Pat

20

CAPÍTULO 10

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GRÃOS E ALIMENTOS TRANSGÊNICOS: O PANORAMA BRASILEIRO

FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO
MARTA F. MARTINS GUIMARÃES
EVERALDO GONÇALVES DE BARROS
ALEXANDRE LIMA NEPOMUCENO
RICARDO VILELA ABDELNOOR

SP4276
P.143

INTRODUÇÃO

Com a descoberta da estrutura da molécula de DNA em 1953 por Watson e Crick e a compreensão do código genético na década de 60, a biotecnologia tornou-se uma ferramenta importante para o desenvolvimento de técnicas de manipulação da informação genética. Com o emprego da biotecnologia, a clonagem e transferência de genes entre diferentes espécies, até mesmo entre as pertencentes a diferentes reinos, sem alterar as suas outras características, passou a ser possível. Deste modo, a ciência pôde obter respostas rápidas e seguras na resolução de questões importantes, como resistência a pragas, doenças e estresses ambientais, como também no desenvolvimento de espécies mais produtivas e com maior valor nutricional.

Um dos principais frutos da biotecnologia é desenvolvimento de vários organismos geneticamente modificados (OGMs), que passaram a oferecer possibilidades e alternativas importantes para vários problemas de caráter econômico, e de melhoria na qualidade de vida humana e do meio ambiente. Por outro lado, o desenvolvimento da biotecnologia trouxe também novas preocupações com as questões de biossegurança e bioética, tanto a nível laboratorial quanto ao que diz respeito a potenciais danos ecológicos, diante da perspectiva de liberação de OGMs no ambiente.

Atualmente no Brasil, além da soja Roundup Ready®, já foram liberados para plantio e comércio, o algodão resistente a inseto (Algodão BollGard® 531 Monsanto), em 2005, o milho resistente a inseto (Milho Liberty Link Bayer CropScience) em maio de 2007, e mais recentemente, o milho Bt 11 (Milho Bt 11 Syngenta Seeds) e o milho MON810 (milho Guardian Monsanto).

A ampliação da área mundial cultivada com OGM, em especial no Brasil, reflete-se também no aumento de transgênicos em produtos alimentícios.

Em 2003, mediante Decreto Nº 4.680 de 25 de abril, a rotulagem passou a ser obrigatória para produtos embalados, a granel ou *in natura*, que contêm ou que são produzidos a partir de OGMs, acima do limite de 1,0% do produto final. Alguns órgãos nacionais vêm realizando trabalhos de validação de métodos de detecção de transgênicos nos mais variados tipos de produtos alimentícios, comumente consumidos pela população brasileira, no entanto nenhuma informação existe em termos da abrangência e oferta desses alimentos aos consumidores (Cardarelli *et al.*, 2006). Informações a cerca do nível médio de resíduos transgênicos em diferentes tipos de produtos, compostos pelos mais variados tipos de matrizes, são importantes para suporte a trabalhos de fiscalização, conhecimento dos tipos de resíduos transgênicos que já vêm sendo consumidos pela população e por qual período, além de fornecer subsídios para o estabelecimento de protocolos de rastreabilidade, fiscalização e monitoramento pós-comercial dos eventos.

Considerando-se a importância destas informações, procuramos apresentar, neste capitulo, um panorama dos principais tipos de produtos transgênicos comercializados no país, no período de 2000 a 2005, classificados por tipo de matriz e evento transgene, nível de processamento e percentual de transgene presente nas amostras, bem como uma descrição das metodologias de análise empregadas. Tais dados são apresentados anualmente, de modo que é possível correlacioná-los acontecimentos no legislativo e executivo no que tange às questões de Biossegurança no país.

METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OGMS

A detecção de um organismo com uma determinada alteração em seu material genético pode ser realizada a partir das diferentes moléculas envolvidas na expressão gênica: a molécula de DNA contendo a alteração genética propriamente dita, o mRNA ou proteína expressos e, ainda, com base na alteração fenotípica decorrente da modificação inserida. As alterações no fenótipo não são facilmente observáveis em muitos casos, uma vez que se manifestam somente na presença de uma determinada condição ambiental, como no caso da soja resistente ao glifosato e do milho resistente a inseto.

A detecção de OGMs com base no mRNA é inviabilizada, principalmente devido à grande instabilidade desse tipo de molécula. De modo semelhante à detecção baseada em mRNA, a detecção de proteínas está na dependência da especificidade temporal e tecidual da expressão do transgene. Além dessas limitações, ambas as moléculas apresentam restrições ao serem manuseadas, e no caso de proteínas, a manutenção de sua estabilidade é crucial para ser possível a sua detecção. Deste modo, os principais métodos de detecção de OGMs se baseiam na análise do DNA, que está presente em todas as células do organismo e apresenta uma razoável estabilidade in vitro.

No caso específico de detecção e quantificação de resíduos de OGMs em alimentos, métodos baseados na presença do DNA ou da proteína exógena vêm sendo utilizados. Os métodos baseados na detecção ou quantificação da proteína alvo exploram a capacidade de interação altamente específica entre antígeno e anticorpo. Dentre os métodos disponíveis, destacam-se o teste da tira de fluxo lateral e o ELISA. Estes são utilizados principalmente para produtos in natura, devido à necessidade da manutenção de estrutura da proteína.

Os métodos baseados no DNA utilizam a técnica da PCR para a detecção e quantificação de resíduos transgênicos, tanto em produtos in natura como produtos processados. Devido a sua alta eficiência, repetibilidade e sensibilidade, a técnica de PCR vem sendo a principal metodologia empregada para a detecção de resíduos transgênicos em alimentos.

Alguns métodos analíticos que utilizam a PCR têm sido desenvolvidos para detectar qualitativamente a presença de sequências modificadas de ácidos nucleicos em alimentos transgênicos (EHLERS et al., 1997; LIPP, et al., 2005). A análise qualitativa baseia-se na amplificação de um fragmento de DNA específico do transgene: da região promotora, da região terminadora, do gene marcador ou algum segmento de DNA exógeno a ele associado. A amplificação é feita pela enzima DNA polimerase, que utiliza pequenas sequências iniciadores específicas de DNA, denominadas primers, que flanqueiam a região que se deseja amplificar. Além da molécula alvo, dos iniciadores e da enzima DNA polimerase, também é necessária a adição dos desoxinucleosídeos trifosfatados e de Mg+2, que atua como cofator

da polimerase. Em princípio, em uma PCR o número de sequências alvo amplificadas aumenta exponencialmente a cada ciclo, que é constituído de três diferentes etapas. Na primeira etapa, a molécula de DNA alvo é desnaturada a uma temperatura em torno de 94°C, seguida de uma redução em torno de 50 a 60°C, para o anelamento dos primers. Finalmente, a temperatura é elevada a 72°C, para que haja a polimerização pela DNA polimerase. Os ciclos são repetidos 20 até 45 vezes, dependendo da quantidade de DNA alvo ou do tamanho do fragmento a ser amplificado. Após cada ciclo, as moléculas obtidas são utilizadas como molde para um novo ciclo de amplificação, obtendo-se amplificação exponencial do número de fragmentos. Isto resulta na obtenção de até um bilhão de cópias da sequência alvo após x ciclos.

Rotineiramente são realizados análises para detecção de alimentos GM com primers que flanqueiam na região promotora 35S do vírus do mosaico da couve flor e da região terminadora NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, ambos presentes na maioria dos transgênicos atualmente comercializados. No entanto, para a identificação do evento transgênico, são necessários primers específicos que flanqueiem a região codificadora ou alguma região que seja específica do transgene, ou ainda os sítios de inserção e regiões terminais do cassete de clonagem. A Figura 1 mostra os possíveis resultados obtidos em uma análise qualitativa, incluindo a avaliação da qualidade da amostra a ser analisada, por meio da amplificação de um gene de referência endógena. Para tornar a detecção de OGM mais precisa e confiável, o uso de um gene de referência é indispensável. Para ser utilizado como referência endógena, o gene deve ser espécie-específico, apresentar baixo número de cópias no genoma e exibir baixa heterogeneidade entre cultivares (DING et al., 2004).

As características mais marcantes do método de detecção de transgenes, baseado na reação de PCR convencional, são a sua precisão e a sua sensibilidade. No entanto, este método é incapaz de fornecer informação acurada sobre a quantidade do alvo que esta sendo amplificado devido a oscilações na eficiência de amplificação em diferentes reações, bem como nos diferentes ciclos de uma mesma reação. Estas variações estão relacionadas com o acúmulo de inibidores, perda da processividade

da enzima DNA polimerase e escassez dos reagentes ao longo dos ciclos. Em especial, nos últimos ciclos da PCR os produtos de amplificação são produzidos de modo não exponencial, o que torna inviável a correlação da quantidade inicial de alvo com a quantidade de alvo amplificado no decorrer dos ciclos de amplificação.

Uma metodologia que vem sendo largamente empregada para a quantificação de OGM em alimentos é a metodologia TaqMan®, por PCR quantitativo em tempo real. Em contraste com quantificações nos ciclos finais da PCR (end points), a PCR em tempo real monitora a reação ciclo a ciclo, associando a amplificação do alvo em cada ciclo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. A fluorescência é originada durante a hibridização do DNA alvo com sondas ou primers marcados com fluoróforos específicos. A intensidade de sinal emitida é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente em cada ciclo de amplificação. Deste modo, é possível monitorar a quantidade de produto gerada em cada ciclo, e durante a fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial. O sistema TaqMan® utiliza além dos primers de PCR usuais, uma sonda fluorescente que hibridiza dentro da sequência alvo. A sonda contém um corante fluorescente ligado ao seu terminal 5' (reporter) e um inibidor da fluorescência (quencher) ligado ao seu terminal 3'. Durante o processo de amplificação, a atividade de exonuclease 5'-3' da DNA polimerase degrada a sonda, separando fisicamente o corante fluorescente do inibidor, aumentando a emissão de fluorescência. A intensidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de DNA do transgene presente na amostra (HOLLAND et al., 1991). Devido ao emprego simultâneo de primers e sondas esta metodologia é uma das mais precisas para quantificação de OGM em alimentos.

Para a quantificação do percentual de DNA GM em um determinado produto, o número de cópias do transgene é dado em função do número de cópias de um gene endógeno espécie-específico. A quantificação relativa pelo método da curva padrão é a metodologia comumente utilizada para a determinação do percentual de DNA GM presente nas amostras. O percentual de OGM é definido como sendo a razão entre a quantidade em peso do

ingrediente GM com relação a quantidade total do ingrediente. No entanto, como esse percentual é, na realidade, determinado pela amplificação por PCR de um fragmento do DNA exógeno, bem como de um gene endógeno utilizado como referência-, o que ocorre, na verdade, é uma extrapolação da razão entre o número de cópias de DNA GM e número de cópias de DNA não transgênico da espécie em questão, amplificados por PCR. Tanto o fragmento de DNA exógeno, como o utilizado como referência endógena, devem apresentar a mesma eficiência de amplificação por PCR quantitativo. Esta eficiência deve ser demonstrada inicialmente em reações simples e multiplex, e pela construção de curvas de calibração com valores de coeficiente de correlação acima de 0,98, e ambas eficiências acima de 90%. Durante as análises a amplificação de ambos os alvos em reações multiplex os desvios referentes à eficiência de amplificação são minimizados. Para construção da curva de calibração são utilizados padrões de referência, que são amostras contendo quantidade específicas de DNA GM, expressos nas diferentes unidades, nanogramas, número de cópias ou percentual, que devem ser concomitantemente amplificados com as amostras do ensaio. Apenas com a amplificação destes padrões é possível a construção das curvas de calibração que permitem a determinação do percentual de resíduos transgênicos.

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS GM NO BRASIL

A avaliação de presença de resíduos transgênicos em produtos comumente consumidos pela população brasileira abrangeu o período 2000 a 2005 (MARCELINO, 2007), onde foram amostradas 3.944 amostras dos mais variados produtos, industrializados, *in natura* e grãos, principalmente compostas pela matriz soja.

Todas as amostras foram analisadas pelo Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, empresa que foi criada no sistema de Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa. Os produtos analisados constituem uma amostragem aleatória daqueles enviados para análise de detecção e quantificação de resíduos transgênicos por clientes nacionais, tais como, produtores, associações, portos,

beneficadora de grãos e empresas alimentícias, de diferentes regiões do país. A amostragem buscou representar a demanda dos tipos de produtos, estado de origem das amostras, matriz e tipo de análise da empresa.

As análises de detecção foram realizadas por PCR convencional, e as quantificações dos percentuais de resíduos de transgenes por PCR quantitativo. O DNA as amostras foi extraído extraído pelas metodologias CTAB (ROGERS et al., 1988) e Wizard (Promega).

A extração de DNA de produtos com alto nível de processamento foi realizada pelos métodos CTAB ou Wizard, com diferentes adaptações, segundo características específicas dos produtos. A quantidade inicial utilizada para a extração foi elevada cerca de cinco vezes em relação às amostras não processadas. Amostras com alto teor de carboidratos foram tratadas com 10 mg de amilase por 30 min a 55ºC. Para amostras ricas em lipídeos, cerca de 500 mg eram tratados com 10 mL de hexano juntamente com o tampão de lise, seguida de uma precipitação adicional com glicogênio a 2 µg/mL.

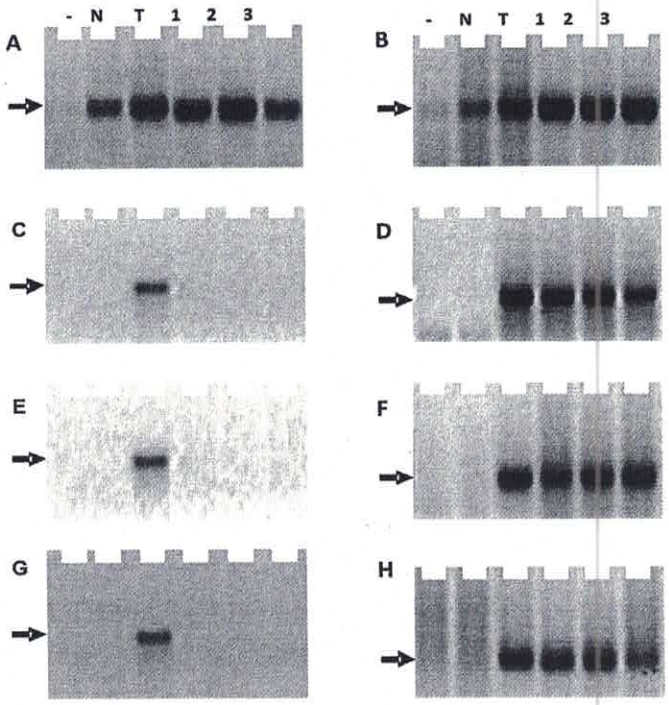


Figura 1 - Análise qualitativa de OGM em amostras de grãos de soja. O DNA das amostras foi extraído pelo método Wizard e amplificado com *primers* específicos que anelam ou no gene de referência endógena lectina (controle A e B), ou na região do promotor 35S do CaMV (C e D), ou na região terminadora NOS (E e F), ou na região codificadora do gene EPSPS (G e H). Após a reação de PCR, os produtos amplificados foram separados em géis de agarose. À esquerda (A, C, E e G) está exemplificado um resultado negativo e à direita (B, D, F e H), um resultado positivo. Os símbolos nas canaletas representam: (–), reação de PCR sem DNA (controle); N, soja normal (controle); T, soja transgênica (controle); 1, 2 e 3, referem-se a amostras de grãos de soja. As setas indicam as bandas de DNA de interesse.

Classificação das Amostras Analisadas

A distribuição das amostras no decorrer dos anos foi: 180 amostras em 2000, 439 em 2001, 730 em 2002, 751 em 2003, 1347 em 2004 e 497 em 2005. A distribuição dos produtos analisados durante o período, expressa em valores percentuais com relação ao total de amostras analisadas em cada ano, pode ser observado na Tabela 1.

Pode-se observar que inicialmente a demanda por análise concentrava-se em amostras de grãos e produtos in natura. Em 2000, apenas 10,56% das amostras eram constituídas por produtos processados, que consistiam de amostras de mistura para bolo, amido de milho e matinais. Do restante, cerca de 46,11% das amostras eram de produtos in natura e 43,33% de grãos, abrangendo principalmente as classes de soja grão, proteína e farelo de soja.

Em 2001, quando o primeiro decreto de rotulagem foi publicado, que estabelecia o limite de 4% para a contaminação acidental de soja RR, apenas em produtos embalados, o percentual da demanda de produtos processados não ultrapassou a 15,5%. A demanda de análise para produtos *in natura* apresentou uma leve redução, para cerca de 46,24%, mas continuou superando a demanda pela análise de grãos, que ficou em 38,27%.

Em 2002, a demanda pela análise de produtos *in natura* continuou se elevando, e atingiu seu clímax, superando cerca de 50% do total de amostras analisadas naquele ano. A queda deste percentual ocorreu nos três anos seguintes, atigindo os percentuais 45,41%, 19,15% e 15,29% nos anos 2003, 2004 e 2005, respectivamente. Naquele ano, as classes de produtos cárneos foi a superior entre os produtos processados, seguida da classe de hidrolisados de soja, atingindo os percentuais de 12,59% e 3,69% respectivamente.

Em 2003, ano de primeira liberação do comércio da soja RR plantada ilegalmente no país e também da publicação do novo decreto de rotulagem, que estabeleceu o limite de 1% da presença de resíduos transgênicos, tanto para os produtos embalados como os comercializados a granel, o percentual da demanda de análise por produtos processados atingiu 26,23%. Dentre a demanda de produtos analisados naquele ano, percebe-se uma diversificação dos tipos de produtos, dentre estes destacam-se as amostras de salsicha, amido de milho e misturas para empanados, que atingiram os percentuais de 4,66%, 8,66% e 3,20% do total de amostras analisadas, respectivamente.

Em 2004, ano posterior à publicação do decreto de rotulagem, a demanda pela análise de produtos processados atingiu o percentual de 51,97% do total de amostras analisadas, com uma leve elevação no ano

seguinte, 2005, para 53,72%. Em contrapartida à elevação do percentual de análise de produtos processados, a demanda pela análise de produtos *in natura* apresentou radical queda, passando de 45,41% em 2002 para 15,29% em 2005. A demanda pela análise de grãos apresentou uma tênue elevação, passando de 27,22% em 2002 e atingindo 30,99% em 2005. A demanda pela análise dos produtos classificados em cada nível de processamento, no período de 2000 a 2005, pode ser observada na Figura 1.

A elevação da demanda pela análise de produtos processados, principalmente nos anos de 2004 e 2005, anos posteriores à publicação do decreto de rotulagem, pode ser interpretada como sendo reflexo deste. Embora não se tenham dados concretos se a fiscalização tenha efetivamente se intensificado no país, percebeu-se uma maior atenção pelas empresas que utilizam soja e/ou milho na constituição de seus produtos, em relação à rastreablidade e percentuais de resíduos de OGM em seus produtos.

Em 2004 e 2005, a diversificação dos tipos de produtos analisados foi similar a 2003. Em 2004, destacaram-se entre os produtos processados as classes das amostras de misturas para empanar, condimentos e temperos com percentuais de 9,80% e 7,05%, respectivamente, e, em 2005, as classes de farinha de trigo e salsichas com os percentuais de 13,88% e 12,47%, respectivamente.

No ano de 2005, também foi observada uma queda no número de amostras analisadas, e, consequentemente, refletiu numa menor amostragem de produtos para serem analisados. Tal fato pode ser reflexo da liberação da soja RR no país desde a publicação da nova Lei de Biossegurança, em março de 2005, ou mesmo devido ao grande período em que a CTNBio esteve sem atuar, até a publicação do decreto 5.591, em novembro de 2005, que regulamentou a lei.

TIPOS DE MATRIZES

Durante o período de seis anos em que as amostras foram analisadas para a detecção e quantificação de resíduos transgênicos, a principal demanda foi de amostras que apresentavam soja em sua composição, atingindo o percentual médio de 60,47% do total de amostras analisadas

durante todo o período. No entanto, a partir de 2003, a demanda por amostras que apresentam apenas a matriz soja em sua composição decresceu, passando do percentual de 80,16% em 2002, 64,18% em 2003, 40,68% em 2004, e 34,41% em 2005. A distribuição das amostras por tipo de matriz no decorrer dos anos em que estas foram analisadas está apresentada na Figura 2.

Como esperado, a demanda pela análise de amostras que apresentavam milho em sua composição foi imediatamente inferior à dos produtos que continham soja, atingindo o percentual médio de 25,43% do total de amostras analisadas no período. A terceira maior demanda foi pela análise de amostras que continham as duas matrizes em sua composição, que atingiu o percentual médio de 18,18%.

Grãos e produtos contendo soja RR em sua composição foram somente liberados para comércio no país em 2003, no entanto, a demanda pela análise desses produtos já havia se iniciado bem anteriormente, inclusive de produtos que apresentavam além de soja, outras matrizes em sua composição, como por exemplo, as contendo milho ou ambos. A demanda pela detecção de milho transgênico ocorreu no mesmo ano em que foram feitas as primeiras análises de soja, em 2000. Neste ano, o percentual de amostras analisadas que apresentavam soja em sua composição foi de 76,67% comparados com apenas 15,56% das amostras de milho. No decorrer dos seis anos houve elevação da demanda de amostras de milho, com exceção do ano de 2002, e culminou com o estabelecimeto de níveis similares da demanda para as duas matrizes em 2005, em 34,41% para soja e 30,58% para milho.

A demanda de análise de produtos que apresentavam milho e soja em sua composição também foi se elevando durante o período, estando em 2000 em cerca de 7,78% e atingindo, em 2005, 18,91% do total de amostras analisadas.

TABELA 1 – Percentual dos produtos analisados para detecção de resíduos transgênicos durante o período 2000-2005.

	Percentual dos Produtos Analisados											
	2000		2001		2002		2003		2004		2005	
Produtos Analisados	**Total**	**(%)**	**Total**	**(%)**	**Total**	**(%)**	**Total**	**(%)**	**Total**	**(%)**	**Total**	**(%)**
Amido de Milho	0	0,00	0	0,00	0	0,00	65	8,66	22	1,63	10	2,01
Bebidas Lácteas	0	0,00	0	0,00	0	0,00	8	1,07	18	1,34	12	2,41
Biscoitos	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	16	1,19	12	2,41
Condimentos e Temperos	0	0,00	2	0,46	11	1,50	17	2,26	95	7,05	12	2,41
Empanados	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,0	23	1,71	10	2,01
Farelo de Soja	17	9,44	41	9,34	106	14,50	90	11,98	59	4,38	23	4,63
Farinha de Trigo	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	70	5,20	69	13,88
Fubá de Milho	0	0,00	0	0,00	0	0,00	7	0,93	0	0,00	0	0,00
Lecitina	6	3,33	13	2,96	8	1,09	0	0,00	5	0,37	3	0,60
Matinais	6	3,33	21	4,78	27	3,69	8	1,07	56	4,16	23	4,63
Macarrão e Massas	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,0	27	2,00	4	0,80
Milho Grão	24	13,33	70	15,95	57	7,80	108	14,38	337	25,02	130	26,16
Mistura para Bolo	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	44	3,27	14	2,82
Mistura para Empanados	12	6,67	0	0,00	0	0,00	24	3,20	132	9,80	12	2,41
Óleos e Gorduras	0	0,00	1	0,23	5	0,68	5	0,67	35	2,60	2	0,40
Outros	22	12,22	45	10,25	34	4,65	34	4,53	95	7,05	42	8,45
Produtos Cárneos	0	0,00	5	1,14	92	12,59	14	1,86	22	1,63	5	1,01
Ração	2	1,11	37	8,43	53	7,25	47	6,26	68	5,05	22	4,43
Salsicha	0	0,00	0	0,00	0	0,00	35	4,66	90	6,68	62	12,47
Soja Grão	54	30,00	96	21,87	142	19,43	104	13,85	33	2,45	19	3,82
Sopas	0	0,00	4	0,91	17	2,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Sucos Naturais	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	0,67	0	0,00	3	0,60
Produtos Protéicos de Soja	37	20,56	104	23,69	179	24,49	180	23,97	100	7,42	8	1,61
Total	**180**		**439**		**731**		**751**		**1.347**		**497**	**3.944**

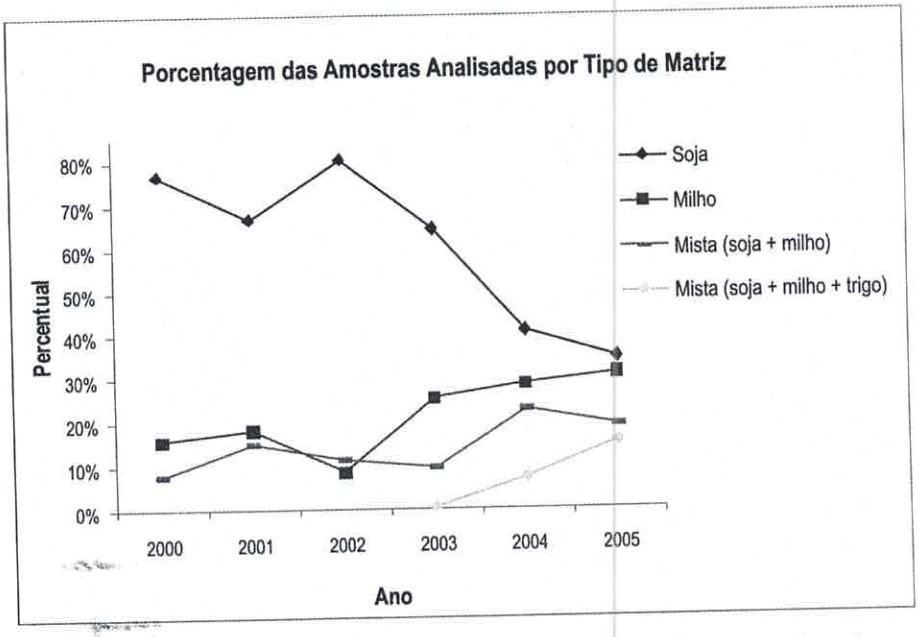


FIGURA 2 – Percentual de produtos analisados de acordo com o tipo de matriz no período de 2000 a 2005.

DEMANDA PELA ANÁLISE POR REGIÃO DO PAÍS

Os principais estados em que houve demanda para análises de resíduos de transgênicos, durante todos os anos em que estas foram conduzidas, foram Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Bahia. Os estados do Ceará e Goiás esporadicamente tiveram uma demanda um pouco mais significativa que os estados do Amazonas, Espírito Santo, Pernambuco e Mato Grosso.

Segundo dados da CONAB, os principais estados produtores de soja no país são, em ordem de produção, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais. Todos estes estados apresentaram alguma demanda para análise de transgênicos, sendo que o estado de Santa Catarina foi o que mais se destacou em número de amostras enviadas para análise (1.440), seguido do estado de São Paulo (1.211). Em contrapartida, o estado de Mato Grosso, embora seja o maior produtor de soja do país, contribuiu de modo incipiente

no total de amostras analisadas, o que pode ser inferido pelo fato do estado ser o que mais utiliza sementes de soja fiscalizada. Na safra 2001/2002, 95% das sementes utilizadas para plantio foram certificadas, o que reduz a probabilidade de transgênicos na região (PIMENTA 2003). Embora o estado do Rio Grande do Sul não tenha se destacado pela demanda de análise, segundo estimativas da Associação Brasileira de Produtores de Sementes (ABRASEM), este estado é o que apresenta o maior índice de utilização de soja transgênica nos últimos anos.

A distribuição da demanda de amostras para análise de detecção e quantificação de resíduos transgênicos por Estado, pode ser observada na Tabela 2.

TABELA 2 - Distribuição da demanda de amostras para análise de detecção e quantificação de resíduos transgênicos por Estado no período de 2000 a 2005.

	2000		2001		2002		2003		2004		2005	
ESTADO	Número de Amostras	%	Número de mostras	%	Número de Amostras	%	Número de Amostras	%	Número de Amostras	%	Número de Amostras	%
AM	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,27	1	0,07	2	0,40
BA	0	0,00	16	3,64	0	0,00	0	0,00	83	6,16	23	4,63
CE	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	15	1,11	17	3,42
ES	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,13	1	0,07	0	0,00
GO	4	2,22	0	0,00	0	0,00	3	0,40	10	0,74	1	0,20
MG	7	3,89	33	7,52	1	0,14	9	1,20	28	2,08	28	5,63
MS	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,27	0	0,00	0	0,00
MT	0	0,00	0	0,00	1	0,14	0	0,00	0	0,00	0	0,00
PR	116	64,44	210	47,84	146	20,00	112	14,91	104	7,72	84	16,90
PE	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,22	1	0,20
RS	13	7,22	20	4,56	100	13,70	71	9,45	42	3,12	13	2,62
SC	22	12,22	100	22,78	377	51,64	353	47,00	455	33,78	103	20,72
SP	18	10,00	60	13,67	105	14,38	198	26,36	605	44,91	225	45,27
TOTAL	180		439		730		751		1347		497	

ANÁLISES QUALITATIVAS

Ao longo dos anos em que grãos e diferentes tipos de alimentos in natura e processados foram analisados para a presença de resíduos GM, pôde-se observar um aumento gradual no número de amostras positivas. Em 2000, apenas 9 amotras, ou seja, 5% do total de 180 analisadas, foram positivas para a presença de soja Roundup Ready®. Em 2001, houve um aumento tanto no total de amotras analisadas quanto no número de positivas, que foram 480 e 50, respectivamente, o que elevou o percentual de amostras positivas para 11,39% do total de amostras analisadas naquele ano. Nos anos posteriores, os percentuais de amostras positivas em cada ano se mantiveram acima de 25% do total de amostras analisadas, sendo que, em 2004, foi observado o maior valor absoluto de amostras positivas, 347 do total de 1346 analisadas no ano. As primeiras amostras de milho grão GM foram detectadas em 2003, sendo que neste mesmo ano foi detectada a presença de milho GM em amostras processadas de fubá, e, em 2004, em amostras de amido de milho. Todas as amostras apresentaram resíduos de milho GM para o evento Bt11 YieldGard™ (Syngenta). Estes dados revelam que mesmo quando o plantio e a comercialização de OGM

eram proibidos no país, estes de alguma forma estavam presentes no mercado, pelo menos, desde o ano de 2000. A distribuição das amostras positivas e negativas, detectadas por PCR, com relação ao total de amostras analisadas anualmente, durante o período de 2000 a 2005, pode ser observada na Tabela 3.

De acordo com os resultados, os produtos analisados durante os seis anos estão concentradas em amostras de grãos e produtos in natura, tais como diferentes tipos de proteínas de soja e ração. No entanto, é possível verificar uma elevação na demanda pela análise de produtos processados no decorrer dos anos, que superou a de produtos in natura e grãos em 2004, ano posterior à publicação do decreto de rotulagem, atingindo o percentual de 51,97% do total de amostras analisadas, com uma elevação no ano seguinte, 2005, para 53,72%. A elevação da demanda pela análise

de produtos processados, principalmente nos anos de 2004 e 2005, anos posteriores à publicação do decreto de rotulagem, pode ser interpretada como sendo reflexo deste. Embora não se tenham dados concretos se a fiscalização tenha efetivamente se intensificado no país, percebeu-se uma maior atenção pelas empresas que utilizam soja e/ou milho na constituição de seus produtos, em relação à rastreablidade e percentuais de resíduos de OGM presentes em seus produtos.

Considerando o nível de predominância, as amostras de farelo de soja e soja grão foram as que mais se destacaram com relação ao percentual de amostras positivas. Em contrapartida, as amostras de milho grão apresentaram um baixo percentual de amostras positivas, apenas 21 amostras positivas do total de 726 analisadas no período, uma vez que a predominância da demanda por este tipo de amostra foi a mais elevada, se considerando o total de amostras analisadas nos seis anos.

Dentre os produtos processados, a demanda de análise de amostras de salsichas foi a que mais se destacou. Da mesma forma, o percentual de amostras positivas foi significativamente mais elevado, superando o total de 72% das amostras de salsichas analisadas. Resultado similar foi observado da análise de produtos cárneos, em que o percentual de amostras positivas com relação ao total de amostras de produtos cárneos analisados superou o percentual de 50%. Estes resultados podem ser atribuídos a prática comum de adição de proteína na composição destes tipos de produtos, a fim de elevar o teor proteico destes.

Tabela 3 - Distribuição de amostras positivas e negativas com relação ao total de amostras analisadas anualmente durante o período de 2000 a 2005.

Produtos	2000			2001			2002		
	Nº Negativo	Positivo	% (Positivo/	Nº Negativo	Positivo	% (Positivo/	Nº Negativo	Positivo	% (Positivo/

Tabela 3 - Distribuição de amostras positivas e negativas com relação ao total de amostras analisadas anualmente durante o período de 2000 a 2005.

Produtos	2000				2001				2002			
	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/ total)	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/ total)	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/ total)
Amido de Milho	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Bebidas Lácteas	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Biscoitos	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Condimentos e Temperos	0	0	0	0,00	2	2	0	0,00	11	7	4	0,55
Empanados	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Farelo de Soja	17	15	2	1,11	41	35	6	1,37	106	48	58	7,93
Farinha de Trigo	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Lecitina	6	6	0	0,00	13	13	0	0,00	8	2	6	0,82
Macarrão e Massas	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Matinais	6	6	0	0,00	21	20	1	0,23	27	27	0	0,00
Milho Grão	24	24	0	0,00	0	0	0	0,00	57	57	0	0,00
Mistura para Bolo	12	12	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Mistura para Empanados	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Óleos e Gorduras	0	0	0	0,00	1	1	0	0,00	5	3	2	0,27
Outros	22	22	0	0,00	45	44	1	0,23	34	32	2	0,27
Produtos Cárneos	0	0	0	0,00	5	5	0	0,00	92	34	58	7,93
Ração	2	2	0	0,00	37	29	8	1,82	53	27	26	3,56
Salsicha	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Soja Grão	54	47	7	3,89	96	62	34	7,74	142	97	45	6,16
Sopas	0	0	0	0,00	4	4	0	0,00	17	17	0	0,00
Sucos Naturais	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Produtos Protéicos de Soja	37	37	0	0,00	104	104	0	0,00	179	172	7	0,96
Total	**180**	**171**	**9**	**5,00**	**439**	**389**	**50**	**11,39**	**731**	**523**	**208**	**28,45**

continuação da Tabela 3

Produtos	2003				2004				2005			
	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/ total)	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/ total)	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/ total)
Amido de Milho	65	65	0	0,00	22	13	9	0,67	10	7	3	0,60
Bebidas Lácteas	8	8	0	0,00	18	14	4	0,30	12	12	0	0,00
Biscoitos	0	0	0	0,00	16	16	0	0,00	12	7	5	1,01
Condimentos e Temperos	17	7	10	1,33	95	65	30	2,23	12	11	1	0,20
Empanados	0	0	0	0,00	23	13	10	0,74	10	0	10	2,01
Farelo de Soja	90	39	51	6,79	59	38	21	1,56	23	12	11	2,21
Farinha de Trigo	0	0	0	0,00	70	48	22	1,63	69	61	8	1,61
Fubá de Milho	7	6	1	0,13	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Lecitina	0	0	0	0,00	5	4	1	0,07	3	2	1	0,20
Macarrão e Massas	0	0	0	0,00	27	11	16	1,19	4	2	2	0,40
Matinais	8	5	3	0,40	56	52	4	0,30	23	17	6	1,21
Milho Grão	108	102	6	0,80	337	330	7	0,52	130	122	8	1,61
Mistura para Bolo	0	0	0	0,00	44	29	15	1,11	14	8	6	1,21
Mistura para Empanados	24	16	8	1,07	132	82	50	3,71	12	1	11	2,21
Óleos e Gorduras	5	5	0	0,00	35	25	10	0,74	2	2	0	0,00
Outros	34	29	5	0,67	95	84	11	0,82	42	38	4	0,80
Produtos Cárneos	14	6	8	1,07	22	10	12	0,89	5	2	3	0,60
Ração	47	34	13	1,73	68	49	19	1,41	22	18	4	0,80
Salsicha	35	6	29	3,86	90	38	52	3,86	62	7	55	11,07
Soja Grão	104	47	57	7,59	33	19	14	1,04	19	17	2	0,40
Sopas	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Sucos Naturais	5	5	0	0,00	0	0	0	0,00	3	3	0	0,00
Produtos Protéicos de Soja	180	159	21	2,80%	100	61	39	2,90	8	8	0	0,00
Total	**751**	**539**	**212**	**28,23**	**1347**	**1001**	**346**	**25,69**	**497**	**357**	**140**	**28,17**

N – número de amostras analisadas;
Na classe OUTROS foram agrupados os produtos em que a demanda foi inferior à 1 % do total de amostras analisadas anualmente.

Exce
uma amos
para todos
momento.

ANÁLISES

Dura
e destas, c
de 0,1% d

Do t
2005, que
cerca de
27,48% ac
analisadas
com resídu
positivas q
cerca de 2
maior perc
de 5,0%
de 39,78%
transgênic

A dis
a presença
percentuai
durante o

Emb
de DNA G
acima de
apresentar
não neces
DNA GM s
inferir sobr
nacionais,

Excetuando-se as amostras de sucos naturais e sopas, pelo menos uma amostra positiva para a presença de resíduos transgênicos foi detectada para todos os outros tipos de produtos analisados, em um determinado momento.

ANÁLISES QUANTITATIVAS

Durante o período de 2002 a 2005, 1530 amostras foram quantificadas, e destas, cerca de 626 (40,92%) apresentaram resíduos de DNA GM acima de 0,1% do total de DNA da espécie analisada.

Do total de 626 amostras analisadas durante o período de 2002 a 2005, que apresentaram resultados positivos para a presença de DNA GM, cerca de 46,01% apresentou resíduos de transgênicos acima de 1,0% e 27,48% acima de 5,0%. Dentre os quatro anos em que as amostras foram analisadas, o ano de 2003 apresentou o maior percentual de amostras com resíduos GM superiores a 1,0%, superando 60% do total de amostras positivas quantificadas, enquanto 2005 apresentou o menor percentual, com cerca de 25% de amostras. O ano de 2003 também se destacou com o maior percentual de amostras contendo resíduos de transgênicos acima de 5,0% do total de DNA da espécie analisada, atingindo o percentual de 39,78%. Em contrapartida, em 2005, amostras contendo resíduos de transgênicos acima de 5% foi de apenas 14,63%.

A distribuição da amostras quantitativas, positivas e negativas para a presença de resíduos de transgênicos, e ainda de acordo com os níveis percentuais da presença de resíduos transgênicos, 1% e 5%, analisadas durante o período de 2002 a 2005, encontra-se na Tabela 4

Embora tenham sido detectadas amostras contendo percentuais de DNA GM acima de 1% e 5% do total de DNA da espécie analisada, acima de 50% do total 626 amostras analisadas por PCR quantitativo apresentaram resíduos transgênicos com percentuais inferiores a 1%, logo não necessitariam ser rotulados. Com relação às amostras com níveis de DNA GM superiores a 1% e 5% do DNA total da espécie analisada, para se inferir sobre a necessidade de rotulagem, segundo os critérios legislativos nacionais, seria necessário verificar quanto da composição do produto é

atribuída à espécie analisada. Isto ocorre pelo fato da legislação nacional sobre rotulagem se referir ao percentual de resíduo transgênico com relação ao produto final e a técnica de quantificação baseia-se apenas no DNA da espécie em questão.

Esse tipo de legislação é apenas empregada no Brasil. Todos os demais países que adotaram níveis permitidos para a presença de resíduos transgênicos, o estabeleceram com base no percentual em que a matriz contribui para o produto final, e não considerando o produto final como um todo (MACKENZIE, 2000).

Tabela 4 - Distribuição das amostras positivas com relação aos níveis percentuais da presença de resíduos transgênicos no período de 2002 a 2005.

Ano	Amostras Negativas	Amostras Positivas	0,1% < x <1,0%	%	>1,0%	%	>5,0%	%
2002	220	115	64	55,65	51	44,35	28	24,35
2003	248	181	72	39,78	109	60,22	72	39,78
2004	313	207	110	53,14	97	46,86	54	26,09
2005	123	123	92	74,80	31	25,20	18	14,63
Total	**904**	**626**	**338**	**53,99**	**288**	**46,01**	**172**	**27,48**

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de novos eventos de vegetais geneticamente modificados culminará com a elevação do consumo destes na alimentação humana e animal.

No caso do Brasil, produtos contendo resíduos de transgênicos estão presentes em amostras de alimentos consumidas no Brasil, pelo menos, desde o ano 2000. Dentre estes, destacam-se a soja RR e o evento de milho Bt11. Dentre os diferentes tipos de produtos processados analisados, considerando o nível de predominância da demanda pela análise, as classes de farelo de soja e soja grão foram as que mais se destacaram com relação ao percentual de amostras positivas por classe. Dentre os produtos

processados, as classes de salsichas, empanados, produtos cárneos, mistura para empanados e condimentos foram as que apresentaram os maiores percentuais de resíduos transgênicos do total de amostras analisadas dentro da classe. De todos os tipos de produtos analisadas durante os seis anos, excetuando-se as amostras de sucos naturais e sopas, pelo menos uma amostra positiva para a presença de resíduos de transgênicos foi detectada em um determinado momento.

Neste contexto, a avaliação da biossegurança do evento, no que tange aos riscos inerentes do seu consumo, é de fundamental importância e vem sendo exigida em todos os eventos liberados no país, que possam ser destinados ao consumo humano e animal. Tal avaliação, assim como as referentes aos demais riscos de liberação de OGMs no meio ambiente, deve ser conduzida caso a caso e de modo imparcial.

O desenvolvimento de metodologias de detecção e quantificação dos mais variados tipos de eventos, que sejam confiáveis e capazes de serem reproduzidas, não só contribuirão para a rastreabilidade destes eventos, como permitirão que medidas de fiscalização possam ser implementadas.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. Disponível em:<http://www.abrasem.com.br/>. Acesso em: 7 jan. 2009.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Disponível em:<http://www.ctnbio.gov.br/pareceres>. Acesso em: 7 dez. 2008.

DING, J.; JIA, J.; YANG, L.; WEN, H.; ZHANG, C.; LIU, W.; ZHANG, D. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 3372-3377, 2004.

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. *Bundesgessundheitsblatt,* v.4, p. 118-121, 1997.

HOLLAND, P. A.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5º-3º exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of Americ*, v. 88, p. 7276–7280, 1991.

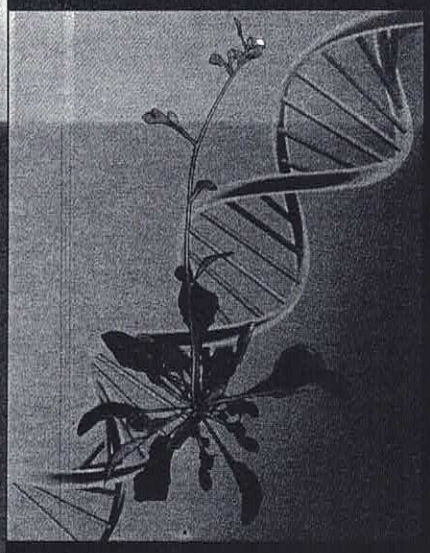
LIPP, M.; SHILLITO, R.; GIROUX, R.; SPIEGELHALTER, F.; CHARLTON, S.; PINERO, D.; SONG, P. Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in Agricultural Biotechnology *J. AOAC Int.* v. 88, p.136-9154, 2005.

MARCELINO, F. C.; MARTINS, Marta Fonseca; BARROS, E. G. Detecção e quantificação de alimentos geneticamente modificados: o panorama brasileiro. *Revista Ceres*, v. 54, p. 214-224, 2007.

MACKENZIE, D. J. *Agriculture and Biotechnology Strategies (Canada) Inc.* Comparison of International Regulatory Regimes for Food Products of Biotechnology. 2000. 62 p.

PIMENTA, M. A. S. Detecção de transgênicos em soja e produtos derivados no Brasil. 74 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa/MG, Viçosa, 2003.

ROGERS, S. O.; BENEDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Man.* A6, p. 1-10, 1988.



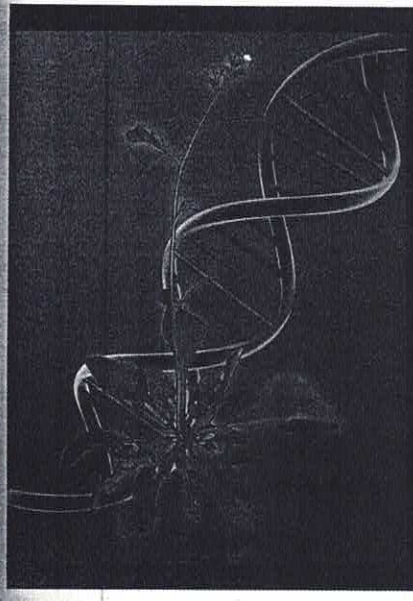
CULTURAS TRANSGÊNICAS:

uma abordagem de benefícios e riscos

Valéria Carpentieri Pípolo
Organizador

eduel

Valéria Carpentieri Pípolo
Organizador



CULTURAS TRANSGÊNICAS:

uma abordagem de benefícios e riscos

eduel
2009
LONDRINA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B616 Carpentieri-Pípolo Valéria
Culturas Transgênicas: uma abordagem de benefícios e riscos / Organizador Valéria Carpentieri-Pípolo - Londrina: EDUEL, 2009
414p.: 24cm.

ISBN 978-85-7216-508-2

1. Biossegurança. 2. Biotecnologia. 3. Agricultura
I. Carpentieri-Pípolo, Valéria, II Título.
CDD: 630

Direitos reservados à
Editora da Universidade Estadual de Londrina
Campus Universitário
Caixa Postal 6001
86051-990 Londrina PR
Fone/Fax: (43) 3371-4674
e-mail: eduel@uel.br
www.uel.br/editora

Impresso no Brasil / Printed in Brazil
Depósito Legal na Biblioteca Nacional

2009

adequ
modif

AUTORES

Marta Fonseca Martins Guimarães, Dr
Embrapa Gado de leite
Rua Eugênio do nascimento,610 | Dom Bosco
36038-330 | Juiz de Forta | MG | Brasil
mmatins@cnpgl.embrapa.br

Moyses Burachik, PhD
Dirección de Biotecnologia de La
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA)
Paseo Colón 922, Oficina 247 | Buenos Aires (1063 ACW) | Argentina
Fone: (5411) 4349-2214
mburac@mecon.gov.ar

Ricardo Vilela Abdelnoor, PhD
Embrapa Soja
Rod Carlos João Strass – Acesso Orlando Amaral
Caixa Postal 231 | 86001-970 | Londrina | PR | Brasil
Fone: (43) 3371-6000
ricardo@cnpso.embrapa.br

Silvina Chimeno Zoth, PhD
Instituto Nacional de tecnologia Agropecuária (INTA)
Cc25 Castelar B1712WAA | Buenos Aires | Argentina
schimeno@cnia.inta.gov.ar

Stephen O. Duke, PhD
United States Department of Agriculture
Agricultural Research Service- USDA/ARS
Plant Physiology Natural Products Center | University | MS 38677 | EUA
sduke@olemiss.edu

GEB