, n. 3, p. 768 – 774, 2002.
- VAITILINGOM, 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 Food Chemistry**. 47: p. 5261 – 5266, 1999.

VAN DEN EEDE, G.; KAY, S. & ANKLAM, E. Analytical challenges: Bridging the gap from regulation to enforcement. **Journal of AOAC International**. v. 85, n. 3, p. 757 – 761, 2002.

WISEMAN, G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**. v. 85, n. 3, p. 792 – 796, 2002.

# ANÁLISE DE SEMENTES DE SOJA TRANSGÊNICA UTILIZADAS NO PLANTIO DA SAFRA 2002/2003 PELOS PRINCIPAIS ESTADOS PRODUTORES

## RESUMO

A área global com transgênicos em 2002 continuou a crescer pelo sexto ano consecutivo, a uma taxa de mais de 10% ao ano, atingindo, em 2002, 58,7 milhões de hectares. No Brasil, o plantio comercial e o consumo de transgênicos estão suspensos, no entanto plantios clandestinos de soja transgênica têm sido identificados, sobretudo nos estados do sul do país. Este trabalho teve como objetivo analisar as sementes de soja fiscalizadas e certificadas que foram utilizadas no plantio da safra 2002/2003 quanto à presença de soja transgênica. Foram analisadas sementes de soja dos principais estados produtores, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e também de Minas Gerais. Analisaram-se 2.466 amostras, sendo 42% do Mato Grosso, 39,5% do Rio Grande do Sul, 8,4% do Paraná e 10,1% de Minas Gerais. O método utilizado nas análises foi o da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). *Primers* específicos foram utilizados para detectar uma região compreendida entre o promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor) e a seqüência do gene EPSPS (específica para soja RR). Como controle foi utilizada uma seqüência específica constituída pela região do gene que codifica a proteína de reserva lectina de soja. Foi detectada a presença de sementes de soja transgênica apenas no Estado do Rio Grande do Sul, onde 19,69% das amostras oriundas de laboratórios de análise de sementes daquele estado foram transgênicas. No Paraná, Mato Grosso e Minas Gerais não foi detectada a presença de sementes fiscalizadas e certificadas de soja transgênica. Os resultados confirmam a posição do Estado do Rio Grande do Sul como o maior produtor brasileiro de soja transgênica. Também apontam claramente para uma alta correlação entre a utilização de sementes de soja fiscalizada com a origem não transgênica da soja. Dessa forma, é fortemente recomendado que se viabilize o uso de soja fiscalizada como altamente relevante no processo de rastreabilidade do complexo soja brasileiro.

## INTRODUÇÃO

Apesar da grande resistência por alguns países, especialmente nórdicos, em adquirir alimentos transgênicos, estudos têm evidenciado que o plantio da soja geneticamente modificada tem crescido ao longo dos anos em vários países e em proporção maior que a área cultivada com a semente tradicional (Guimarães, 2003). No ano agrícola de 2002, a área global estimada com transgênicos ou organismos geneticamente modificados (OGMs) foi de cerca de 58,7 milhões de hectares, plantados por 5,5 a 6 milhões de fazendeiros em 16 países, em contraste com aproximadamente 5 milhões de fazendeiros e 13 países em 2001 (James, 2002).

Juntos, quatro países principais plantaram 99% da área global com transgênicos em 2002. Os Estados Unidos cultivaram 39 milhões de hectares (66%), seguidos pela Argentina com 13,5 milhões de hectares (23%), pelo Canadá com 3,5 milhões de hectares (6%) e pela China com 2,1 milhões de hectares (4%). Em termos globais, em 2002 as quatro principais culturas geneticamente modificadas cultivadas foram a soja, ocupando 36,5 milhões de hectares (62% da área global), o milho com 12,4 milhões de hectares (21%), o algodão com 6,8 milhões de hectares (12%) e a canola com 3,0 milhões de hectares (5%) (James, 2002).

A Argentina, terceiro maior produtor mundial de soja, é um dos principais países produtores e exportadores do mundo da soja RR, com uma área atual estimada de 90 (Brum, 2003) a 100% (Guimarães, 2003) plantada com soja geneticamente modificada. Em termos proporcionais, trata-se da maior área plantada com soja RR no mundo, uma vez que nos Estados Unidos, na última safra (2002), cerca de 68% da área cultivada com soja foi plantada com variedades geneticamente modificadas (Guimarães, 2003).

Segundo dados do quarto levantamento realizado pela CONAB (abril/2003) no Brasil, os maiores estados produtores de soja são: Mato Grosso, com uma área estimada de 4,27 milhões de ha, Paraná com 3,562 milhões de ha, Rio Grande do Sul com 3,56 milhões de ha e Minas Gerais com 0,8 milhão de ha (Previsão, 2003).

No Brasil, o cultivo da soja transgênica está proibido por uma decisão judicial. No entanto, cultivos clandestinos de soja transgênica têm sido identificados, sobretudo no Rio Grande do Sul, usando sementes contrabandeadas da Argentina. Estima-se que, nesse estado, 70% da produção de 2003 seja de soja transgênica. Em outros estados, como Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, já existe o plantio, ainda que em pequenas áreas, cujas sementes são contrabandeadas da Argentina e também do Paraguai (Guimarães, 2003). Devido a esse plantio considerado ilegal, o governo brasileiro emitiu uma Medida Provisória nº 113, de 26 de março de 2003, liberando a comercialização da soja transgênica da safra 2002/2003, autorizando a sua venda até 31 de janeiro de 2004 (Medida, 2003).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a real situação do plantio de sementes fiscalizadas e certificadas de soja geneticamente modificada na safra 2002/2003, através da análise de sementes amostradas por laboratórios de análises de sementes dos Estados do Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Minas Gerais e por uma cooperativa de pesquisa e produção de sementes do Estado do Paraná.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material genético**

O material genético utilizado neste trabalho constitui-se de amostras de sementes de soja fornecidas pelos laboratórios de análises de sementes fiscalizadas e certificadas de soja de Minas Gerais (APSEMG - Associação dos Produtores de Sementes de Minas Gerais e GERMITEL Ltda.), Mato Grosso (APROSMAT - Associação dos Produtores de Sementes de MT), Rio Grande do Sul (UNILAB – Laboratório de Análise de Sementes Ltda.) e Paraná (COODETEC - Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda.). As amostras analisadas foram, na sua maioria, constituídas de sementes fiscalizadas e, em Minas

Gerais, também por sementes genéticas. Na Tabela 1 são listadas algumas características do material genético utilizado neste trabalho.

As amostras de soja analisadas originaram das principais variedades plantadas em Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso e Rio Grande do Sul, bem como representam os principais municípios/regiões produtoras de cada estado. As amostras de Minas Gerais continham em média 40 gramas cada (média de 250 sementes). As amostras do Mato Grosso continham em média 100 sementes. As amostras do Rio Grande do Sul continham em média 35 gramas (aproximadamente 230 sementes) e as do Paraná, em média, 120 sementes.

Tabela 1 – Dados referentes às amostras de sementes de soja para cada um dos estados analisados.

Características	Mato Grosso	Paraná	Rio G. do Sul	Minas Gerais
Número de variedades	23	29	-	23
Número de amostras	1035	208	975	248
Número de produtores	44	208	450	-

### Amostragem

Nos Estados do Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, as amostras foram originadas de sementes enviadas por produtores aos laboratórios de análises de sementes, visando à realização de análises de rotina, sendo as mais comuns o teste padrão de germinação, o teste de vigor (opcional) e as purezas física e varietal. Esses testes são requeridos para todas as três classes de sementes (básica, certificada e fiscalizada).

No Mato Grosso, as amostras de sementes de soja analisadas representam todas as regiões produtoras do estado e foram amostradas de mais de 4,0 milhões de sacas de sementes de soja da safra 2001/2002, as

quais foram utilizadas no plantio da safra 2002/2003. Em Minas Gerais foram amostrados 12 municípios produtores de soja e as 23 variedades mais plantadas no estado no ano agrícola 2002/2003. Também fizeram parte da análise alguns lotes de sementes genéticas.

No Rio Grande do Sul, as amostras de sementes foram enviadas pelo Laboratório UNILAB e originadas de contra-provas contidas nesse laboratório, representando um total de aproximadamente 11.000 amostras, que foram recebidas pelo referido laboratório para análises no ano de 2002. Nessas amostras, foi realizada uma amostragem, em que a cada cinco amostras, uma foi retirada e enviada para o presente estudo. No caso dos produtores que enviaram grandes quantidades de amostras, a amostragem foi feita a cada 10 amostras, em que uma foi retirada e enviada para análise. O número de produtores amostrados foi de aproximadamente 450, e todas as regiões produtoras do estado foram amostradas, com concentração maior na região de Passo Fundo e regiões próximas, abrangendo uma área compreendida em um raio de cerca de 250 km.

No Paraná, a coleta das amostras foi feita diretamente no momento do plantio, ao acaso, dentro de cada região, segundo sua proporção na área do estado, de forma proporcional e de acordo com a época de plantio de cada região. A amostragem foi realizada através do sistema “Drill Box Survey” (Clark e Porter, 1961), que consiste em retirar uma amostra de no mínimo 1kg da semente na caixa da plantadeira no momento do plantio. A Tabela 2 mostra as regiões do Paraná amostradas e o número de amostras coletadas.

### **Preparo das amostras**

Aproximadamente, 250 sementes de cada amostra de Minas Gerais, 120 de cada amostra do Paraná, 100 sementes de cada amostra do Mato Grosso e 230 de cada amostra do Rio Grande do Sul foram moídas, de forma a obter um pó bastante fino, e deste, duas sub-amostras, cada uma de 60 mg, foram usadas para a extração de DNA. As amostras do Estado do Paraná foram coletadas no momento do plantio, estando, assim, 47% delas

tratadas com fungicidas. Essas sementes foram inicialmente lavadas, secadas e, posteriormente, submetidas ao processo de moagem.

Tabela 2 – Área plantada de soja por região do Paraná na safra 2002/2003 e número de amostras coletadas.

Região	Área (ha)	%	Nº de amostras
Norte	980.420	28,8	47
Centro-Oeste	510.000	15,0	39
Noroeste	119.000	3,5	21
Oeste	824.200	24,2	39
Sudoeste	364.000	10,7	23
Sul	609.750	17,9	39
Total	3.407.370	100	208

Fonte: COODETEC - 2002

### Extração e quantificação do DNA

Na extração do DNA foi utilizada a seguinte metodologia, ajustada a partir de Lipp et al. (1999). Aproximadamente, 60 mg da soja moída foram pesados em um tubo de 1,5 mL e adicionados 500 µL de tampão CTAB (Tris 100 mM, pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; e CTAB 2%) e 7 µL de beta-mercaptoetanol. Em seguida, a amostra foi homogeneizada em agitador do tipo vórtex e incubada a 65 °C por 15 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 200 µL de clorofórmio:álcool – isoamílico (24:1) às amostras, que foram homogeneizadas novamente no vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm (centrífuga eppendorf 5415 C), por 10 minutos. Na seqüência, foram transferidos 200 µL do sobrenadante para um novo tubo e adicionados 150 µL de isopropanol e 70 µL de acetato de amônio 7,5 M. As amostras foram homogeneizadas manualmente, centrifugadas a 14.000 rpm por oito minutos, e o sobrenadante foi descartado, restando apenas o

precipitado, que foi lavado com 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante descartado e o “pellet” secado à temperatura ambiente. Após a secagem, o DNA foi ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de água.

Após a extração, o DNA foi submetido a uma diluição em água de 1:10 (7  $\mu\text{L}$  de DNA: 63  $\mu\text{L}$  de água) e quantificado no espectrofotômetro SmartSpec 3000 Spectrophotometer (BioRad). Em seguida, o DNA foi diluído para uma concentração de 100 ng/ $\mu\text{L}$ , sendo utilizados para análise 3  $\mu\text{L}$  dessa diluição (300 ng de DNA).

### **Amplificação e análise do DNA das amostras**

O DNA de cada amostra foi amplificado pela técnica de PCR em um termociclador geneAmp<sup>®</sup> 9600 PCR system (Applied Biosystems), na presença de dois pares de *primers* específicos em uma reação multiplex. As seqüências analisadas foram as seguintes: uma região compreendida entre o promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor) e a seqüência do gene EPSPS (específica para amostras de soja RR), dando um fragmento de 180 pb. Como controle endógeno, foi utilizada uma seqüência específica, constituída pela região do gene que codifica a proteína de reserva lectina de soja, dando um fragmento de 118 pb.

Amostras de soja sabidamente transgênicas e não transgênicas também tiveram seu DNA analisado junto com o material em estudo, sendo utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Uma amostra sem DNA (branco) também foi usada na reação de PCR.

As condições de amplificação foram as seguintes: uma etapa inicial a 95 °C por dois minutos. Em seguida, foram realizados 40 ciclos, consistindo de uma etapa de desnaturação do DNA (95 °C por 30 segundos), uma etapa de pareamento do *primer* ao DNA-molde (60 °C por 30 segundos) e uma etapa de extensão do fragmento (72 °C por um minuto). Finalmente, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C, por três minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3,0% contendo 10 mg/ml de brometo de etídio imerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com o sistema Eagle Eye II (Stratagene) de fotodocumentação.

## RESULTADOS

Foram analisadas 2.466 amostras de sementes de soja originadas dos principais estados produtores de soja (Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e também Minas Gerais). As amostras de DNA extraídas das sementes foram amplificadas pela técnica de PCR com os *primers* RR e de lectina em um sistema multiplex, conforme demonstrado na Figura 1. A Figura 2 mostra o número de amostras analisadas oriundas de cada um dos estados. As amostras representam sementes fiscalizadas e certificadas das principais variedades plantadas e que foram utilizadas, no plantio da safra 2002/2003, pelos produtores das várias regiões amostradas de cada estado.

Todas as amostras foram enviadas por laboratórios de análises de fiscalização e certificação de sementes de cada estado, exceto as do Paraná, que foram coletadas pela COODETEC no momento do plantio.

### Estado do Mato Grosso

O Estado do Mato Grosso, maior produtor de soja do país, teve 1.035 amostras de sementes de soja analisadas, o que representa 42% do total das amostras avaliadas. As amostras foram enviadas pela APROSMAT, representando 44 produtores e 23 variedades diferentes.

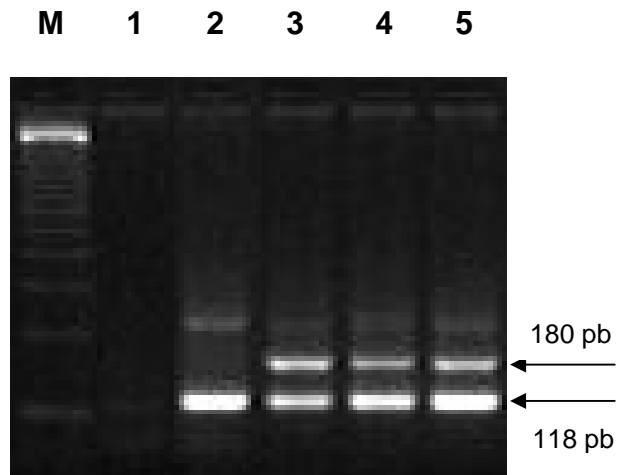


Figura 1 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação obtidos com os *primers* RR (180 pb) e lectina (118 pb). A coluna 1 corresponde ao controle sem DNA (branco), coluna 2 (DNA de soja normal), coluna 3 (DNA de soja RR), colunas 4 e 5 (DNA de amostras positivas para soja RR). A coluna M corresponde ao DNA do fago lambda (marcador de peso molecular).

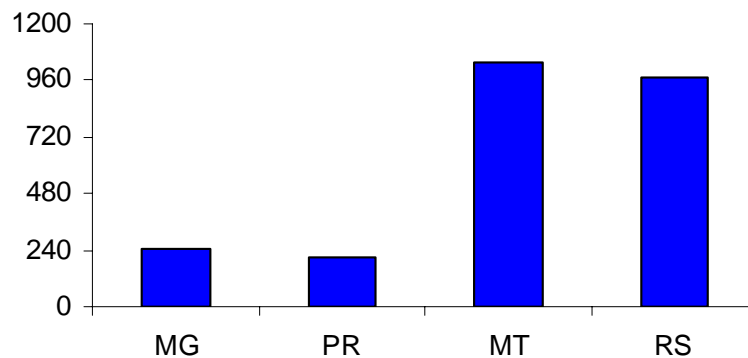


Figura 2. Número de amostras de sementes de soja fiscalizadas e certificadas analisadas por estado.

Todas as amostras de sementes de soja analisadas foram negativas para soja *Roundup Ready*, confirmando a hipótese de que os produtores de soja do Estado do Mato Grosso não têm ainda usado, em seus plantios

comerciais, sementes fiscalizadas e certificadas de soja transgênica. A maioria dos produtores plantou as mesmas variedades, o que tornou de grande valia as análises realizadas, observando-se uma coerência nos resultados obtidos, ou seja, todas as amostras analisadas foram negativas quanto à presença de soja transgênica.

Segundo informações obtidas da APROSMAT, cerca de 10% das sementes enviadas ao laboratório para análise são certificadas, e o restante (90%) representa sementes fiscalizadas. Todas as sementes analisadas no presente estudo foram portanto, fiscalizadas ou certificadas, em que 90% dos produtores do estado utilizam desses tipos de sementes em seus plantios comerciais.

O emprego de sementes fiscalizadas pelos produtores do Mato Grosso faz com que o estado tenha maior controle quanto ao uso de sementes de soja transgênica. Assim, os resultados do presente estudo são coerentes e importantes, indicando que, aquele produtor que utiliza sementes fiscalizadas/certificadas em seus plantios comerciais, terá uma safra de soja não transgênica.

Os resultados aqui obtidos são de grande importância para o Estado do Mato Grosso, pois, sendo atualmente o estado maior produtor de soja do país, torna-se interessante que sua grande produção seja ainda de soja não transgênica. Além disso, os resultados são também importantes para os laboratórios de análise de sementes e para os produtores de sementes do estado, dando credibilidade a quem produz e vende sementes de soja fiscalizada e certificada e segurança para quem compra.

### **Estado do Paraná**

O Estado do Paraná, segundo maior produtor de soja, teve 208 amostras analisadas, o equivalente a 8,4% do total examinado. As amostras foram coletadas por técnicos da COODETEC em suas regiões de atuação e enviadas para análise. Durante a coleta, a amostragem foi realizada através do sistema “Drill Box Survey” (Clark & Porter, 1961). Cada amostra

representa um produtor, logo, as sementes de soja cultivadas por 208 produtores foram amostradas e analisadas neste trabalho.

As amostras de sementes de soja foram coletadas em seis regiões do estado: norte, centro-oeste, noroeste, oeste, sudoeste e sul, de maneira proporcional à área plantada. As 208 amostras de sementes de soja analisadas representaram 29 variedades diferentes, que foram utilizadas no plantio da safra 2002/2003. As sementes utilizadas pelos agricultores amostrados foram de origem comercial, em sua maioria da classe fiscalizada, sendo a taxa de utilização de semente comercial estimada em 87,4% (Dados da COODETEC).

Todas as amostras de sementes de soja analisadas foram negativas para soja *Roundup Ready*, o que reflete a situação encontrada no momento da coleta das amostras, em que nenhum agricultor mostrou resistência à coleta. No Estado do Paraná, a maioria das sementes utilizadas pelos produtores para o plantio era da classe fiscalizada (87,4%). Diante disso, o resultado aqui obtido mostra-se coerente com essa informação, em que a utilização de sementes fiscalizadas pelos produtores garante uma safra livre de soja transgênica.

Embora o número de amostras de sementes de soja analisadas tenha sido pequeno, estas foram coletadas em seis regiões do estado, com um grande número de produtores e de maneira proporcional à área plantada, sendo a região norte a que teve maior número de amostras coletadas (Tabela 2).

### **Estado do Rio Grande do Sul**

O terceiro estado maior produtor de soja, Rio Grande do Sul, teve 975 amostras de sementes analisadas, representando 39,5% do total avaliado. Das 975 amostras analisadas, 192 foram positivas para soja *Roundup Ready*, o equivalente a 19,69% do total examinado no estado. Tal resultado pode ser considerado bastante representativo, uma vez que o número de amostras analisadas foi grande, principalmente pelo número de amostras por elas representadas (aproximadamente 11.000 amostras).

Segundo informação pessoal do diretor do UNILAB, aproximadamente 25% dos produtores que enviam amostras de sementes de soja para análise nesse laboratório solicitam somente análises da qualidade fisiológica (% de germinação) e não fiscalização ou certificação de sementes. Assim, esse valor (25%) é semelhante à porcentagem de sementes transgênicas encontradas no presente estudo, que foi de aproximadamente 20%, indicando que as amostras transgênicas encontradas neste estudo podem ser oriundas desses produtores, que solicitam somente análise da qualidade fisiológica de suas sementes.

Os resultados deste estudo são importantes tanto para os laboratórios de análise de sementes quanto para os produtores de sementes fiscalizadas do Estado do Rio Grande do Sul. Fica evidente, que os agricultores que utilizam sementes fiscalizadas em seus plantios muito provavelmente ainda não estão realizando plantios comerciais de soja transgênica.

### **Estado de Minas Gerais**

Minas Gerais teve 248 amostras de sementes de soja analisadas, o equivalente a 10,1% do total. Foram analisados, em média, 30 lotes diferentes de sementes enviadas para análise fiscalizadas da safra 2001/2002 para cada variedade examinada. Todas as amostras examinadas foram negativas para a presença de soja *Roundup Ready*, indicando que, muito provavelmente, o estado colherá, em 2003, uma safra livre de soja transgênica.

Segundo informações da APSEMG, em Minas Gerais cerca de 70% das sementes usadas para o plantio são da classe fiscalizada, e os 30% restantes são constituídos de grãos, em que o próprio produtor multiplica suas sementes e as utiliza para o plantio. Todas as amostras analisadas no presente estudo foram de sementes fiscalizadas, o que contribuiu para que nenhuma amostra de soja transgênica fosse encontrada. Assim, os resultados permitem concluir que os produtores que utilizaram sementes fiscalizadas para o plantio da safra 2002/2003, em Minas Gerais, colherão uma safra livre de soja transgênica.

## DISCUSSÃO

Dentre os três estados maiores produtores de soja do país, somente o Rio Grande do Sul (terceiro maior produtor) apresentou soja transgênica. No Mato Grosso, o número de amostras analisadas pode ser considerado representativo para o estado, o que não é verdade para o Paraná, onde o número de amostras analisadas foi pequeno. Minas Gerais, sexto maior produtor de soja do país, teve um número de amostras examinadas maior que o Paraná. Entretanto, as amostras oriundas desse estado foram coletadas no momento do plantio e distribuídas entre um grande número de produtores (208 propriedades), o que, de certa forma, torna os resultados bastante representativos, pelo menos nas regiões/municípios, onde as amostras de sementes de soja foram coletadas.

Estima-se que, no Rio Grande do Sul, cerca de 70% da produção de 2003 seja transgênica (Guimarães, 2003). No entanto, no presente estudo foram encontrados apenas 19,69% de soja transgênica. Provavelmente isso se deva ao fato de que as amostras aqui analisadas tenham sido enviadas por um laboratório de análises de sementes credenciado pelo Ministério da Agricultura, sendo estas, em sua maioria, da classe fiscalizada. Além disso, aproximadamente 25% dos produtores que enviam amostras de sementes de soja para análise nesse laboratório solicitam apenas análise de qualidade fisiológica (% de germinação) e não fiscalização ou certificação de sementes (UNILAB – comunicação pessoal). Assim, esse valor (25%) é semelhante à porcentagem de sementes transgênicas de cerca de 20% encontrada no presente estudo. Possivelmente, as amostras transgênicas desta pesquisa foram oriundas desses produtores que solicitam ao UNILAB apenas análises da porcentagem de germinação de suas sementes. A porcentagem estimada de 70% de soja transgênica no Rio Grande do Sul é, provavelmente, devida à utilização de sementes não fiscalizadas/certificadas pelos produtores, oriundas de sementes contrabandeadas da Argentina e multiplicadas pelo próprio produtor.

Segundo estimativas da Associação Brasileira dos Produtores de Sementes (ABRASEM), o maior índice de utilização de soja transgênica

ocorre no Rio Grande do Sul. Pelas estimativas da ABRASEM, baseadas nas quedas de vendas de sementes fiscalizadas, o estado irá plantar, na safra 2002/2003, apenas 25% da área de soja com sementes fiscalizadas/certificadas. Da soja não fiscalizada/certificada, 90% é transgênica, sendo o restante semente convencional, mas pirateada (Mato, 2003).

A questão da queda na comercialização de sementes fiscalizadas/certificadas no Rio Grande do Sul não é recente. Segundo dados da Abrasem, de 1998 a 2001 houve queda na relação entre o potencial de vendas de semente e a sua comercialização efetiva no estado. Até a safra de 1997/1998, o índice de utilização de sementes industrializadas foi sempre superior a 50% da demanda, passando, a partir de então, a ter um declínio no uso de sementes fiscalizadas/certificadas (Silvestrini e Coutinho, 2003).

Embora pelas estimativas da ABRASEM, o Rio Grande do Sul plantaria, na safra 2002/2003, em torno de 25% da área de soja com semente fiscalizada, essa ainda não é a realidade encontrada no estado. Segundo dados recentes da Entidade Certificadora e Fiscalizadora (ECF) do Rio Grande do Sul, a taxa de utilização de sementes fiscalizadas/certificadas no plantio da safra 2002/2003, foi da ordem de 19,07% (UNILAB – comunicação pessoal). Assim, a situação neste estado é mais crítica do que se imaginava, pois fica evidente que a comercialização de sementes fiscalizadas e certificadas foi abaixo do previsto pela ABRASEM, evidenciando que a grande maioria das sementes de soja utilizadas nos plantios comerciais no ano agrícola 2002/2003 pode ser transgênica.

Embora não tenha sido detectada a presença de soja transgênica nas amostras de sementes de soja analisadas no Paraná, no presente estudo três lavouras de soja transgênica foram interditas em 2003 pela Secretaria Estadual da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná – SEAB (Lavouras, 2003). A colheita, estimada em 80 toneladas, foi encontrada em pequenas propriedades, localizadas em Mangueirinha e Itapejara do Oeste, na região de Pato Branco e em São Pedro do Iguçu, na região de Toledo.

Segundo informações da SEAB, 95% da área plantada no Paraná, no ano agrícola 2002/2003, não possuía soja transgênica (Lavouras, 2003).

O Mato Grosso, segundo levantamento realizado pela ABRASEM, é o que mais utiliza sementes de soja fiscalizada, de modo que a presença de soja transgênica ainda deve ser pequena no estado. Na safra 2001/2002, 95% das sementes utilizadas no plantio foram de sementes comerciais (Mato, 2003). No presente estudo, as sementes analisadas foram todas da classe fiscalizada, não sendo encontrada nenhuma amostra transgênica. Assim, os resultados estão em concordância com a hipótese de que a utilização de sementes fiscalizadas ou certificadas pode reduzir a probabilidade de transgênicos na região.

Segundo dados do Instituto de Estudos Socioeconômicos (Inesc), quatro estados possuem plantios de soja transgênica. O Rio Grande do Sul, com 60% da safra sendo transgênica, 30% em Santa Catarina e pequenas porcentagens em Minas Gerais e no Paraná (Mesquita, 2003). Entretanto, no presente estudo a presença de soja transgênica foi detectada apenas no Estado do Rio Grande do Sul, onde, segundo estimativas da ABRASEM, o estado irá plantar, na safra 2002/2003, apenas 25% da área de soja com semente fiscalizada/certificada. No entanto, segundo dados recentes da Entidade Certificadora e Fiscalizadora (ECF) do estado, a taxa de utilização de sementes fiscalizadas/certificadas no plantio da safra 2002/2003 foi da ordem de 19,07%. A não detecção de soja transgênica em Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso pode ser devida ao fato de as amostras analisadas pertencerem à classe de sementes fiscalizadas. Além disso, deve-se considerar ainda que as amostras analisadas são de sementes de soja que foram enviadas para análise em laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura.

No caso do Paraná, deve-se ainda considerar que o estado possui uma área de produção de soja muito maior do que a de Minas Gerais. Segundo dados da SEAB/PR (2002), o estado possui um total de 190.000 propriedades agrícolas, das quais, estima-se que, cerca de 70.000 cultivem soja. Assim, pode ser que existam áreas com plantio de soja transgênica, estando essas limitadas a pequenas propriedades e que, provavelmente,

não tenham sido amostradas ou ainda o que é muito provável, que nesses plantios sejam utilizadas sementes próprias não fiscalizadas.

No caso das indústrias de processamento de soja, uma possível garantia de uso de soja não transgênica já iniciaria pela adoção de medidas que viabilizassem a separação, no momento da aquisição, de grãos de soja oriundos de produtores que utilizam sementes de soja fiscalizada ou certificada em seus plantios dos demais. A adoção de tal medida, que deveria fazer parte do processo de rastreabilidade, deixaria as indústrias muito mais seguras quanto ao tipo de grão de soja que estão processando, uma vez que o número de produtores, dos quais os grãos de soja são oriundos, pode ser muito grande, dependendo do estado produtor, podendo algum deles estar comercializando soja transgênica. Essa medida seria muito eficaz, uma vez viabilizada e implementada na aquisição de soja em todos os estados, com destaque para o Estado do Rio Grande do Sul, onde a taxa de utilização de sementes fiscalizadas/certificadas é a menor do país.

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que, dentro do universo amostrado, Minas Gerais e Mato Grosso não plantaram sementes de soja fiscalizada e, ou, certificada transgênica na safra 2002/2003, uma vez que nenhuma das amostras analisadas foi transgênica. No Paraná, também não foi detectada a presença de soja transgênica, possivelmente devido ao pequeno número de propriedades analisadas. Ainda no Paraná, a não detecção de soja transgênica pode se dar pelo fato de que 87,4% das amostras analisadas foram de sementes fiscalizadas. No entanto 19,69% das amostras de sementes de soja do Rio Grande do Sul na safra 2001/2002, que foram enviadas para análise em laboratório credenciado, foram transgênicas. Isso confirma a posição do Estado do Rio Grande do Sul como o maior produtor de soja transgênica do Brasil.

Atualmente, o único alimento transgênico produzido em larga escala é a soja RR. Apenas três países concentram mais de 95% da produção de soja transgênica: Estados Unidos, Argentina e Canadá. Até 2002, os Estados Unidos eram o maior produtor mundial de soja e começaram a ter problemas em exportar sua produção, uma vez que a maioria dos países proibiu a comercialização de soja transgênica. Na Europa e no Japão, por

exemplo, a soja transgênica não pode ser comercializada. Assim, o Brasil ocupa papel estratégico no *mapa mundi* dos transgênicos. Por ser o segundo maior produtor de soja do mundo e também por ser o maior exportador mundial de soja em grão (safra 2001/2002), a decisão do país a respeito da liberação da soja transgênica poderá forçar o mundo a aceitá-la ou fazer com que os Estados Unidos recuem na sua política de disseminação dos transgênicos, tecnologia que dominam amplamente e que poderiam exportar, obtendo grandes lucros (Aldé, 2003).

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que, dentro do universo amostrado, o plantio de soja transgênica no Brasil encontra-se ainda de forma localizada. Como a presença de sementes de soja transgênica foi detectada apenas no Rio Grande do Sul, o país tem como controlar o plantio de soja (transgênica e normal), o que poderia facilitar a comercialização segregada da produção nacional de soja e de produtos derivados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldé, L. Governo Lula mantém proibição a transgênicos. Disponível em: <<http://www.educacaopublica.rj.gov.br/jornal/materia.asp?seq=101>>. Acesso em 10 julho 2003.
- Brum, A.L. **Os produtos transgênicos**: realidade mundial. Disponível em: <[http://www.agrolink.com.br/AgrolinkColunistas\\_SQL/al\\_cl\\_detalhe\\_coluna.asp?cc=25&co=129](http://www.agrolink.com.br/AgrolinkColunistas_SQL/al_cl_detalhe_coluna.asp?cc=25&co=129)>. Acesso em 21 junho 2003.
- Clark, E. R.; Porter, C. R. The seeds in your drill box. In: USDA – Yearbook of Agriculture. **Seeds**. Washington: USDA, p. 474 – 478, 1961.
- Guimarães, J.S. Plantio de soja transgênica avança e supera o da tradicional. Disponível em: <<http://www.srb.org.br/index.php3?news=1856>>. Acesso em 21 junho 2003.
- James, C. **Global status of commercialized transgenic crops: 2002**, ISAAA Briefs, n. 27, Preview, International Services for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, . 24 p., 2002.
- Lavouras com soja transgênica são interditas no Paraná. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/paginas/transgenicos.asp?id=95>>. Acesso em 10 julho 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**. v. 82, n. 4, p. 923 – 928, 1999.

Mato Grosso é o que mais utiliza sementes de soja fiscalizadas. Disponível em: <[http:// www.herbario.com.br/atual/mtsemfis.htm](http://www.herbario.com.br/atual/mtsemfis.htm)>. Acesso em 15 julho 2003.

Medida Provisória nº 113, de 26.03.2003. Disponível em: <[http://www.mct.gov.br/legis/mp/mp113\\_2003.htm](http://www.mct.gov.br/legis/mp/mp113_2003.htm)>. Acesso em 22 agosto 2003.

Mesquita, A. C. Pelo menos 4 estados plantam transgênicos. Disponível em: <[http:// www.noolhar.com/opovo/cienciaesaude/241874.html](http://www.noolhar.com/opovo/cienciaesaude/241874.html)>. Acesso em 10 julho 2003.

Previsão e acompanhamento da safra 2002/2003. Quarto levantamento. Abril/2003. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra/safra20022003Lev04.pdf>>. Acesso em 28 junho 2003.

SEAB/PR (2002) – <http://www.Pr.gov.br>

Silvestrini, G. & Coutinho, S. Maradona em campo. Disponível em: <<http://www.no.com.br/revista/secaoparaimpressao/191/50731/1008612049000>>. Acesso em 10 julho 2003.

### 3. RESUMO E CONCLUSÕES

No Brasil, a demanda por análises de resíduos de transgênicos em matérias primas e alimentos tem aumentado significativamente nos últimos dois anos, sobretudo após a suspeita do cultivo ilegal da soja transgênica resistente ao herbicida glifosato nos estados do sul. A maior parte dessas análises tem sido demandada por empresas exportadoras de grãos de soja e produtos derivados (farelo, proteína texturizada, isolados protéicos etc.) para a Europa e o Japão.

A primeira parte deste trabalho teve como objetivo oferecer uma visão geral sobre a comercialização de soja transgênica e produtos derivados no Brasil, com base em amostras analisadas, que foram enviadas por várias empresas, durante os anos de 2000, 2001 e 2002, ao Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética. Foram analisadas amostras de grãos de soja, farelo e rações à base de soja. O método utilizado nas análises foi o da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR). *Primers* específicos foram utilizados para detecção do gene RR (Roundup Ready), o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e a região terminadora NOS.

Como resultados, foram identificadas, no ano de 2000, amostras positivas apenas em grãos de soja (77,8%) e farelo (22,2%). Em 2001, 70,8% das amostras positivas foram de grãos de soja, 12,5% de farelo e 16,7% de rações à base de soja. Já, em 2002, 34,9% das amostras positivas foram de grãos de soja, 45% de farelo e 20,1% de ração. Os resultados indicam que, a demanda por análises em produtos derivados de grãos (farelo e ração) aumentou ao longo dos anos e também houve aumento na porcentagem de transgênicos ao longo dos três anos avaliados.

Em geral, com alimentos processados é mais difícil obter quantidades significativas de DNA em condições de ser analisado. Assim, este trabalho teve o objetivo de ajustar uma metodologia de extração de DNA para alimentos processados cárneos. Para isso foram testadas modificações em dois métodos de extração de DNA, Wizard (Promega) e o PrepMan Ultra (Applied Biosystems). O DNA de referência utilizado neste estudo para testar

a eficiência na extração dos métodos avaliados foi o DNA de soja, a qual faz parte da composição dos produtos cárneos testados.

As modificações no método Wizard incluíram o uso de um volume 1,5 vez maior do tampão de extração que o recomendado, maior tempo de incubação (overnight) e eluição final do DNA em um volume menor (30  $\mu$ L). No método PrepMan Ultra foram testados dois volumes diferentes do reagente de extração, 200  $\mu$ L e 400  $\mu$ L. A reação de PCR em tempo real foi realizada usando o sistema ABI Prism SDS 7000 (Applied Biosystems). Os resultados obtidos permitem concluir que a extração de DNA de produtos cárneos utilizando o método Wizard com as modificações propostas foi mais eficiente que a extração empregando o PrepMan Ultra.

Devido à suspeita do cultivo ilegal de soja transgênica nos estados do sul do país, este trabalho também teve como objetivo analisar as sementes de soja que foram utilizadas no plantio da safra 2002/2003 quanto à presença de soja transgênica. Foram analisadas sementes de soja dos principais estados produtores: Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e também Minas Gerais. As amostras de sementes foram enviadas pelos laboratórios de análises e certificação de sementes de soja de cada estado e, no Paraná, pela COODETEC. Analisaram-se 2466 amostras, sendo 42% do Mato Grosso, 39,5% do Rio Grande do Sul, 8,4% do Paraná e 10,1% de Minas Gerais. O método utilizado nas análises foi o da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR). *Primers* específicos foram utilizados para detectar uma região compreendida entre o promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor) e a seqüência do gene EPSPS (específica para amostras de soja RR). Como controle endógeno, foi utilizada uma seqüência específica, constituída pela região do gene que codifica a proteína de reserva lectina de soja.

A presença de soja transgênica foi detectada apenas em amostras do Rio Grande do Sul, onde 19,69% delas foram transgênicas. No Paraná, Mato Grosso e em Minas Gerais não foi detectada a presença de soja transgênica em nenhuma das amostras. Os resultados das análises confirmaram a suspeita de plantio ilegal de soja transgênica no sul do país, sobretudo no Rio Grande do Sul.