

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANA BOFF ARAUJO PINTO

**APLICAÇÃO DE METODOLOGIA DE ALTA SENSIBILIDADE
“REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA” PARA A DETECÇÃO DE GRÃOS
E SEMENTES DE SOJA *ROUNDUP READY™* EM MISTURAS VARIETAIS**

CURITIBA

2010

GIOVANA BOFF ARAUJO PINTO

**APLICAÇÃO DE METODOLOGIA DE ALTA SENSIBILIDADE
“REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA” PARA A DETECÇÃO DE GRÃOS
E SEMENTES DE SOJA *ROUNDUP READY*™ EM MISTURAS VARIETAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, no curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanete Thomaz Soccol.

Co-orientador: Marcelo Silva

CURITIBA

2010



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e dois dias do mês de outubro de 2010, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Quadragésima Terceira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos membros Prof Dr Marco Aurélio Carvalho (UP), Prof^o Dr^a Michele Rigon Spier (UFPR), Engenheiro Agrônomo Marcelo Silva (SEAB) e Prof^o Dr^a Vanete Thomaz Soccol (UFPR – orientadora da dissertação).

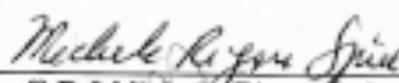
Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Giovana Boff Araujo Pinto** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: **"Aplicação de Metodologia de Alta Sensibilidade "Reação de Polimerização em Cadeia" para a Detecção de Grãos e Sementes de Soja Roundup ready™ em Misturas Varietais"**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Prof Dr Marco Aurélio Carvalho, Prof^o Dr^a Michele Rigon Spier, Engenheiro Agrônomo Marcelo Silva e Prof^o Dr^a Vanete Thomaz Soccol declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

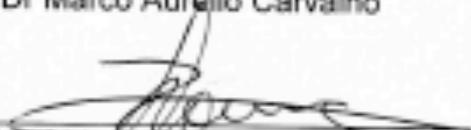
Curitiba, 22 de Outubro de 2010.



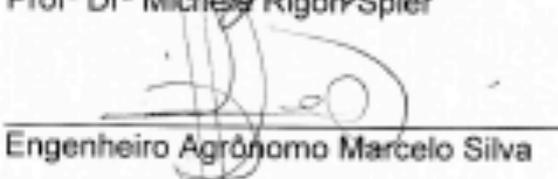
Prof Dr Marco Aurélio Carvalho



Prof^o Dr^a Michele Rigon Spier



Prof^o Dr^a Vanete Thomaz Soccol



Engenheiro Agrônomo Marcelo Silva

Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos meus pais e meu irmão, que me forneceram apoio incondicional e que acreditaram em meu esforço e capacidade para a elaboração desta dissertação de mestrado e dedico aqueles que apoiam a pesquisa, a incentivam e persistem em seus trabalhos mesmo com todas as dificuldades apresentadas no decorrer de qualquer projeto científico.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Vanete Thomaz Soccol, pelos ensinamentos, correções e incentivos consagrados na orientação deste trabalho.

Aos colegas, amigos, técnicos e funcionários presentes no laboratório pelo período no qual a realização das análises foi elaborada pela ajuda e sabedoria oferecidos.

À minha família, aos meus pais, meus avós e meu irmão pelo suporte e incentivo proporcionados durante todo o mestrado e toda a vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pela oportunidade de realização deste trabalho e a todos os professores do programa pelos conhecimentos apresentados.

Ao programa CAPES/REUNI pelo auxílio financeiro concedido.

À Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB-PR) por ceder amostras, material didático e legislativo. Ao chefe da Divisão de Fiscalização da Produção e Comércio de Insumos e de Serviços Agrícolas (DEFIS), Adriano Riesemberg.

Ao Engenheiro Agrônomo Marcelo Silva, pelo grande apoio e estímulo proporcionados constantemente durante todas as etapas do desenvolvimento deste, visando à realização e concretização deste trabalho.

À Empresa Paranaense de Classificação de Produtos (CLASPAR) por ceder o laboratório e equipamentos utilizados na realização de análises deste trabalho. Especialmente ao engenheiro agrônomo Osvaldo de Castro Olsen pelos ensinamentos e auxílio técnico.

RESUMO

O crescente aumento das culturas de sementes transgênicas e do comércio de produtos que contenham derivados dos mesmos foi constatado ao longo dos anos. Este fator levou a consolidação das indústrias de produtoras de sementes geneticamente modificadas no mundo. Atualmente, observa-se uma manifestação de interesses antagônicos envolvendo a comercialização destes produtos em relação aos produtos sem traços de transgenia. A dicotomia entre o risco avaliado e a percepção dos riscos dos transgênicos define o seu nível de aceitação entre as diferentes sociedades globais. Uma planta geneticamente modificada (PGM) é um organismo vivo que possui suas características genéticas alteradas de maneira não natural, ou seja, cuja composição gênica foi alterada por meio de processo de engenharia genética. Este é conhecido como um evento de transformação e tem sido amplamente aplicado às *commodities* agrícolas. Assim, a soja *Roundup Ready*[™] (*RR*[™]), evento GTS 40-3-2, tornou-se a cultura predominante de sementes transgênicas no mundo. Esta variedade foi desenvolvida para conferir à soja tolerância ao herbicida a base do princípio ativo glifosato, da marca comercial *Roundup Ready*[™], desenvolvido e patenteado pela *Monsanto Company*. Questões relativas à detecção e a rastreabilidade dos OGMs auferiram um grande interesse mundial, devido à difusão global crescente e por suas implicações sócio-econômicas e na saúde da população. Além disso, com a utilização excessiva de transgênicos na produção de alimentos, foram estabelecidos regulamentos de rotulagem, produção, comercialização e destinação em diversos países para proteger os direitos dos consumidores e produtores. Além da busca pela regulamentação, as questões de interesse do consumidor resultaram no desenvolvimento de diferentes métodos para detectar e/ou quantificar alimentos derivados de culturas geneticamente modificadas e de suas matérias-primas. O presente trabalho pretendeu estabelecer uma metodologia que poderia ser aplicada como padrão qualitativo às sementes e grãos de soja comercializados no Brasil, em acordo com a normatização do País e com as comunidades estrangeiras. Foram utilizados dois métodos de extração para identificar as melhores qualidades de DNA extraídos de grãos e sementes de soja. O método de Brometo de Hexadecil Trimetil Amônio (CTAB) demonstrou os melhores resultados na extração do DNA genômico das amostras. A técnica de PCR padronizada para verificação de pureza varietal foi capaz de detectar a presença de quantidades conhecidas de soja *RR*[™] em misturas intencionais de sementes OGMs em quantidades conhecidas de sementes convencionais. A sensibilidade da metodologia mostra que o método é confiável e facilmente reproduzível desde que os padrões pré-estabelecidos sejam seguidos. Baseado neste estudo, o método poderá ser ajustado para a identificação de OGMs em outras matérias-primas alimentícias e, também, para alimentos processados.

Palavras-chave: Soja *Roundup Ready*[™]. Reação de Polimerização em Cadeia. Certificação e Detecção de Sementes e Grãos Geneticamente Modificados.

ABSTRACT

The strong increase in genetic modified seed production verified over the years led to a consolidation of the transgenic seed industries worldwide. Currently, expressive antagonistic issues have risen regarding the trade of these products in relation to the products without any transgenic trace. The dichotomy between the evaluated risk and the perceived risk of transgenic use has defined their level of acceptability among the different global societies. A Genetically Modified Plant (PMO) is a living organism whose genetic composition has been altered by means of genetics technology. This process is referred to as the transformation event and has been widely applied to agricultural commodities. Thus, the Roundup Ready™ (RR™), soy event GTS 40-3-2, developed by Monsanto Company has become the most prevalent transgenic crop in the world. This variety was developed to confer in-plant tolerance to glyphosate-based agricultural herbicide Roundup Ready™. With the widespread use of GMOs in food production, labeling regulations have been established in some countries to protect the right of consumers and producers. Further than regulatory demand, consumer concern issues have resulted in the development of several methods to detect and quantify foods derived from genetically engineered crops and their raw materials. Polymerase Chain Reaction has proved to be the method of choice to detect the presence or absence of the introduced genes of GMOs at the DNA level. In this study, it was utilized two methods of DNA extraction for identifying the best quality of DNA of the samples. The Cetyl Trimethylammonium Bromide (CTAB) has showed to be the best method for the DNA extraction of the samples. The present paper aimed to verify if the PCR technique can detect RR™ soybean seeds among conventional seeds. The results showed that this method could be applied with high sensibility in order to certificate conventional soybean seeds.

Keys words: Roundup Ready™ soybean. Polymerase Chain Reaction. Certification. Certification and Detection of Genetically Modified Seeds and Grains.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - VERIFICAÇÃO MACROSCÓPICA DA CONTAMINAÇÃO VARIETAL DE SEMENTES DE SOJA REALIZADA PELA EMPRESA PARANAENSE DE CLASSIFICAÇÃO DE PRODUTOS (CLASPAR).....	22
FIGURA 2 - RECORTE DO BOLETIM DE ANÁLISE EMITIDO PELA EMPRESA PARANAENSE DE CERTIFICACAO DE PRODUTOS (CLASPAR).....	22
FIGURA 3 - SEMENTES DE SOJA PRESTES A SEREM COLHIDAS, SEM DISTINÇÃO DE TRAÇOS DE TRANSGÊNIA.....	23
GRÁFICO 1 - COMPARATIVO DA PRODUÇÃO E ÁREA PLANTADA DE SEMENTES DE SOJA NO MUNDO, NA AMERICA DO SUL, NOS EUA E NO BRASIL, DURANTE A SAFRA DE 2008/2009.....	37
GRÁFICO 2 - SÉRIE HISTÓRICA DA SOJA NO BRASIL.....	38
FIGURA 4 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA.....	47
FIGURA 5 - ESQUEMA DE UMA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE SOB APLICAÇÃO DE VOLTAGEM.....	47
FLUXOGRAMA 1 - PROCEDIMENTOS GERAIS REALIZADOS NO PRESENTE TRABALHO.	48
FIGURA 6 - CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL PARA AS AMOSTRAS DE CAMPO.....	50
FIGURA 7 - CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DAS AMOSTRAS CERTIFICADAS.....	51
FIGURA 8 - <i>CONTAINER</i> COM 10 KG DE SOJA CONVENCIONAL.....	52
FIGURA 9 - SEMENTES CONVENCIONAIS RETIRADAS EM PEQUENAS PORÇÕES DE DIFERENTES PONTOS E PROFUNDIDADES DO <i>CONTAINER</i>	52
FIGURA 10 - 500 g DE SEMENTES CONVENCIONAIS RETIRADAS DO <i>CONTAINER</i>	52
FIGURA 11 - CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL EM UMA DAS AMOSTRAS.....	53

FIGURA 12 - ETAPA DE LIMPEZA DE UM DOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA ETAPA DE TRITURAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	54
FIGURA 13 - FARELO DE SOJA OBTIDO APÓS O PREPARO DA AMOSTRA.....	54
FIGURA 14 - DNA EXTRAÍDO PELO MÉTODO CTAB CORRESPONDENTES ÀS AMOSTRAS DE CAMPO, E RESPECTIVO CONTROLE DA EXTRAÇÃO.....	60
FIGURA 15 - AMOSTRAS DE DNA DE SEMENTES DE SOJA EXTRAÍDOS PELO KIT EUROFINS GENESCAN.....	61
FIGURA 16 - AMOSTRAS DE DNA DE SEMENTES DE SOJA EXTRAÍDOS PELO MÉTODO CTAB.....	62
FIGURA 17 - PCR DO GENE DA LECITINA A PARTIR DO DNA PURIFICADO CONCENTRADO (SOLUÇÃO-MÃE) DE DIVERSAS AMOSTRAS.....	63
FIGURA 18 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>RR</i> TM OBTIDA A PARTIR DAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DO DNA PURIFICADO CONCENTRADO (SOLUÇÃO-MÃE).....	66
FIGURA 19 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>RR</i> TM OBTIDA A PARTIR DAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DO DNA PURIFICADO CONCENTRADO (SOLUÇÃO-MÃE) DE UMA AMOSTRA.....	67

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PRINCIPAIS NORMAS RELATIVAS AOS OGMS E AS SEMENTES NO BRASIL.....	31
QUADRO 2 - EVENTOS GM LIBERADOS PARA A COMERCIALIZAÇÃO NO BRASIL.....	32
QUADRO 3 - CATEGORIAS DAS SEMENTES COMERCIALIZADAS NO PAÍS.....	34
QUADRO 4 - NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS ORIUNDAS DA FISCALIZAÇÃO DO COMÉRCIO DE SEMENTES DE 2000 ATÉ AGOSTO DE 2010 PELA EMPRESA PARANAENSE DE CLASSIFICAÇÃO DE PRODUTOS (CLASPAR).....	40
QUADRO 5 - INICIADORES, SEQUÊNCIAS E RESPECTIVOS COMPRIMENTOS DE BANDA.....	58
QUADRO 6 - COMPONENTES DO MIX DE PCR E CONCENTRAÇÕES CORRESPONDENTES.....	58
QUADRO 7 - PROGRAMAÇÃO DOS PROCESSOS DE PCR.....	59
QUADRO 8 - RESULTADO DAS EXTRAÇÕES DE DNA PELO MÉTODO CTAB.....	59
QUADRO 9 - RESULTADO DAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE CAMPO CORRESPONDENTES AO GENE LECITINA.....	64
QUADRO 10 - RESULTADO DAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS CERTIFICADAS CORRESPONDENTES AO GENE LECITINA.....	64
QUADRO 11 - RESULTADO DAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE CAMPO CORRESPONDENTES AO GENE <i>RR</i> TM	66
QUADRO 12 - RESULTADO DAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS CERTIFICADAS CORRESPONDENTES AO GENE <i>RR</i> TM	68
QUADRO 13 - OLIGOLUCLEOTÍDEOS INICIADORES DISPONÍVEIS PARA AS AMPLIFICAÇÕES POR PCR (MÉTODO QUALITATIVO).....	69
QUADRO 14 - COMPARATIVO DOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DE OGMS.....	71

LISTA DE SIGLAS

- ABRASEM - Associação Brasileira de Sementes
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
- CAS - Chemical Abstract Service
- CLASPAR - Empresa Paranaense de Classificação de Produtos
- CQB - Certificado de Qualidade em Biossegurança
- CTAB - *Cetyl Trimethylammonium Bromide* (Brometo de Hexadecil Trimetil Amônio)
- CTBio - Comissão Técnica de Biossegurança
- CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- DEFIS - Divisão de Fiscalização da Produção e Comércio de Insumos e Serviços Agrícolas
- DERAL - Departamento de Economia Rural do Estado do Paraná
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- dNTP(s) - Desoxirribonucleotídeo(s) trifosfato(s)
- DOU - Diário Oficial da União
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FRET - *Fluorescence Resonance Energy Transfer*
- GM(s) - Geneticamente Modificado(s)
- IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- LPC - Lei de Proteção de Cultivares
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
- OGM(s) - Organismo(s) Geneticamente Modificado(s)
- pb - Pares de Base
- PCR - Polymerase Chain Reaction
- PGM - Planta Geneticamente Modificada
- PNB - Política Nacional de Biossegurança
- PR - Paraná
- REUNI - Reestruturação e Expansão das Universidades Federais
- RENASEM - Registro nacional de sementes e mudas.
- RNC - Registro Nacional de Cultivares
- RR™ - *Roundup Ready*™

S/A - Sociedade Anônima

SEAB - Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento

SNSM - Sistema Nacional de Sementes e Mudanças

STF - Supremo Tribunal Federal

TFL - Tira de Fluxo Lateral

UBS - Unidades de Beneficiamento de Sementes

LISTA DE ABREVIATURAS

art. - artigo

cap. - capítulo

ed. - edição

n° - número

v. - volume

sp. - espécies

p. - página

inc. -incorporated

LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

§ - seção

° - grau

μ - micro

°c - grau celsius

g - grama

hz - hertz

k - kilo

m - mili

m - molar

™ - trade mark

v - volts

x g - vezes a aceleração da gravidade

w - watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O LEGADO DAS SEMENTES TRANSGÊNICAS	17
1.3 CONTAMINAÇÃO VARIETAL	20
1.4 CERTIFICAÇÃO DE SEMENTES	21
1.6 OBJETIVOS.....	25
1.6.1 Objetivos Gerais	25
1.6.2 Objetivos Específicos	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 EVOLUÇÃO TECNOLÓGICA DA AGRICULTURA.....	26
2.2 MANIPULAÇÃO DE GENES	27
2.3 TRANSFORMAÇÕES GENÉTICAS DE PLANTAS	28
2.3.1 CULTIVARES TOLERANTES A HERBICIDAS.....	30
2.4 ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA RELACIONADOS AOS CULTIVOS TRANSGÊNICOS	31
2.5 ROTULAGEM DE ALIMENTOS TRANSGÊNICOS	34
2.5.1 Padrão Nacional das sementes.....	34
2.6 A SOJA.....	37
2.6.1 O sucesso da soja no Brasil	39
2.6.2 Sistema Estadual de certificação e fiscalização de sementes	40
2.6.3 Melhoramento genético da soja.....	41
2.5.3.1 Soja <i>Roundup Ready</i> TM	43
2.7 METODOLOGIAS APLICADAS À ANÁLISE DA SOJA <i>ROUNDUP READY</i> TM	44
2.7.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática	44
2.7.2 Ensaio da Tira de Fluxo Lateral.....	45
2.7.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	46
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 AMOSTRAS.....	50
3.1.1 Amostras de campo (grãos)	50
3.1.2 Sementes puras (certificadas).....	51
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	52
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	56

3.4 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA	58
3.4.1 Diluições do DNA.....	58
3.4.2 Amplificação do gene lecitina	58
3.4.3 Amplificação do gene <i>Roundup Ready</i> TM	58
3.4.4 Condições das amplificações	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO.....	61
4.1.1. Método de brometo de hexadecil trimetil amônio (CTAB).....	61
4.1.2. Extração de DNA com o kit Eurofins Genescan	61
4.2 DETECÇÕES POR PCR QUALITATIVA.....	64
4.2.1 Amplificações do gene lecitina	64
4.2.2 Amplificações do gene <i>Roundup Ready</i> TM	66
4.2.3 Diluições do DNA.....	70
4.2.4 Comparativo da PCR com outros métodos qualitativos	71
4.2.5 Análise de alimentos processados e de matérias-primas	72
5 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	76
GLOSSÁRIO	85
ANEXO 1 - IX DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2005. PADRÕES PARA PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA.	87
ANEXO 2 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DE UM BOLETIM OFICIAL DE ANÁLISE REALIZADO PELA EMPRESA PARANAENSE DE CLASSIFICAÇÃO DE PRODUTOS (CLASPAR).....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 O LEGADO DAS SEMENTES TRANSGÊNICAS

Uma planta geneticamente modificada (PGM) é um organismo vivo que possui características genéticas alteradas de maneira não natural, seja por supressão, adição, troca ou modificação de, no mínimo, um gene. Tais modificações geralmente buscam desenvolver plantas tolerantes ao ataque de insetos e/ou a ação de herbicidas (FERMENT et al., 2009).

Autorizados para comercialização nos Estados Unidos da América (EUA) desde 1994, os cultivos transgênicos, vinculados as promessas de obtenção de uma rentabilidade maior, despertaram o interesse de agricultores em todo o mundo. A superfície cultivada com PGM, em 1998, foi estimada em aproximadamente 30 milhões de hectares, dos quais 74% nos EUA. Para o ano de 2015 estima-se um cultivo de 200 milhões de hectares distribuídos entre mais de 40 países (PELAEZ; SCHMIDT, 2000).

Esse fato fez com que as indústrias de desenvolvimento e de venda de sementes transgênicas se consolidassem. Atualmente, poucas empresas controlam quase a produção de sementes transgênicas no mundo. Tradicionalmente implantadas nos ramos químico e farmacêutico, Monsanto, Novartis, AstraZeneca, Aventis e DuPont migraram para o ramo sementeiro reproduzindo variedades transgênicas, com destaque para a soja *Roundup Ready™* (*RR™*). Este evento transgênico mais cultivado em todo o mundo apresenta sequência genética que confere à soja tolerância aos herbicidas à base de glifosato (doravante “Tecnologia *RR™*”), tecnologia esta de propriedade da Monsanto Company e/ou Monsanto Technology LLC (ambas designadas Monsanto Company).

Originalmente o Brasil manteve-se à margem do processo de expansão dos cultivos transgênicos observados em outros importantes produtores de *commodities* agrícolas nas Américas, como a Argentina, o Canadá, os Estados Unidos da América (EUA) e o México. Entretanto, o constante apelo ao avanço tecnológico, impulsionado pela introdução ilegal de sementes de soja *RR™*,

através das fronteiras sulinas, levou o Governo Federal a regulamentar a produção, o comércio e o consumo daquele que seria o primeiro evento transgênico autorizado no país. Ao editar o Comunicado nº 54 de primeiro de outubro de 1998, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) concluiu que não há evidências de risco ambiental ou à saúde humana e animal, decorrentes da utilização da soja *RR*[™] (SCHOLZE, 2010).

Permanece, entretanto, a manifestação de interesses antagônicos a despeito do cultivo, do consumo e da comercialização dos transgênicos no mundo, posto que, ao mesmo tempo em que se verificam segmentos interessados pela disseminação ampla de sementes transgênicas, existe outro que exige produtos convencionais.

Além da preocupação com a saúde da população, visto os possíveis riscos para a saúde e para o meio ambiente, grande parte das polêmicas originadas com a questão discutida, está diretamente relacionada aos aspectos da conveniência e oportunidades socioeconômicas e do interesse nacional.

Nesse tocante, a liberdade de escolha do consumidor e do agricultor adquire relevância na medida em que não se dispõe ainda de uma infra-estrutura capaz de monitorar os efeitos dos organismos geneticamente modificados a longo prazo, tampouco de assegurar a rastreabilidade de cadeias devidamente segregadas. A disponibilidade de métodos imunológicos e moleculares validados para a detecção e quantificação de traços transgênicos em sementes e alimentos processados é, assim, um elemento chave na implementação da Política Nacional de Biossegurança (PNB).

É de fundamental importância destacar, ainda, o poder do monopólio das empresas de biotecnologia sobre o controle da reprodução das sementes, na medida em que a transgenia traz em seu bojo um sistema de rastreabilidade que permite um controle contínuo e eficaz sobre o pagamento dos direitos de propriedade intelectual (*royalties*), mesmo de lavouras contaminadas involuntariamente.

Das 771 cultivares de soja registradas até o momento no Registro Nacional de Cultivares (RNC), órgão vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), 269 são cultivares de soja *RR*[™]. Cultivadas lado a lado, é alta a probabilidade de contaminação. É prerrogativa do Estado assegurar o fornecimento de sementes naturais livres de contaminação.

Sementes sustentam a base das cadeias agrícolas e o desenvolvimento de uma metodologia confiável e de custo acessível como agente controlador é de relevância estratégica (MAPA, 2010).

1.2 CONSTRUÇÃO DO MARCO REGULATÓRIO

Com a sanção da Lei Federal nº 11.105 de 24 de março de 2005 (Lei de Biossegurança), o País sedimentou seu marco regulatório para a avaliação dos riscos associados ao cultivo e ao consumo dos organismos geneticamente modificados. A lei estrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), colegiado composto de 27 cientistas brasileiros que respondem pela análise dos riscos, concluindo pela liberação ou não de variedades transgênicas. Normas e procedimentos complementares são editados pelos Órgãos de Registro e Fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, do Ministério da Saúde e do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, Lei Federal nº 11.105 de 24/03/2005).

Entre as diversas atribuições delegadas, compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a fiscalização da produção de sementes, medida que busca auferir padrões de identidade e de qualidade pré-estabelecidos (BRASIL, Lei Federal nº 11.105 de 24/03/2005).

Dentre os diversos parâmetros regulamentados, destaca-se a determinação da presença e quantidade de diferentes cultivares contidas no lote a ser comercializado. Deste modo, quando os limites pré-determinados são extrapolados na determinação de pureza varietal, o lote é considerado impróprio para a comercialização (BRASIL, Lei Federal nº 11.105 de 24/03/2005).

Como consequência da inserção das PGM no país, houve mudanças e adaptações na legislação da União para tratar dos assuntos relativos à biossegurança e à proteção de cultivares. Contudo, surge a defasagem dos métodos laboratoriais aplicados para verificação da pureza varietal dos lotes amostrados, na medida em que os procedimentos atuais não contemplam testes para detecção de transgenia.

1.3 CONTAMINAÇÃO VARIETAL

Após a liberação legal e disseminação do uso de cultivares de soja transgênicas tolerantes ao herbicida de princípio ativo glifosato, o uso de tiras de fluxo lateral (teste qualitativo) é essencial à identificação de materiais geneticamente modificados quando da verificação de misturas de cultivares.

As Regras para Análise de Sementes editadas pela Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária do MAPA em 1992 dispõem que a verificação do item “Outras Cultivares” deve levar em consideração os descritores constantes da descrição de cada cultivar junto ao Registro Nacional de Cultivares (RNC) (essencialmente, coloração do hilo, forma e brilho da semente, reação à peroxidase e coloração do hipocótilo) (BRASIL, Lei Federal nº 11.105 de 24/03/2005).

Nas análises de amostras da fiscalização do comércio de sementes de soja não GM, vem sendo constatado que lotes de sementes conformes aos padrões para verificação de outras cultivares, apontam resultado positivo na detecção de OGM quando do adicional teste com as tiras de fluxo lateral (ANEXO 02 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DE UM BOLETIM OFICIAL DE ANÁLISE REALIZADO PELA CLASPAR) (SILVA, 2010).

No estado do Paraná, o órgão fiscalizador público, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), possui um Departamento de Fiscalização (DEFIS), específico para que este controle seja sustentado. As análises são realizadas em laboratórios parceiros da entidade. Os técnicos da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB) rematam pela impossibilidade de se apurar a mistura de cultivares geneticamente modificadas sem a realização de testes laboratoriais adicionais, a exemplo, pelo uso das tiras de fluxo lateral, em razão da semelhança das características fenotípicas entre determinadas cultivares geneticamente modificadas e não geneticamente modificadas (SILVA, 2010).

As empresas produtoras de sementes alegam não existir contaminação nos lotes de sementes produzidos, à medida que o MAPA não fixou limites ou metodologia analítica para a detecção de sementes transgênicas em lotes de semente convencional. Também não foi elaborada uma norma cuja produção e

comercialização de sementes deva obedecer ao limite quantitativo de tolerância de 2 a 10 sementes de outras cultivares, variável segundo a categoria da semente (SILVA, 2010).

Não ocorrendo o cumprimento das normas pelo infrator, o Ministério Público, atuando conforme a constituição em defesa dos direitos da sociedade autua o infrator fazendo com que este firme um termo de compromisso de ajustamento de conduta. Neste termo o infrator deve adotar medidas específicas para atender às exigências legais vigentes sob pena de sofrer sanções quando do inadimplemento das obrigações assumidas (SILVA, 2010).

1.4 CERTIFICAÇÃO DE SEMENTES

É necessário que as sementes utilizadas pelos produtores agrícolas possuam alta qualidade, ao mesmo tempo em que apresentem baixo risco ao consumidor. Portanto, visto que a variedade transgênica é amplamente utilizada no âmbito nacional e mundial, a certificação de sementes, por uma metodologia confiável e de custo acessível e possibilidade de realização em tempo curto é fundamental como agente controlador.

Como é função de o Estado assegurar a fitossanidade das lavouras, fiscalizar o padrão das sementes e o devido uso de agrotóxicos, o Departamento de Fiscalização e Defesa Agropecuária (DEFIS/SEAB), tem executado inúmeras ações fiscais que comprovam que a coexistência entre lavouras transgênicas e convencionais, mantida as atuais características fundiárias e estruturais da agricultura brasileira, em especial a paranaense, é impraticável (SILVA, 2010).

Os pontos mais relevantes detectados pelo DEFIS/SEAB, dizem respeito à mistura varietal de sementes transgênicas em lotes de sementes de soja convencional certificada, ao aumento do consumo de agrotóxicos e da média global de resíduo de glifosato e de seu metabólito, AMPA, em grãos de soja transgênica e aos seguidos casos de contaminação (SILVA, 2010).

Entre os aspectos observados durante a certificação de sementes de soja, o mais complexo se constata na determinação da pureza varietal (ANEXOS 01 - Instrução Normativa nº 25, de 16/12/2005). Este processo é

realizado com o auxílio de descritores morfológicos associados à semente, tais como tamanho médio, formato, coloração e aspecto do tegumento, cor e formato do hilo, entre outros. Estes padrões podem sofrer influência ambiental, contudo são analisados laboratorialmente, apenas, de modo macroscópico (FIGURA 1) (Lei nº 10.711, de 05/08/2003).

Todavia, desde a liberação comercial da soja transgênica, cultivares de soja *RR*TM devidamente registradas junto ao Registro Nacional de Cultivares (RNC/MAPA), têm sido verificadas em mistura nos lotes comercializados (SILVA, 2010).

A FIGURA 2 ilustra claramente o problema que sustenta a hipótese central do presente trabalho. Esta imagem representa o resultado de um boletim de análise oficial emitido pela CLASPAR (ANEXOS 02 - Boletim Oficial). A coluna 04 (Verificação de Outros Cultivares) revela que lotes em conformidade ao padrão de mistura varietal tolerada (Inferior a 14 sementes) em 500 g, apontam resultado positivo para testes sorológico complementar (Coluna 14).

Tal motivo levou a Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento a editar Resolução Secretarial 102/2007, que estabelece no Estado do Paraná o método de imunoensaio para a detecção de transgenia em amostras fiscais de sementes de soja convencional.

A Lei Federal 10.711, de 2003 dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas, e atribui aos Estados e ao Distrito Federal a competência para elaborar normas e procedimentos complementares relativos à produção de sementes e mudas, bem como exercer a fiscalização do comércio estadual (Lei Federal 10.711, de 05/08/03).

FIGURA 1 - VERIFICAÇÃO MACROSCÓPICA DA CONTAMINAÇÃO VARIETAL DE SEMENTES DE SOJA REALIZADA PELA EMPRESA PARANAENSE DE CLASSIFICAÇÃO DE PRODUTOS (CLASPAR).



FONTE: O autor (2009).

FIGURA 2 - RECORTE DO BOLETIM DE ANÁLISE EMITIDO PELA EMPRESA PARANAENSE DE CERTIFICAÇÃO DE PRODUTOS (CLASPAR).

RESULTADOS DAS ANÁLISES										
Verificação de Outros Cultivares (Nº) em 500,0 g	GERMINAÇÃO (%)					OUTRAS SEMENTES POR NÚMERO				Detecção de OGM
	Plântulas Normais	Plântulas Anormais	Sementes Duras	Sementes Dormentes	Sementes Mortas	Outras Espécies Cultivadas (Nº) em 500,0 g	Sementes Silvestres 500,0 g	Sementes Nocivas		
								Toleradas (Nº) em 1000 g	Proibidas	
4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
18	74	26	0	-0-	0	0	0	0	0	Positivo
12	81	19	0	-0-	0	0	0	0	0	Positivo
12	86	14	0	-0-	0	0	0	0	0	Positivo
7	88	12	0	-0-	0	0	0	0	0	Positivo
16	89	11	0	-0-	0	0	0	0	0	Positivo
28	88	11	0	-0-	1	0	0	0	0	Positivo
27	88	12	0	-0-	0	0	0	0	0	Positivo

FONTE: SEAB (2009).

1.5 PROBLEMÁTICA

A semente de soja modificada geneticamente não apresenta diferenças morfológicas das variedades convencionais, de modo que sua distinção é impossível macroscopicamente (FIGURA 3), faz se necessário padronizar uma metodologia que seja altamente sensível e de baixo custo, visando sua utilização por maior número de produtores e órgãos públicos.

Como instituir um método de detecção e quantificação da presença de sementes geneticamente modificadas em amostras fiscais de semente convencional, de modo a assegurar o cumprimento da norma existente?

A necessidade de monitorar e verificar a presença transgenia em lotes de sementes convencional e matérias-primas alimentícias (grãos, farelos, entre outros) demanda o uso de métodos analíticos próprios. Estes devem ser capazes de detectar e/ou quantificar a sequência gênica ou fragmento de DNA introduzido no organismo ou as proteínas expressas por ele.

Assim, se questiona se a metodologia de PCR seria eficaz na detecção de transgenia em amostras constituídas por massa de soja convencional contaminadas por quantidades absolutamente conhecidas de soja *RR*TM. Em caso positivo qual seria o limite mínimo desta detecção.

FIGURA 3 - SEMENTES DE SOJA PRESTES A SEREM COLHIDAS, SEM DISTINÇÃO DE TRAÇOS DE TRANSGÊNIA.



FONTE: O autor (2009).

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivos Gerais

Estabelecer uma metodologia que possa ser aplicada como padrão qualitativo às sementes e grãos de soja comercializados no Brasil, em acordo com a normatização brasileira e com as comunidades estrangeiras, visto que há necessidade de certificar a qualidade dos mesmos por métodos mais específicos do que aqueles empregados na atualidade, de modo que seja viável tanto aos pequenos produtores quanto às grandes indústrias.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Extrair o DNA das amostras pelos métodos de extração Brometo de Hexadecil Trimetil Amônio (CTAB) e *Kit Eurofins Genescan* com a finalidade de determinar qual o melhor método de extração para prosseguir com as análises;
- Utilizar a Reação de Polimerização em Cadeira (PCR) para analisar a qualidade das amostras através da amplificação do gene da lecitina de soja em sementes e grãos de soja;
- Verificar a presença de grãos de soja *Roundup Ready™* combinadas em grãos de soja convencionais por PCR;
- Verificar a presença de sementes de soja *Roundup Ready™* combinadas em sementes de soja convencionais PCR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EVOLUÇÃO TECNOLÓGICA DA AGRICULTURA

A capacidade de alterar os ecossistemas, cuidar da terra, das plantas e dos animais em benefício próprio evoluiu até o desenvolvimento da agricultura. O marco histórico da agricultura data de 10 a 11 mil anos a.C., no Oriente Médio (BORÉM, 2004).

No período neolítico o homem vivia em florestas e alimentava-se do que a natureza ofertava. Com o passar do tempo, passou a observar o comportamento das plantas e a domesticar os animais, iniciando a interferir no ecossistema. Esta fase caracteriza o início da lavoura, onde prepondera a visão de aumentar o rendimento das colheitas por um sistema extrativista. O preparo do solo e seleção de sementes de plantas mais produtivas são exemplos de atividades realizadas neste início da evolução agrícola (BORÉM, 2004).

O próximo passo do homem em relação ao progresso da agricultura foi a incorporação dos conhecimentos científicos que resultaram na criação de agrossistemas sofisticados e de alta produtividade, culminando com a chamada revolução verde. Importantes realizações obtidas foram o melhoramento genético de plantas, a mecanização e o uso de agroquímicos (BORÉM, 2004).

Com o passar dos séculos, a população do planeta cresceu exponencialmente e, apesar dos esforços realizados para a obtenção de técnicas avançadas de produção, havia um desequilíbrio em torno desses fatores, sendo que a produção de alimentos permanecia em desvantagem. Além disto, a degradação das terras havia sendo causada devido à interferência antrópica nos ecossistemas, e a área cultivada *per capita* encontrava-se em decréscimo (BORÉM, 2004).

Desta forma, a tendência para a implementação das plantações e produções de alimentos aumentava e houve uma nova revolução tecnológica, que favorece a produção conservacionista e predomina nos dias atuais. Apontando para o desenvolvimento de agrossistemas eficientes e sustentáveis e contribuindo para conter a degradação ambiental, utilizam-se técnicas de plantio direto,

rotação de culturas, controle biológico de pragas, proteção dos recursos naturais, engenharia genética, biotecnologia (BORÉM, 2004).

A biotecnologia no século XXI é bastante diferente daquela quando este termo foi usado, em primeiro instante, no século passado para descrever procedimentos de produção de vinhos, pães e derivados lácteos. Na verdade, o que distingue os procedimentos da biotecnologia moderna com a realizada há tempos, não são os princípios envolvidos, mas as técnicas utilizadas (BORÉM, 2004).

O melhoramento genético convencional de plantas e o melhoramento molecular buscam desenvolver variedades mais úteis ao homem. A diferença entre esses processos é que o melhoramento molecular torna o desenvolvimento varietal num procedimento com resultados previsíveis, aplicando-se das notáveis técnicas de engenharia genética (BORÉM, 2004).

Para reverter a tendência da degradação ambiental progressiva da agricultura e evitar a exaustão de recursos naturais, é necessária a incorporação de avanços científicos à tecnologia de produção. Tanto os países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento têm se mobilizado para viabilizar mudanças nos paradigmas tecnológicos, visando a sustentabilidade da produção agrícola (BORÉM, 2004).

2.2 MANIPULAÇÃO DE GENES

O progresso da engenharia genética levou à introdução dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) no comércio mundial, cujos genomas são alterados pela integração de uma sequência gênica que confere um novo tratamento para o organismo (ELENIS et al., 2008).

Estes organismos alterados foram desenvolvidos na década de 70 com microrganismos, mas, apenas em meados de 80 foram obtidas as primeiras plantas transgênicas e apenas dez anos depois se iniciou a liberação destas plantas modificadas em alguns países (BORÉM, 2004).

Nos dias atuais, os métodos de manipulação de transformação de DNA são extensos e variam desde pequenos detalhes de adaptação de reagentes até

as mais sofisticadas mutações de múltiplos genes e de transferência de organelas (HIRATA, 2002).

As possibilidades de modificações aumentam em proporção geométrica, acompanhando as descobertas de novos genes, de novas ferramentas de manipulação e sistemas de análise, por meio de sistemas computadorizados de comparação de sequências de bases e de estruturas tridimensionais (HIRATA, 2002).

Segundo Hirata (2002), as modificações genéticas por recombinação são mais específicas do que as de melhoramento genético convencional, porém, requerem um número bastante elevado de provas e de tentativas de reprodução de indivíduos. Tais indivíduos podem ser microrganismos, insetos, plantas e animais.

Essas práticas são tentativas mais dirigidas que o cruzamento convencional. Assim, possuem o intuito de geração de indivíduos fenotipicamente normais, entretanto, com funções fisiológicas alteradas. Contudo, justamente devido a estas alterações, alerta-se que deve ser intensificado o cuidado com o correto destino dos resíduos provenientes de programas de modificação genética, a fim de evitar acidentes de contaminação de pessoas e animais, bem como de desastres ecológicos (HIRATA, 2002).

A obtenção do DNA transformado deve ser feita do organismo fonte, mediante técnicas de extração e isolamento adequadas para cada material. O DNA genômico é facilmente extraído e purificado, sendo que se encontra em qualquer órgão animal ou vegetal. Em contraste, o RNA é muito mais instável e deve ser obtido no tecido no qual se expressa tal proteína e convertido ao seu correspondente DNA (HIRATA, 2002).

2.3 TRANSFORMAÇÕES GENÉTICAS DE PLANTAS

As plantas geneticamente modificadas são os organismos transgênicos mais amplamente utilizados e comercializados na atualidade. Por esta razão, as sementes transgênicas exigem mais atenção e cuidados em diversos aspectos. Novas gerações de variedades de plantas modificadas vêm sendo liberadas no país com mais frequência. As modificações genéticas de plantas seguem duas

metodologias distintas a partir da forma de introdução do gene quimérico (HIRATA, 2002).

Uma das modificações pode ocorrer por contaminação bacteriana direta, por meio do uso de *Agrobacterium tumefaciens*, microrganismo que contém o vetor da transformação. Esta bactéria produz mutações em plantas por meio de transferência de conteúdo genético, o que provoca a formação de nódulos equivalentes a tumores vegetais. A partir dessa capacidade de transformação, introduzem-se os vetores desejados, e dos nódulos formados, com o auxílio de técnicas de cultura de tecidos, são regeneradas novas plantas. Os exemplares de plantas transformadas passam por um período de incubação em estufas ou casas de vegetação, seguindo-se novas análises de monitoramento da transformação. Assim, somente as plantas com as características desejadas são reproduzidas (HIRATA, 2002).

Outra metodologia de modificação de plantas, a biobalística, utiliza um propulsor de alta pressão, que projeta sobre o material a ser modificadas centenas de minúsculas esferas de metal recobertas com plasmídeo. Esses plasmídeos passam a ser absorvidos pelas células seguindo fundamentalmente o mesmo mecanismo de incorporação e mutação do DNA da planta (HIRATA, 2002).

As recentes descobertas permitiram que novas plantas transgênicas gerassem produtos desejáveis, como enzimas, polímeros e vacinas. Também houve a recente criação de plantas usadas na biorremediação de poluentes orgânicos e metais pesados (MACEK et al., 2006).

As plantas foram geneticamente modificadas para atribuir às mesmas propriedades antes não existentes. Existem aquelas que foram desenvolvidas para abranger a agricultura, como plantas com tolerância a herbicidas, a insetos, ou a vírus. Outras foram enquadradas em categorias distintas, visando, por exemplo o aumento do nível de certos componentes nutricionais. Plantas com características farmacêuticas ou industriais alteradas também foram geradas, enquanto que muitas ainda estão em desenvolvimento ou aguardando para serem liberadas para o comércio em determinados países (GACHET et al., 1999).

2.3.1 Cultivares tolerantes a herbicidas

O controle de ervas daninhas em culturas agrícolas constitui-se num dos maiores desafios enfrentados pela agricultura de larga escala. Com o advento da Revolução Verde na década de 60, métodos de controle químico tomaram lugar definitivo no campo, especialmente com a difusão de herbicidas (FERMENT et al., 2009).

Entre os diversos ingredientes ativos disponíveis no mercado, herbicidas a base de glifosato, certamente são os mais utilizados. Glifosato é o nome comum da substância química definida de N-fosfonometilglicina ou N-(fosfonometil) glicina pela nomenclatura internacional IUPAC. Com base no Chemical Abstract Service (CAS) o nome da substância é glycine, N-phosphonometyl, cujo número de registro internacional é 1071-83-6 (FERMENT et al., 2009).

A carência de herbicidas efetivos com atividade de amplo espectro é um fator que limita o manejo de plantas daninhas. Como consequência, nos cultivos convencionais, são necessárias aplicações múltiplas de herbicidas pré e pós-emergência para controlar ampla faixa de plantas daninhas (BORÉM, 2004).

Do contrário, as culturas que contêm genes de tolerância a herbicidas de amplo espectro, ao exemplo da soja *Roundup Ready (RR)*™, evento GTS 40-3-2, representam um programa avançado de manejo de plantas daninhas, pois permitem que esses herbicidas sejam aplicados em área total na pós-emergência das culturas. Deste modo, existe maior eficiência no controle de plantas daninhas e flexibilidade de manejo (LOK-TIK et al., 2004), (BORÉM, 2004).

Desde que foi introduzido no mercado, o glifosato *Roundup Ready*™ se tornou um herbicida utilizado com frequência nas colheitas de soja. É um herbicida seletivo apenas quando aplicado sobre as variedades de soja *RR*™. O mecanismo de ação do glifosato ocorre devido ao bloqueio da biossíntese de aminoácidos aromáticos, inibindo, conseqüentemente, a atividade da 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). Deste modo, o composto apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas (JUNIOR et al., 2002), (FOLONI et al., 2005).

2.4 ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA RELACIONADOS AOS CULTIVOS TRANSGÊNICOS

A implantação dos transgênicos no Brasil é objeto de um embate de posições muito contundentes, no qual vários aspectos e diferentes dimensões da ciência, da política, da ética, da economia são abordados (FERMENT et al., 2009).

Considerando os aspectos da saúde e segurança alimentar, bem como o impacto ambiental, a liberação de plantas transgênicas para o cultivo e para o consumo humano e animal e seus impactos é um tema que implica uma abordagem inter e multidisciplinar, bem como a inserção dos consumidores neste debate posto que são os destinatários finais dos produtos oriundos de tal plantio (NODARI ; GUERRA, 2003).

Neste contexto, ganha relevância o Princípio da Precaução. Proposto formalmente durante a Conferência RIO 92, o Princípio é a garantia contra os riscos potenciais que, de acordo com o estado atual do conhecimento, não podem ser ainda identificados (GOLDIM, 2001). Este Princípio afirma que a ausência da certeza científica formal, a existência de um risco de um dano sério ou irreversível requer a implementação de medidas que possam prever este dano (FERMENT et al., 2009).

Adotado pelo Brasil, o princípio sustenta a construção do marco regulatório nacional. Ao sancionar a nova lei de biossegurança, abriram-se as portas para o desenvolvimento de atividades de pesquisa e liberações comerciais de OGMs. Organizações públicas, privadas, nacionais e internacionais, bem como órgãos financiadores ou patrocinadores de atividades ou projetos devem submeter-se às prerrogativas disciplinadas pela Lei nº 11.105 (HIRATA, 2002).

Entretanto, a predominância do positivismo e de uma visão reducionista da ciência que atribui a uma causa um só efeito (um gene, uma proteína, uma função), abstraindo a complexidade das interações que se processam na matéria viva, que sejam em escala molecular ou ecossistêmica, resultou na liberação de Plantas Geneticamente Modificadas (PGMs) acompanhadas de medidas de gestão de risco bem distantes da realidade do campo (FERMENT et al., 2009).

A indefinição de critérios claros de biossegurança, a carga da CTNBio, expõe ao risco, definitivamente, a manutenção de cadeias agrícolas não transgênicas. Os cientistas membros da comissão disponibilizaram os eventos geneticamente modificados liberados para a comercialização no Brasil atualmente para as culturas do algodão, soja e milho, detalhados no QUADRO 2.

Para o desenvolvimento de atividades com OGMs as organizações públicas, privadas, nacionais e internacionais, bem como órgãos financiadores ou patrocinadores de atividades ou projetos devem submeter-se à Lei nº 8.974, certificando-se da idoneidade técnico-científica com a apresentação do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) (HIRATA, 2002).

O restante dos documentos legais se refere à Biossegurança no Brasil. Portanto, estabelecem normas para o uso de técnicas de engenharia genética e de liberação dos OGMs no meio ambiente.

No QUADRO 1 encontram-se, resumidamente, as principais normas relacionadas aos OGMs e às Sementes vigentes atualmente no Brasil. Estas se encontram divididas por ordem de data de regulamentação.

QUADRO 1 - PRINCIPAIS NORMAS RELATIVAS AOS OGMs E AS SEMENTES NO BRASIL.

Norma	Síntese
Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995.	Estabelece a criação da CTNBio e as normas e disposições relativas a atividades e projetos relacionados a OGMs e derivados.
Decreto nº 1.752, de 05 de novembro de 1995.	Regulamenta a Lei nº 8.974 e dá outras providências.
Instrução Normativa CTNBio nº 18, de 15.12.98	Dispõe sobre a liberação planejada no meio ambiente e comercial da soja <i>Roundup Ready</i> TM .
Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003.	Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças (SNSM) e dá outras providências.
Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003	Regulamenta o direito à informação quanto aos alimentos contêm ou que sejam produzidos a partir de OGMs.
Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004	Aprova o Regulamento da Lei nº 10.711, de 5/8/2003, que dispõe sobre o SNSM, e dá outras providências.
Lei nº 11.105, de 24 de Março de 2005	Normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre o manejo geral dos OGM e de seus derivados.
Decreto 5.705, de 16 de fevereiro de 2006	Promulga o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança da Convenção sobre Diversidade Biológica.
Resolução Normativa nº 2, de 27 de Novembro de 2006	Classificação de riscos de OGM e os níveis de biossegurança.
Lei nº 11.460, de 21 de março de 2007	Dispõe sobre o plantio de organismos geneticamente modificados em unidades de conservação.
Portaria nº. 520, de 10 de Julho de 2007	Institui Comissão de Avaliação de Segurança de produtos sujeitos à vigilância sanitária que contêm ou consistam de OGM e seus derivados, e dá outras providências.

Fonte: Adaptado das Legislações Acima Referidas.

QUADRO 2 - EVENTOS GM LIBERADOS PARA A COMERCIALIZAÇÃO NO BRASIL.

Eventos em Soja			
Nome comercial	Evento	Característica	Empresa
Soja Roundup Ready™	GTS 40-3-2	Tolerância ao herbicida glifosato	Monsanto
Soja Liberty Link	A2704-12	Tolerância ao herbicida glufosinato de amônio;	Bayer
Soja Liberty Link	A5547-127	Tolerância ao herbicida glufosinato de amônio;	Bayer
Soja CV127	BPS-CV127-9	Tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas	Basf
Eventos em Milho			
Milho Herculex	TC1507	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Du Pont
Milho TC1507 x NK 603	TC1507	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Du Pont
Milho Milho MON 89034	MON89034	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Monsanto
Milho MIR 162	MIR162	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Syngenta
Milho MON 810 x NK603	MON810	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Monsanto
Milho GA21	GA21	Tolerância ao herbicida glifosato	Syngenta
Milho Roundup Ready 2	NK603	Tolerância ao herbicida glifosato	Monsanto
Milho Bt11	BT 11	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Syngenta
Milho Guardian	MON 810	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Monsanto
Milho Liberty Link	T25	Tolerância ao herbicida glufosinato	Bayer
Milho MON810 x NK603	MON810	Resistente a Insetos da ordem Lepidoptera	Monsanto
Milho Bt 11 x GA21	Bt11	Resistente a insetos da ordem Lepidoptera	Syngenta
Eventos em Algodão			
Algodão Roundup	MON1445	Tolerância ao herbicida glifosato	Monsanto
Algodão MON 531 x MON	MON531 MON1445	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera e tolerância ao herbicida	Monsanto
Algodão Bollgard II	MON15985	Resistência a Insetos da ordem Lepidoptera	Monsanto
Algodão Widestrike	281-24-236	Resistente a insetos e tolerante ao herbicida glufosinato de amônio	Dow AgroSciences
Algodão LibertyLink	LLCotton25	Tolerância ao herbicida glufosinato	Bayer
Algodão Bollgard	531	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Monsanto

Fonte: Adaptado de Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), (2010).

2.5 ROTULAGEM DE ALIMENTOS TRANSGÊNICOS

No Brasil, o Código de Defesa do Consumidor, Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990, protege a vida e a saúde, e provê segurança contra os riscos provocados por práticas no fornecimento de produtos considerados nocivos. Em seu art. 6º assegura a liberdade de escolha, a educação e a divulgação sobre o consumo adequado dos produtos, bem como a informação sobre os riscos que estes produtos apresentem, através da rotulagem dos alimentos. Além disso, ela possibilita a rastreabilidade, pois, em casos de efeitos na saúde humana, os produtos rotulados seriam facilmente identificados e recolhidos.

Ao reconhecer a vulnerabilidade do consumidor e buscar harmonizar a proteção ao consumidor com a necessidade de desenvolvimento econômico e tecnológico, o código consumerista se funda nos princípios da precaução e prevenção.

A principal norma correlacionada com os OGMs na alimentação compreende o Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. A norma regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou que sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. Exige que na comercialização de alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou que sejam produzidos a partir de OGM, com presença acima do limite de um por cento do produto, o consumidor seja informado da natureza transgênica desse produto (BRASIL, Decreto nº 4680, de 24/042003).

2.5.1 Padrão Nacional das sementes

A Lei Federal nº 10.711/03 determina que a produção e comercialização de sementes devem obedecer às normas e aos padrões de identidade e qualidade estabelecidas na Instrução Normativa nº 25/05 do MAPA. Esta IN estabelece limite quantitativo de tolerância de 2 a 10 sementes de Outras Cultivares, variável segundo a categoria da semente, apurado sobre amostra de trabalho de 500 gramas.

Conforme esta norma, a certificação de sementes ou mudas é determinada pelo processo de produção de sementes ou mudas, executado mediante controle de qualidade em todas as etapas do seu ciclo, incluindo o conhecimento da origem genética e o controle de gerações. Somente poderão ser multiplicadas e comercializadas no território nacional sementes em conformidade aos parâmetros apontados para cada espécie vegetal, conforme cada categoria (QUADRO 3).

QUADRO 3 - CATEGORIAS DAS SEMENTES COMERCIALIZADAS NO PAÍS.

Semente	É o material de reprodução vegetal de qualquer gênero, espécie ou cultivar, proveniente de reprodução sexuada ou assexuada, que tenha finalidade específica de sementeira
Semente genética	É o material de reprodução obtido a partir de processo de melhoramento de plantas, sob a responsabilidade e controle direto do seu obtentor ou introdutor, onde são mantidas as suas características de identidade e pureza genéticas.
Semente básica	É o material obtido da reprodução de semente genética, realizada de forma a garantir sua identidade genética e sua pureza varietal.
Semente certificada	O de primeira geração é o material de reprodução vegetal resultante da reprodução de semente básica ou de semente genética. A semente certificada de segunda geração é o material de reprodução vegetal resultante da reprodução de semente genética, de semente básica ou de semente certificada de primeira geração.

FONTE: Adaptado da Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005.

Compete ao MAPA promover, coordenar, normatizar, supervisionar, auditar e fiscalizar as ações decorrentes desta Lei e de seu regulamento. Aos Estados e Distrito Federal compete a elaboração de normas e procedimentos complementares relativos à produção de sementes e mudas, bem como exercer a fiscalização do comércio estadual (BRASIL, Lei Federal nº 10.711, de 5/08/2003).

O Art. 18 afirma que o MAPA deve promover a organização do sistema de produção de sementes e mudas em todo o território nacional, incluindo o processo de certificação. No Art. 19 desta norma permanece evidente que a produção de sementes e mudas será de responsabilidade do produtor de sementes e mudas inscrito no Renasem, competindo-lhe zelar pelo controle de identidade e qualidade (BRASIL, Lei Federal nº 10.711, de 5/08/2003).

O Art. 20 afirma que os padrões de identidade e qualidade das sementes e mudas, estabelecidos pelo Mapa e publicados no Diário Oficial da União (DOU) são válidos em todo o território nacional. Assim, estão sujeitas à fiscalização, pelo MAPA, as pessoas físicas e jurídicas que produzam, beneficiem, analisem,

embalem, reembalem, amostrem, certifiquem, armazenem, transportem, importem, exportem, utilizem ou comercializem sementes ou mudas (BRASIL, Lei Federal nº 10.711, de 5/08/2003).

De modo que, de acordo com Art. 39 desta Lei toda semente ou muda, embalada ou a granel, armazenada ou em trânsito, identificada ou não, está sujeita à fiscalização (BRASIL, Lei Federal nº 10.711, de 5/08/2003).

O Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004, que regulamenta a Lei nº 10.711, de 05 de agosto de 2003, dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas (SNSM). Este decreto define sementes puras como sendo uma percentagem de sementes ou unidades de dispersão pertencente à espécie, bem como os procedimentos técnicos para avaliar a qualidade e a identidade de amostras em análise (BRASIL, Decreto nº 5.153, de 23/07/2004).

Veja-se que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão que estabelece o padrão para condicionar a produção e a comercialização destas sementes e mudas como sendo um conjunto de atributos de qualidade e identidade. De forma que, de acordo com este decreto, o conjunto de identificação dos progenitores e especificação do processo utilizado para a obtenção do cultivares é identificada pela origem genética (BRASIL, Lei Federal nº 10.711, de 5/08/2003)..

De acordo com o Art.35, as sementes deverão ser produzidas nas seguintes categorias: semente genética; semente básica; semente certificada de primeira geração - C1; semente certificada de segunda geração - C2; semente S1; e semente S2. O Art. 44 dispõe que é de responsabilidade exclusiva do produtor da semente, desde que a respectiva embalagem não tenha sido violada, a garantia dos seguintes fatores: Identificação da semente; sementes puras; germinação, quando a garantia for superior ao padrão nacional; sementes de outras cultivares; sementes de outras espécies; sementes silvestres; sementes nocivas toleradas; sementes nocivas proibidas; e outros fatores previstos em normas complementares (BRASIL, Lei Federal nº 10.711, de 5/08/2003).

O Art. 162 afirma que o controle de qualidade para as espécies previstas neste Capítulo, em todas as etapas da produção, é de responsabilidade do produtor de sementes e de mudas e de seu responsável técnico, conforme estabelecido neste Regulamento e em normas complementares (BRASIL, Lei Federal nº 10.711, de 5/08/2003).

A despeito das proibições, o Art. 177 condiciona que é proibido e constituem infração de natureza grave a produção, o beneficiamento, o armazenamento, a reembalagem, o comércio e o transporte de mistura de espécies ou de cultivares não autorizadas pelo MAPA. Assim, no ato da ação de fiscalização, são adotadas como medidas cautelares: a suspensão da comercialização; ou a interdição do estabelecimento, conforme o Art. 19 do capítulo XIV (BRASIL, Lei Federal nº 10.711, de 5/08/2003).

2.6 A SOJA

Os grãos de soja cultivados pertencem à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, da tribo Phaseoleae e do gênero *Glycine*. O gênero *Glycine* inclui várias espécies selvagens e cultivadas. A *glycine Max*, *Glycine max* (L.) Merr. é uma das maiores fontes de óleo, apresenta alto valor protéico para alimentação humana e animal, além de possuir propriedades medicinais e industriais e, também, na fertilização (DEN NIJS et al., 2004).

A soja é uma planta autógama, caracterizada pela homozigose. Contudo, apesar de realizar preferencialmente a auto-fecundação, pode ocorrer uma baixa taxa de fecundação cruzada nesta espécie (BORÉM, 2004).

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. A proteína de soja é a base de muitos ingredientes alimentícios, além de ser bastante utilizada pela indústria de adesivos e nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra, revestimento, papel emulsão de água para tintas. Seu uso como óleo refinado é bastante conhecido, onde se produz a lecitina de soja, um agente emulsificante utilizado em produtos alimentícios (EMBRAPA, 2010).

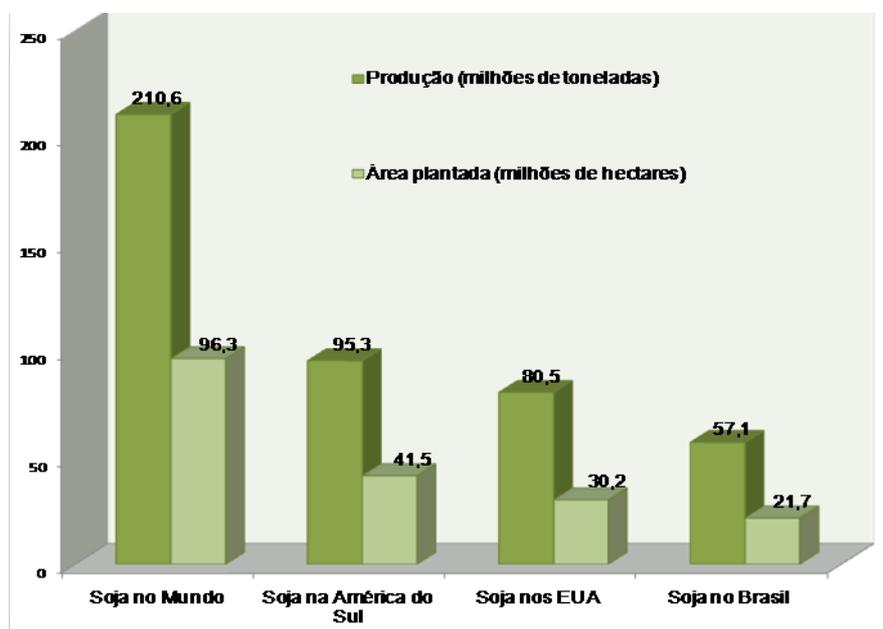
A soja cultivada na atualidade difere grandemente dos seus ancestrais, plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do rio Yangtse, na China. A evolução da soja iniciou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China.

As primeiras citações do grão aparecem no período entre 2.883 e 2.838 A.C., quando a soja era considerada um grão sagrado (EMBRAPA, 2010).

Apesar de ser conhecida e consumida pela civilização oriental, por milhares de anos, a soja só foi introduzida na Europa no final do século XV. Contudo as tentativas de introdução comercial do cultivo do grão na Rússia, Inglaterra e Alemanha fracassaram, provavelmente, devido às condições climáticas desfavoráveis. A soja passou pela Europa, onde se restringiu aos jardins botânicos. Começou a ser explorada comercialmente quando chegou aos EUA. No sul do continente americano, a soja entrou no Brasil e obteve sucesso (EMBRAPA, 2010), (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

Atualmente, a soja é um dos pilares centrais do agronegócio no Brasil, onde ocupa o segundo lugar na produção mundial (GRÁFICO 1). As previsões de crescimento sugerem que o País ocupará a primeira posição até 2012 (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

GRÁFICO 2 - COMPARATIVO DA PRODUÇÃO E ÁREA PLANTADA DE SEMENTES DE SOJA NO MUNDO, NA AMÉRICA DO SUL, NOS EUA E NO BRASIL, DURANTE A SAFRA DE 2008/2009.



FONTE: Adaptado de EMBRAPA (2010).

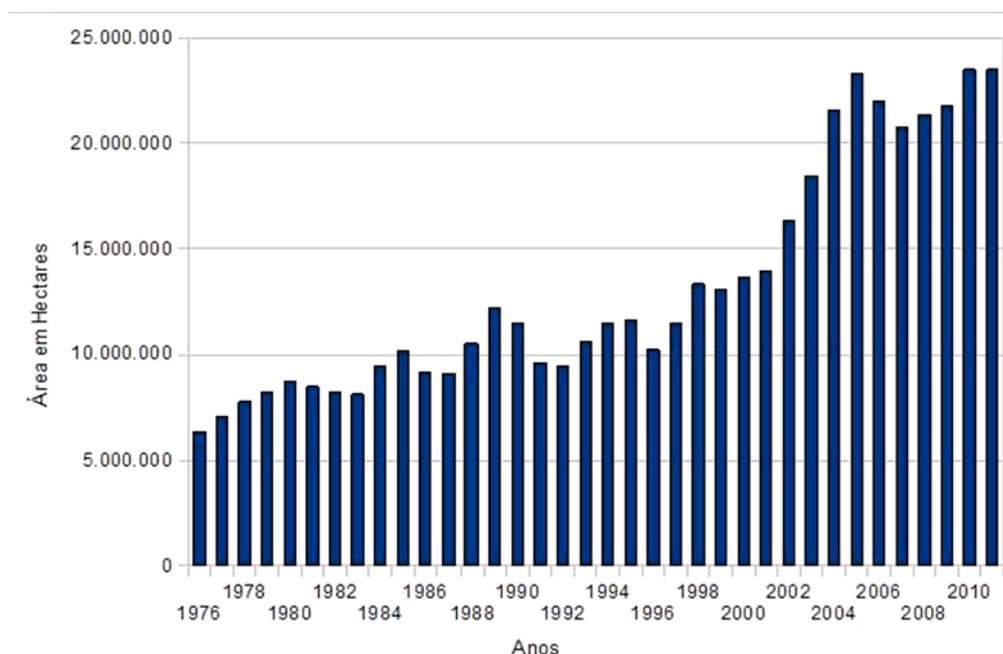
2.6.1 O sucesso da soja no Brasil

Atualmente, a soja é semeada em todas as regiões brasileiras. O GRÁFICO 2 apresenta a área cultivada em hectares (ha) de soja no Brasil. A tecnologia de produção para a soja em regiões tropicais foi desenvolvida especialmente no Brasil, onde também está o maior potencial para o aumento da produção no mundo. Ao se considerar os diversos fatores que compreendem desde o domínio da própria tecnologia até a disponibilidade de terras. Entre várias outras razões, os aspectos técnicos de produção da cultura da soja foram relevantes na determinação do sucesso da soja no Brasil, assim como alguns programas federais de incentivo fiscal-financeiro ao desenvolvimento regional. Entretanto, o retorno econômico com a cultura é ainda o maior incentivo. A crescente oportunidade em escala comercial especialmente no mercado internacional de óleo e de proteína tem mantido sua demanda firme, ainda que, mais recentemente, a situação cambial tenha diminuído preços no mercado interno (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

Entre as principais razões para o sucesso da cultura da soja no Brasil destacam-se o clima, com especial ênfase na Região Centro-Oeste (Cerrado), principalmente em relação à temperatura adequada ao cultivo durante todo o ano (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

No sul, a expansão se deu em áreas de cultivos menores e mais intensos. Na região central, a soja foi inicialmente cultivada em áreas de abertura de Cerrado e de pastagens que se caracterizavam por grandes extensões de relevo muito plano. Grandes empresas se estabeleceram na região central, posto que o relevo plano facilitou a mecanização e que, por sua vez, permitiu ganhos de produtividade e garantiram lucros com o aumento da escala (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

GRÁFICO 2 - SÉRIE HISTÓRICA DA SOJA NO BRASIL.



Fonte: Informação Oficial - Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), Divisão de Fiscalização da Produção e Comércio de Insumos e Serviços Agrícolas (DEFIS).

2.6.2 Sistema Estadual de certificação e fiscalização de sementes

O Estado do Paraná, através do Decreto nº 3.695, de 22 de julho de 1977, assumiu a certificação de sementes no Estado considerando uma série de necessidades relativas ao abastecimento de sementes de qualidade. Paralelamente, a SEAB a partir de 1981 por meio de convênio com o Ministério da Agricultura assumiu as funções de Entidade Certificadora e Fiscalizadora, por entender serem complementares as atividades e igualmente importantes, mantendo assim um rígido controle da qualidade das sementes produzidas e ofertadas aos agricultores, e tendo as informações das quantidades produzidas por espécie e das demandas do Estado.

As atividades de Certificação e de Fiscalização da Produção de Sementes e Mudas eram exercidas por Engenheiros Agrônomos devidamente treinados para essa atividade que ia desde a instalação dos campos de multiplicação ou viveiros de mudas até a sua comercialização, fazendo cumprir a antiga Lei Federal nº 6507/77 e a Lei Estadual nº 9818/91.

Com a implementação da Lei Federal nº 10.711 de 05 de agosto de 2003 (Lei de Sementes) e Decreto Federal nº 5.153 de 23 de julho de 2006, o Estado

por força de Lei deixou de executar as funções de certificador e fiscalizador da produção de sementes e de mudas que passou para a responsabilidade do MAPA.

O Estado passa então a fiscalizar apenas o comércio de sementes. Entretanto, de acordo com o § 3º do Art. 126 do Decreto 5.153 de 2004, a fiscalização será exercida somente após a emissão da nota fiscal de venda, fato que limita a ação fiscal, pois a grande maioria dos lotes de produção própria de sementes é destinada das Unidades de Beneficiamento de Sementes (UBS) diretamente aos usuários com nota de transferência.

A quantidade de amostras fiscais analisadas pelos Laboratórios Oficiais de Análise de Sementes é demonstrada pelo QUADRO 4. Nota-se que a partir do ano de 2005 cai quase que pela metade o número de amostras analisadas, ao comparar-se com o ano anterior, por ser um reflexo claro dos impactos da legislação federal de sementes (Decreto 5.153 de 2004) sobre as ações fiscais do Estado. Com este fator, a facilidade das sementes de chegarem ao mercado com baixa qualidade foi reduzida, devido ao aumento constante de seu controle.

QUADRO 4 - NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS ORIUNDAS DA FISCALIZAÇÃO DO COMÉRCIO DE SEMENTES DE 2000 ATÉ AGOSTO DE 2010 PELA EMPRESA PARANAENSE DE CLASSIFICAÇÃO DE PRODUTOS (CLASPAR).

Ano	Análises Realizadas (número)
2000	8571
2001	8326
2002	8017
2003	8583
2004	7886
2005	4720
2006	2957
2007	3861
2008	4479
2009	3598
2010	352*

FONTE: Informação Oficial - Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), Divisão de Fiscalização da Produção e Comércio de Insumos e Serviços Agrícolas (DEFIS).

2.6.3 Melhoramento genético da soja

Duas tecnologias tornaram fundamentais no melhoramento genético da soja: A tecnologia de plantas transgênicas e a tecnologia de marcadores

moleculares. Enquanto que a primeira é realidade diante da aceitação da soja pelos agricultores, a segunda vem permitindo o emprego de seleção assistida por marcadores, tanto para características monogênicas quanto para características governadas por locos de caracteres quantitativos como uma forma de acelerar o desenvolvimento de novos cultivares de soja (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

O desenvolvimento de plantas transgênicas de soja com fins comerciais nos dias de hoje está concentrada nas mãos de poucas empresas multinacionais. Essa exclusividade em tecnologia decorre não só dos custos elevados de pesquisa para a criação de um produto (planta transgênica), mas, sobretudo, dos custos na aprovação para a sua comercialização, tanto nos países produtores como nos consumidores (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

As pesquisas com o melhoramento genético da soja no Brasil iniciaram a partir de programas de melhoramento dos Estados Unidos da América, possibilitando o treinamento de pesquisadores brasileiros, fator que contribuiu de forma significativa para o sucesso da cultura no Brasil (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

Outro fator importante foi à disponibilidade de germoplasma para o melhoramento genético. Apesar de ser oriunda de país de clima temperado, a variabilidade genética existente na espécie possibilitou adaptá-la às condições dos trópicos, sendo, pois uma espécie com plasticidade suficiente para se adaptar às diferentes condições ambientais de um país extenso como o Brasil (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

Entre as contribuições tecnológicas do melhoramento genético, primeiro está a adaptação da soja às baixas latitudes por meio da introdução de genes para período juvenil longo no germoplasma brasileiro e a segunda foram os diversos trabalhos em melhoramento para a resistência genética às doenças mais expressivas da cultura. Todos esses problemas foram solucionados geneticamente num trabalho conjunto de melhoristas e fitopatologistas (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

Portanto, dentro dos diversos fatores que possibilitaram o avanço no melhoramento genético da soja está a disponibilidade de recursos humanos e germoplasma bem como a formação de uma rede de experimentação compartilhada pelos diversos programas de melhoramento genético de soja público e privada (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

Mais recentemente outros fatores vieram a contribuir para o melhoramento genético. Um deles foi a Lei de Proteção de Cultivares (LPC), que incentivou o investimento privado em melhoramento genético de soja. Outro foi a mecanização e a automação dos programas de melhoramento genético de soja com plantadeiras pneumáticas, colheitadeiras de parcelas experimentais automatizadas, coletores de dados portáteis, entre outros (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

Finalmente, é necessário destacar que todas as conquistas do melhoramento genético puderam ser rapidamente disseminadas, graças ao estabelecimento de uma indústria de produção de sementes de soja em condições tropicais, nas quais as dificuldades de produção consistentes de sementes de boa qualidade fisiológicas são maiores (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

2.5.3.1 Soja *Roundup Ready*TM

A soja tolerante ao herbicida glifosato é o cultivar transgênico mais cultivado e de maior importância comercial no mundo. A soja *Roundup Ready*TM, obtida via transformação gênica, evento GTS 40-3-2, foi desenvolvida pela Monsanto para ser tolerante ao herbicida glifosato, visando permitir seu uso no controle de ervas daninhas (BORÉM, 2004).

Essa variedade de soja possui uma forma modificada da enzima EPSPS, tornando-a tolerante a ação do herbicida, de modo que o crescimento da soja não é afetado pelos efeitos do mesmo (FOLONI et al., 2005).

O gene CP4 EPSPS, inserido nesta variedade de soja, é proveniente do microrganismo *Agrobacterium* sp., estirpe C4. O gene presente nesta bactéria natural do solo codifica uma enzima chamada 5-enolvinil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), a qual participa da reação de síntese de aminoácidos aromáticos, tais como fenilalanina, tirocina e triptofano. Assim, o DNA exógeno inserido no tecido meristemático da planta da cultivar da soja, através do método de transformação de plantas por bombardeamento de partículas. Desta forma, a proteína é expressa em todos os órgãos da planta (BORÉM, 2004).

2.7 METODOLOGIAS APLICADAS À ANÁLISE DA SOJA *ROUNDUP READY*TM

Com base nas características da modificação dos genes envolvidos, promotores, marcadores, gene objeto, terminador, vetor de transferência, forma de transferência ou tipo de alimento e nível de processamento empregado é possível propor uma metodologia adequada para a detecção e quantificação de espécies modificadas (HIRATA, 2002).

Para um organismo que tenha sofrido alteração de seu genoma, a prova da alteração consiste em identificar moléculas alteradas, ou o produto de suas alterações, como o fragmento de DNA recombinante, o RNA correspondente ou a nova proteína ou enzima sintetizada (HIRATA, 2002).

2.7.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

As proteínas sintetizadas por determinados OGMs, que não são encontradas em organismos convencionais, podem ser detectadas pela técnica de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, em inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (BINSFELD, 2004).

A técnica que tem como princípio o ensaio imunoenzimático que pesquisa a ligação antígeno-anticorpo. Um anticorpo de captura específico para a proteína-alvo (transgênica) é fixado nas cavidades da microplaca de poliestireno. Esta etapa compreende a fase de sensibilização, sendo realizada na presença do tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), que facilita a adsorção de proteínas no poliestireno (BINSFELD, 2004).

As amostras do material supostamente transgênico são adicionadas nos poços da placa, assim como o controle positivo e o controle negativo. Depois da incubação adequada, é realizada outra lavagem removendo as proteínas-alvo que não foram capturadas. Em seguida, adiciona-se e incuba-se o conjugado (segundo anticorpo específico para a proteína-alvo ligado a uma enzima). Outra lavagem é realizada antes da adição do substrato, que ao ser desdobrado pela enzima, desencadeia uma reação colorimétrica diretamente proporcional a quantidade de proteína capturada na primeira etapa do teste. A intensidade da reação pode ser mensurada através de um espectrofotômetro e comparada com uma curva padrão, obtendo-se resultados quantitativos (BINSFELD, 2004).

Para desenvolver um teste ELISA visando a detecção de uma proteína transgênica, esta deve ser identificada e estar disponível em quantidades suficientes para a produção de anticorpos, desenvolvimento do teste e para uso como padrão (BINSFELD, 2004).

Em condições ideais a sensibilidade e especificidade dos resultados atingem até 99,5%, com limites de detecção de aproximadamente 0,1%. Apesar de o método ser mais rápido e menos custoso que as técnicas moleculares, seu resultado traz menos confiabilidade (HIRATA, 2002).

2.7.2 Ensaio da Tira de Fluxo Lateral

O ensaio da Tira de Fluxo Lateral (TFL) é realizado em uma fita de nitrocelulose, que pode testar uma única amostra por vez. Este método é unicamente qualitativo, e estabelece a presença ou ausência da proteína-alvo (BINSFELD, 2004)

O imunoensaio utiliza dois anticorpos específicos para a proteína-alvo. Um anticorpo de captura e um anticorpo de detecção conjugado a partículas de ouro ou látex, capaz de gerar uma reação colorimétrica que permite a visualização da presença de uma determinada proteína em uma amostra analisada (BINSFELD, 2004)

O anticorpo de detecção é aplicado em uma das extremidades da fita. A seguir, a proteína-alvo escoar para a outra extremidade através de poros presentes na membrana da tira que contém duas zonas de captura. Uma é específica para a proteína-alvo e a outra é específica para o anticorpo de detecção. A presença de duas bandas coloridas indica que o teste é positivo para a proteína-alvo (BINSFELD, 2004).

O teste da TFL é utilizado principalmente para respostas qualitativas rápidas de uso em campo. O nível de confiança varia de 95 a 98% e detecção de até 1% de material geneticamente modificado em cerca de poucos minutos. Contudo, a limitação do uso deste método se dá pelo número reduzido de provas disponíveis, abrangendo apenas os OGMs que expressam a proteína em questão (HIRATA, 2002).

2.7.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) é o sistema de escolha para a detecção e quantificação de OGMs. A técnica apresenta altíssima sensibilidade e resultam em níveis de detecção de até 0,001% de material transformado por amostra realizada. A confiabilidade do método está em torno de 99,95%, caso todas as medidas de prevenção de falhas de amostragem sejam tomadas (HIRATA, 2002).

A PCR é uma técnica relativamente simples, pela qual moléculas de DNA ou de cDNA são amplificadas milhares ou milhões de vezes de uma forma bastante rápida. Todo procedimento é realizado *in vitro*, gerando DNA em quantidade suficiente para análises posteriores. A técnica é extremamente sensível, possibilitando sua aplicação não somente na pesquisa básica, mas também na pesquisa aplicada, como controle de qualidade industrial, entre outros (ZAHA, 2003).

A técnica permite a amplificação de segmentos curtos da molécula de DNA (aproximadamente 100-500 pares de bases). Geralmente, uma reação de amplificação contém o DNA com a sequência-alvo a ser amplificada, uma DNA-polimerase termoestável, dois iniciadores oligonucleotídeos, deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), tampão de reação e concentração adequada de $MgCl_2$. Os componentes da reação são misturados e a amostra é colocada em um termociclador. Este é um aparelho que possibilita o aquecimento e resfriamento rápido das amostras, ou seja, realiza a desnaturação e renaturação do DNA (ZAHA, 2003).

As condições iniciais para a amplificação devem ser definidas para cada par de iniciadores e cuidados especiais devem ser tomados para evitar contaminações com DNAs estranhos. A possibilidade de contaminação, através da formação de aerossóis e manipulação, deve ser eliminada (ZAHA, 2003). O princípio deste método é a amplificação específica de sequências de DNA, devido à presença de um par de pequenas moléculas de DNA e graças a região a ser amplificada (MARTIN, 1999).

A PCR se baseia na estrutura molecular do DNA. As duas fitas que formam o DNA possuem uma estrutura helical e estão ligadas por ligações de hidrogênio periódicas entre os nucleotídeos. A informação genética é como um

alfabeto baseado nas letras A, T, C e G (nucleotídeos). As duas fitas de DNA ligadas podem ser separadas uma da outra, com o aquecimento, formando a etapa de desnaturação. As interações dentro da região onde a nova fita será polimerizada são desfeitas. Após a separação do DNA em fitas individuais, cada fita é cortada por uma enzima específica. Assim, a temperatura é diminuída a aproximadamente 55°C possibilitando o anelamento dos iniciadores complementarmente a fita simples de DNA (ZAHA, 2003).

Finalmente, durante a etapa de polimerização ou extensão da nova cadeia a DNA polimerase sintetiza a nova fita. Esta etapa ocorre em aproximadamente 72°C, graças ao uso de uma DNA polimerase funcional a altas temperaturas, a mais utilizada é a Taq polimerase (FIGURA 4). Esta enzima foi extraída de uma bactéria denominada de *Thermus aquaticus*, que vive em águas quentes (MARTIN, 1999).

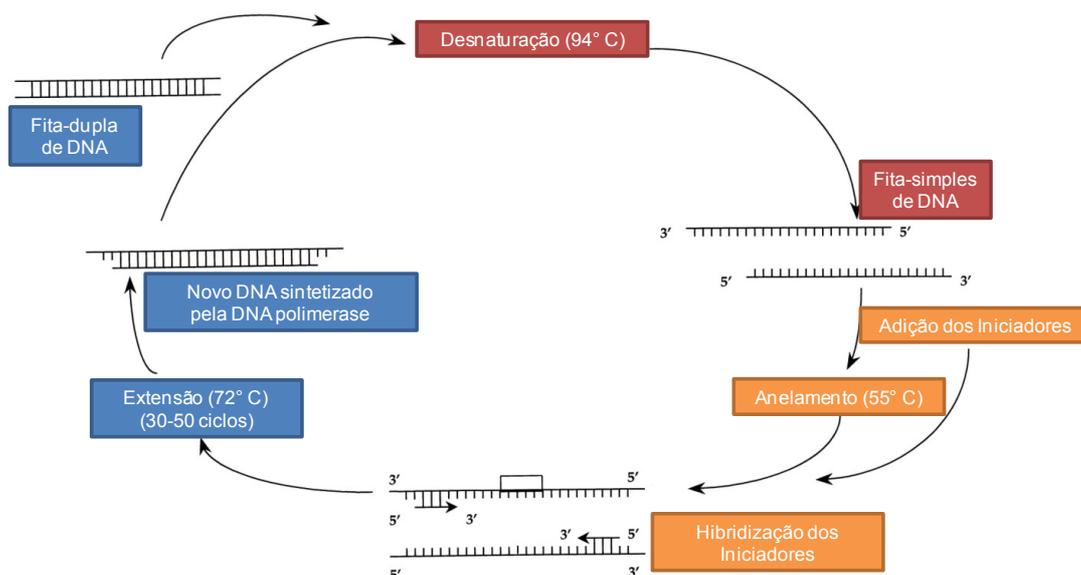
Repetindo-se várias vezes as etapas de desnaturação, anelamento e polimerização (de 20 a 50 ciclos) é possível amplificar a região de interesse do DNA-molde, de modo que o acúmulo é exponencial. A cinética da PCR depende da concentração de DNA e de sua qualidade (MARTIN, 1999), (ZAHA, 2003).

Após a extração de DNA e da termociclagem, as amostras são submetidas à eletroforese, utilizando-se gel de agarose para detectar a presença do DNA de interesse na amostra. A corrida eletroforética é realizada em meio a um tampão. As moléculas de DNA ou do produto de PCR são adicionadas ao gel de agarose, previamente fundido, com a adição do azul de bromofenol (*loading*) (MICKLOS, FREYER e CROTTY, 2005).

A migração do material pelo gel é dependente da voltagem, assim, as moléculas se movem sob a influência de uma corrente elétrica pré-estabelecida. Logo após a corrente ser aplicada ao sistema de eletroforese, o tampão da amostra deve se mover por meio do gel em direção ao pólo positivo da cuba, uma vez que o DNA é negativamente carregado (MICKLOS, FREYER e CROTTY, 2005).

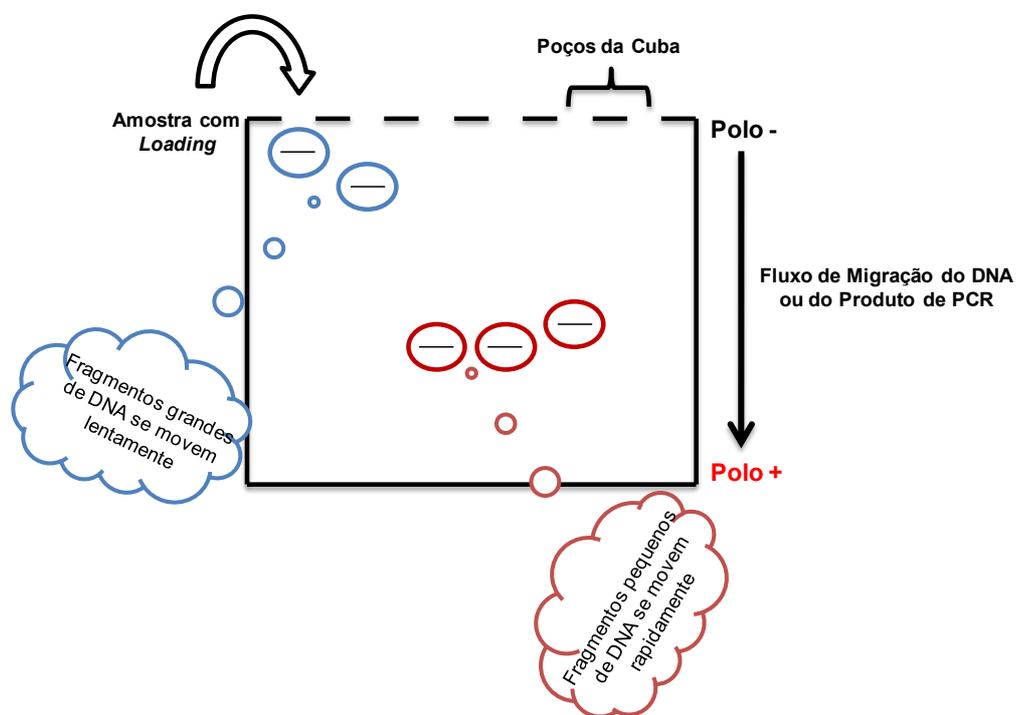
A segregação dos diferentes fragmentos de DNA é baseada em seu tamanho (FIGURA 5). Assim, quanto menor o fragmento mais ele permanecerá no fundo do gel. Após a conclusão da corrida eletroforética, o gel contendo o produto amplificado é corado em uma solução de brometo de etídio, que se adere ao DNA e emite fluorescência (MICKLOS, FREYER e CROTTY, 2005).

FIGURA 4 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA.



FONTE: Adaptado de GACHET, et al. (1999).

FIGURA 5 - ESQUEMA DE UMA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE SOB APLICAÇÃO DE VOLTAGEM.

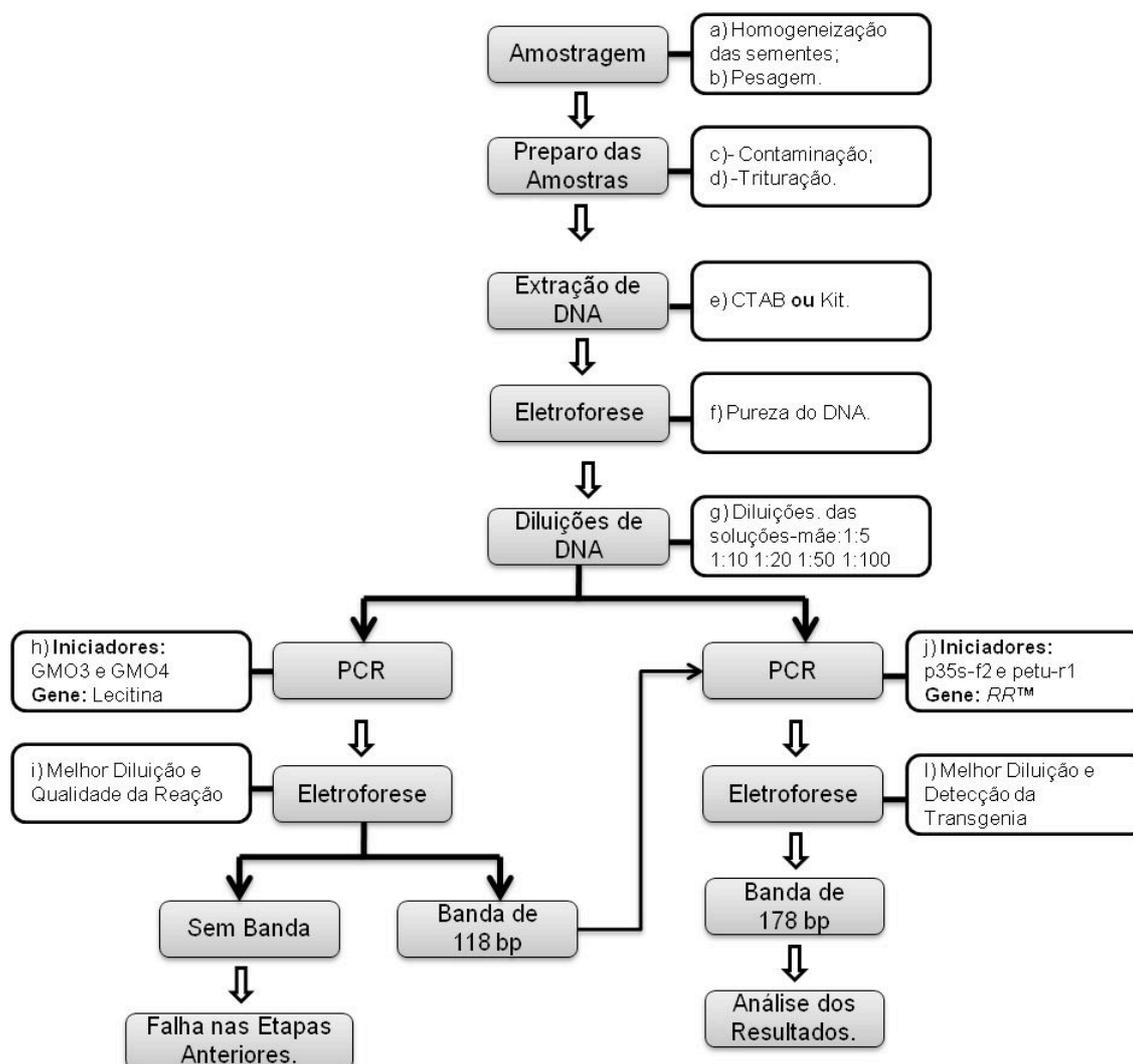


FONTE: O autor (2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de facilitar a compreensão e visualização das etapas empregadas neste trabalho, foi elaborado um fluxograma (FLUXOGRAMA 1). Os respectivos procedimentos provenientes de cada etapa principal se encontram em ordem alfabética (de “a” a “l”).

FLUXOGRAMA 1 - PROCEDIMENTOS GERAIS REALIZADOS NO PRESENTE TRABALHO.



FONTE: O autor (2010).

3.1 AMOSTRAS

A metodologia de preparo das amostras foi utilizada de acordo com o Greiner e Konietzny (2008), apoiados nas normas do *International Seed Testing Association* (ISTA). A amostragem foi adaptada para as condições locais que abrangem este trabalho.

Com a intenção de detectar pequenas concentrações de soja *RR*TM misturadas com maiores quantidades de soja convencional, a contaminação intencional da soja em amostras de campo e em amostras certificadas foi elaborada no decorrer deste trabalho.

Devido ao risco de contaminação cruzada, cada amostra foi preparada separadamente. Entre o preparo de cada amostra, realizou-se uma rigorosa limpeza e sanitização, assegurando a não-contaminação das amostras preparadas. Para confirmar a ausência de contaminação cruzada, foram analisadas amostras de soja certificadamente convencionais dentre cada amostra preparada.

3.1.1 Amostras de campo (grãos)

Os grãos de soja *Roundup Ready*TM foram adquiridos da empresa BUNGE Alimentos S/A, sendo que os grãos de soja convencionais foram adquiridos da empresa COCAMAR Cooperativa Agroindustrial.

Para garantir a qualidade dos resultados, sementes de soja-GM certificadas foram utilizadas como controle positivo de transgenia. Tais sementes foram adquiridas da Pioneer Hi-Bred International, Inc. Como controle negativo de transgenia foi utilizado amostras certificadas pela COCAMAR Cooperativa Agroindustrial.

O preparo das amostras contaminadas foi elaborado utilizando-se 100 g de soja não-GM, de modo que cada amostra foi caracterizada de acordo com a quantidade de sementes transgênicas *Roundup Ready*TM adicionadas nesta quantidade padrão de grãos.

Adicionou-se de um a quatorze grãos de soja GM, totalizando quatorze amostras contaminadas com sementes *RR*TM (FIGURA 6). No preparo dos

controles de transgenia, foram utilizados 100 g de grãos de soja-GM para a amostra de controle negativo e 100 g de sementes de soja-GM para a de controle positivo. Após a conclusão desta etapa, todas as amostras foram armazenadas em geladeira a 4 °C.

FIGURA 6 - CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL PARA AS AMOSTRAS DE CAMPO.



FONTE: O autor (2010).

3.1.2 Sementes puras (certificadas)

As sementes puras foram gentilmente fornecidas pela Secretaria da Agricultura do Estado do Paraná (SEAB). Foram utilizadas sementes soja *Roundup Ready*™ e Convencionais pertencentes à classe certificada de primeira geração (C1).

As sementes puras seguiram um padrão diferente de contaminação intencional das amostras de campo. Estas foram preparadas de acordo com os limites inferiores e superiores dos padrões para a produção e comercialização de sementes de soja no Brasil, determinados pela Lei nº 11.105 de 24 de março de

2005. A FIGURA 7 demonstra as amostras preparadas para análise subsequente, que foram feitas em triplicata para maior confiabilidade dos resultados obtidos.

FIGURA 7 - CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DAS AMOSTRAS CERTIFICADAS.



FONTE: O autor (2010).

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

O procedimento de amostragem das sementes foi realizado no laboratório da Empresa Paranaense de Classificação de Produtos (CLASPAR), de acordo com os padrões estabelecidos pelo *Seed Testing International* (ISTA), descritos a seguir.

Uma saca de 10 kg de sementes de soja convencional certificada foi despejada em um *container* apropriado (FIGURA 8), e homogeneizadas manualmente. Em seguida, pequenas porções foram retiradas em diferentes pontos do *container* até a obtenção de 500 g (FIGURAS 9 e 10).

Posteriormente, em outro *container* uma saca de 10 kg de soja *Roundup Ready*™ certificada foi despejada e homogeneizada.

As contaminações foram realizadas em triplicata para cada amostra. Na contaminação, uma semente convencional foi substituída por uma semente de soja RR™ certificada, e assim sucessivamente para cada amostra FIGURA 11).

FIGURA 8 - CONTAINER COM 10 KG DE SOJA CONVENCIONAL.



FONTE: O autor (2010).

FIGURA 9 - SEMENTES CONVENCIONAIS RETIRADAS EM PEQUENAS PORÇÕES DE DIFERENTES PONTOS E PROFUNDIDADES DO CONTAINER.



FONTE: O autor (2010).

FIGURA 10 - 500 g DE SEMENTES CONVENCIONAIS RETIRADAS DO CONTAINER.



FONTE: O autor (2010).

FIGURA 11 - CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DE UMA DAS AMOSTRAS.



FONTE: O autor (2010).

Cada amostra foi triturada até a obtenção de um farelo homogêneo. O equipamento utilizado para a trituração foi o liquidificador da Black e Decker a 127 v, 50/60 Hz, 450 W.

Para garantir que o material triturado não fosse contaminado com material modificado geneticamente, sementes controle, ou seja, sementes convencionais certificadas foram trituradas dentre cada amostra contaminada. Foram igualmente processadas 500 g da variedade de sementes certificadamente *RR*TM para assegurar um controle positivo de transigência.

Assim, foi utilizado um compressor de ar nas hélices e lâminas do liquidificador para a retirada do excesso de pó. Em seguida, o equipamento foi inteiramente lavado com água corrente e detergente.

As peças internas foram lavadas separadamente para garantir a limpeza das mesmas (FIGURA 12). Posteriormente, a sanitização foi feita com hipoclorito de sódio concentrado, o enxágue com água destilada e, em seguida, foi empregado álcool a 70%. Este procedimento foi elaborado com três ciclos de repetição. O material permaneceu secando até a futura utilização.

FIGURA 12 - ETAPA DE LIMPEZA DE UM DOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA ETAPA DE TRITURAÇÃO DAS AMOSTRAS.

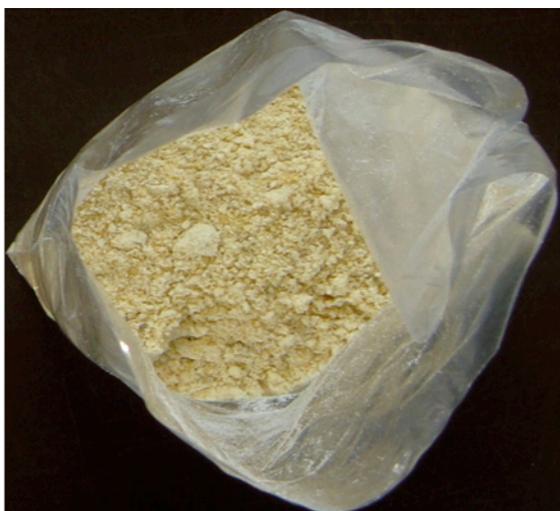


FONTE: O autor (2010).

As amostras obtidas através deste processo foram embaladas em sacos plásticos e encaixotadas em pacotes específicos e identificados, e mantidas a 4 °C.

Foi seguido o método proposto por Greiner e Konietzny (2008) para o preparo das amostras, de modo que o DNA das células vegetais pudesse ser devidamente purificado. Nesta etapa, cada amostra contaminada e, também, os controles positivo e negativo de transgenia, foram separadamente triturados até a obtenção de um farelo homogêneo (FIGURA 13).

FIGURA 13 - FARELO DE SOJA OBTIDO APÓS O PREPARO DA AMOSTRA.



FONTE: O autor (2010).

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

O método utilizado para extrair o DNA, contido nas amostras de soja trituradas, foi o método de Brometo de Hexadecil Trimetil Amônio, cuja sigla em inglês, CTAB (*Cetyl Trimethylammonium Bromide*), é utilizada rotineiramente.

O quarteamento de cada amostra foi elaborado de modo equivalente à amostragem. O protocolo de Greiner e Konietzny (2008) foi seguido, com algumas adaptações, descrito a seguir.

Foram pesados 2 g do farelo de soja em 10 mL de tampão de extração num tubo de 50 mL. O material foi homogeneizado e incubado em banho-maria por 1 hora a 60 °C, sendo durante esta incubação o material foi homogeneizado por inversão a cada 5 minutos, em seguida o material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 4.000 x g.

O sobrenadante de cada mostra, foi transferido para um novo tubo de 2 mL. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os tubos foram misturados por 30 segundos por inversão, posteriormente os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi dissolvido em 350 µL de cloreto de sódio a 1,2 M.

Adicionou-se 350 µL do clorofórmio homogeneizados por 30 segundos e centrifugados por 10 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo de 1,5 mL, sendo adicionados a ele 0,6 volumes de isopropanol. O material foi misturado por inversão e centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi removido completamente e, assim, adicionou-se 500 µL de etanol a 77%. Após a homogeneização dos tubos uma etapa de centrifugação foi elaborada, por 10 minutos a 10.000 x g.

Assim, o sobrenadante foi removido completamente e o precipitado (*pellet*) resultante permaneceu em estufa a 37 °C até a completa evaporação do etanol. O *pellet* foi diluído em 100 µL de água ultra pura esterilizada, e mantido a -20 °C. O DNA extraído, denominado de solução-mãe, foi devidamente estocado em freezer a -20 °C para garantir a sua integridade no decorrer das análises.

A literatura atual sugere que o DNA pode ser mais bem purificado ao se utilizar *Kit* de extração, como se observa no trabalho de Greiner e Konietzny (2008). Assim, o DNA das amostras certificadas foi, também, extraído pelo *Kit DNA Extractor (Clean) Eurofins GeneScan*, e subsequentemente analisado. Este

foi designado para a extração de DNA de matérias-primas, grãos e alimentos processados, descrito a seguir:

Todas as etapas foram elaboradas em temperatura ambiente, 100 g de material foi homogeneizado mecanicamente, sendo que 2 g deste foram adicionados em um tubo de 50 mL com a adição de 10 mL do tampão de lise (100mM TRIS-Cl e 100mM EDTA pH8,0) e 10 μ L de proteinase K (20mg/mL).

Após esta etapa, as amostras foram incubadas por 2 horas a 60 °C em banho-maria, sob constante agitação manual. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4.000 x g.

800 μ L do sobrenadante foram inseridos em um novo tubo de 1,5 mL. 600 μ L de clorofórmio foram adicionados e agitados. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 x g. 600 μ L do sobrenadante aquoso foi adicionado em um novo tubo de 1,5 mL e assim, a solução de glicogênio (2 μ L a 20 μ g/ μ L) foi inserida.

Foram adicionados 480 μ L de isopropanol a 80% nos tubos que, em seguida, foram incubados por 30 minutos para a precipitação do DNA. Assim, foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante foi descartado.

Posterior a este processo, foram pipetados 500 μ L de etanol a 75% nos tubos agitados e centrifugados por 5 minutos a 10.000 x g.

O sobrenadante de cada amostra foi descartado. Outra centrifugação foi realizada (1 minuto a 10.000 x g) e todo o sobrenadante foi removido cuidadosamente. O *pellet* de DNA foi dissolvido em 100 μ L de água ultra pura esterilizada.

A presença de DNA das amostras extraídas pelos dois métodos de extração foi analisada pela eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O material foi marcado com brometo de etídio na concentração 0,5 μ g/mL. Em seguida, a fotodocumentação devidamente foi realizada.

3.4 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA

3.4.1 Diluições do DNA

Uma série de diluições foi elaborada para cada amostra de DNA, a partir da solução-mãe de DNA visando avaliar a diluição mais adequada e respectiva concentração do DNA. As diluições feitas foram 1:5; 1:10; 1:20; 1:50; 1:100 utilizando-se água ultra pura esterilizada. A escolha da diluição foi formada de acordo com a intensidade de cada banda ao analisá-las no gel de agarose, por eletroforese.

3.4.2 Amplificação do gene lecitina

Para verificar a qualidade do DNA extraído, a sequência gênica correspondente ao DNA lecitina foi amplificada. O Mix de PCR desta reação continha um volume total de 25 μL , sendo que 5 μL correspondia a cada diluição de DNA.

A análise eletroforética foi realizada da seguinte maneira: 2 μL de bromofenol (*loading*) foram adicionados a 8 μL do produto de PCR amplificado e, desta forma, foi separado eletroforéticamente em um gel de agarose a 1.6% (Invitrogen Ultrapure™ Agarose) em tampão de 1x Tris-borato-EDTA (TBE). Após o término da corrida, o gel permaneceu 15 minutos em uma solução de brometo de etídio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e foi ligeiramente deixado em água ultrapura. Em seguida, a fotodocumentação foi realizada.

3.4.3 Amplificação do gene *Roundup Ready*™

Após a análise eletroforética do material amplificado, as amostras cujas bandas correspondentes ao gene lecitina foram detectadas, foram amplificadas novamente (a partir das diluições previamente realizadas) utilizando-se os iniciadores correspondentes ao gene *RR*™. As diferenças dos iniciadores e seus respectivos comprimentos de banda são apresentados no QUADRO 5.

QUADRO 5 - INICIADORES, SEQUÊNCIAS E RESPECTIVOS COMPRIMENTOS DE BANDA.

	Iniciador	Sequência do Iniciador	Comprimento
Soja Convencional	GMO3	5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'	118 pb
	GMO4	5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3'	
Soja Roundup Ready™	p35s-f2	5'-TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G-3'	172 pb
	petu-r1	5'-TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG T-3'	

FONTE: GREINER e KONIETZY (2008).

3.4.4 Condições das amplificações

A PCR correu em um volume total de 25 µL. As soluções foram mantidas no gelo para sua conservação. Um controle negativo de PCR (com água ao invés de solução de DNA) foi utilizado, para checar se ocorreu contaminação dos reagentes com a sequência-alvo. Um controle positivo de PCR (com uma sequência-alvo de DNA para checar caso os reagentes da PCR estejam em boas condições) também foi utilizado.

Utilizaram-se a enzima *Invitrogen Platinum™ Taq DNA Polymerase* e o termociclador *iCycler™* da *Bio-Rad*. No QUADRO 6 encontram-se os reagentes utilizados nas reações de PCR.

QUADRO 6 - COMPONENTES DO MIX DE PCR E CONCENTRAÇÕES CORRESPONDENTES.

Componentes	Concentração (µL)
ddH ₂ O	13.4
10 x Tampão PCR	2.5
Cloreto de Magnésio (1,5 mM)	1.0
Iniciador A ¹ (5 µM)	1.0
Iniciador B ² (5 µM)	1.0
Solução de dNTP (5.0 mM de cada)	1.0
Polimerase termoestável (5 U/µL)	0.1
DNA	5.0

FONTE: O autor (2010).

^{1, 2} No mix de PCR para amplificação do gene da lecitina, os iniciadores A e B correspondem ao GMO3 e GMO4, respectivamente. No mix de PCR para amplificar o gene *RR™* os iniciadores A e B correspondem , respectivamente, ao p35s-f2 e petu-r1.

No QUADRO 7 encontram-se as programações de cada amplificação para os genes lecitina (iniciadores GMO3 e GMO4) e *Roundup Ready*[™] (iniciadores p35s-f2 e petu-r1).

QUADRO 7 - PROGRAMAÇÃO DOS PROCESSOS DE PCR.

Etapas	GMO3 e GMO4	p35s-f2 e petu-r1
Desnaturação	95°C, 10 minutos	95°C, 10 minutos
Ciclos	35	35
Desnaturação	95°C, 30 segundos	95°C, 30 segundos
Anelamento	60°C, 30 segundos	62 °C, 30 segundos
Alongamento	72°C, 1 minuto	72 °C, 25 segundos
Alongamento Final	72°C, 3 minutos	72 °C, 03 minutos

FONTE: O autor (2010).

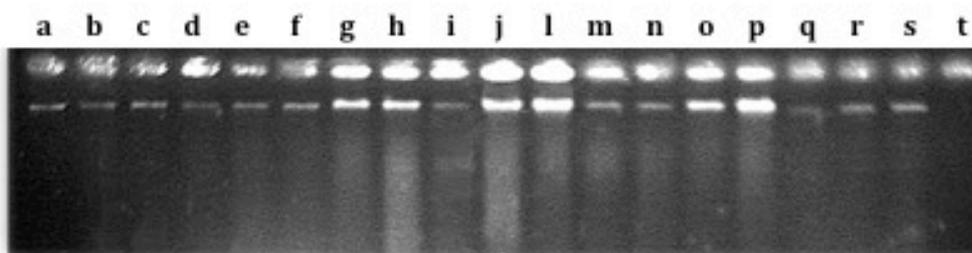
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO

4.1.1. Método de brometo de hexadecil trimetil amônio (CTAB)

O DNA obtido das amostras de soja quer seja das amostras de campo quanto às certificadas apresentou boa qualidade e quantidade (FIGURA 14), fato que permitiu a continuação do trabalho e as respectivas análises para detecção ou não da transgenia.

FIGURA 14 - DNA EXTRAÍDO PELO MÉTODO CTAB CORRESPONDENTES ÀS AMOSTRAS DE CAMPO, E RESPECTIVO CONTROLE DA EXTRAÇÃO.



Eletroforese em gel de agarose a 0,8%. De **a)** a **s)** amostras de DNA purificado; **t)** Controle negativo de extração.

FONTE: O autor (2010).

Este procedimento foi realizado para todas as amostras preparadas, tanto as de campo quanto as certificadas. Assim, o QUADRO 8 representa os resultados obtidos de acordo com as imagens observadas nos géis após as corridas eletroforéticas realizadas após a extração do DNA de cada amostra.

4.1.2. Extração de DNA com o kit Eurofins Genescan

Para comparar métodos de extração de DNA, as amostras de sementes de soja também foram submetidas à extração pelo *Kit Eurofins Genescan*. Não se

verificou bandas de DNA nas amostras extraídas por este método (FIGURA 15) mesmo com a repetição do processo de extração.

A extração de DNA pelo método CTAB apresentou-se mais eficiente de acordo com as imagens representadas nos géis de agarose dos produtos extraídos por CTAB (FIGURA 16).

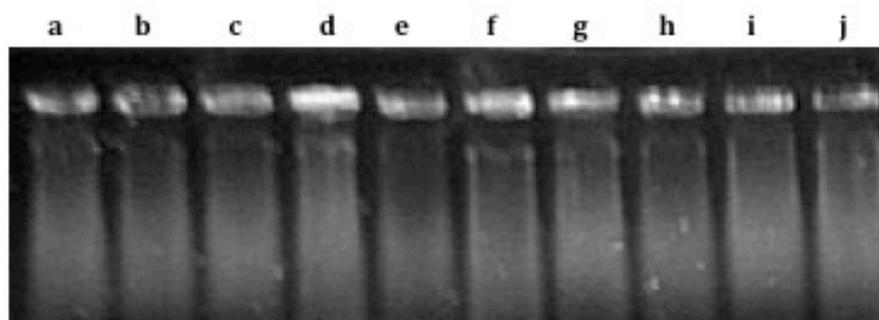
QUADRO 8 - RESULTADO DAS EXTRAÇÕES DE DNA PELO MÉTODO CTAB.

Amostras de Campo	Resultado	Amostras Certificadas	Resultado
Coca 1	+	SS1	+
Coca 2	+	SS2	+
Coca 3	+	SS3	+
Coca 4	+	SS5	+
Coca 5	+	SS6	+
Coca 6	+	SS9	+
Coca 7	+	SS10	+
Coca 8	+	SS15	+
Coca 9	+	SS20	+
Coca 10	+	SST	+
Coca 11	+	SSØ	+
Coca 12	+	Ø	+
Coca 13	+	Controle de Transgenia	+
Coca 14	+	Controle de Extração	-
Controle de Transgenia	+		
Controle de Extração	-		

O sinal positivo (+) corresponde ao resultado esperado, ou seja, à qualidade e quantidade do DNA extraído. O sinal negativo (-), somente esperado para o controle de extração, é relativo à ausência de DNA na amostra.

FONTE: O autor (2010).

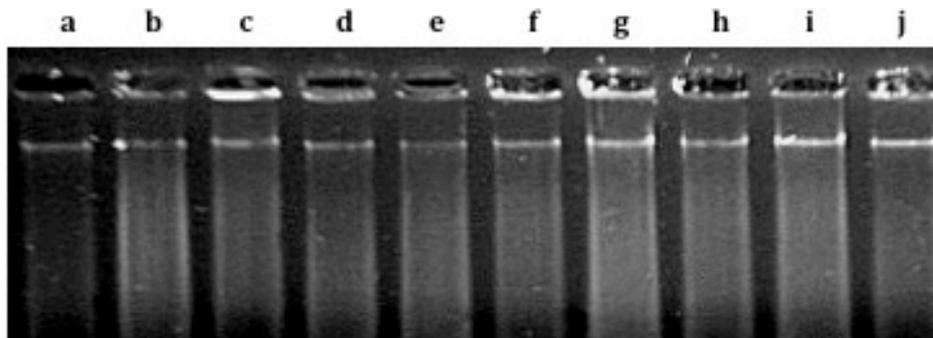
FIGURA 15 - AMOSTRAS DE DNA DE SEMENTES DE SOJA EXTRAÍDOS PELO KIT EUROFINS GENESCAN.



De a) a j) amostras de DNA purificado pelo *Kit* de extração.

FONTE: O autor (2010).

FIGURA 16 - AMOSTRAS DE DNA DE SEMENTES DE SOJA EXTRAÍDOS PELO MÉTODO CTAB.



De a) a j) amostras de DNA purificado por CTAB.

FONTE: O autor (2010).

Estes resultados são corroborados por dados obtidos por Moriuchi et al. (2005) que afirmam que o método CTAB é o protocolo padrão para a extração de DNA genômico de tecidos de plantas. Para a extração de DNA de produtos alimentares processados há necessidade de métodos que removam uma série de inibidores da reação de PCR, tais como polissacarídeos, polifenóis e proteínas. Já os grãos e as sementes não contêm tantos compostos inibidores ou contaminantes, podendo-se, assim, empregar o método padrão para a extração de DNA com eficácia (MAFRA et al., 2008). Em alimentos mais processados a extração de DNA resulta em diferentes tamanhos de fragmentos gênicos, indicando diferentes níveis de degradação de DNA de acordo com o processamento do alimento (CARDARELLI et al., 2005).

O método de extração de DNA utilizado neste trabalho já foi aplicado em análises anteriores para purificação de matérias-primas e, também, de alimentos processados contendo soja (CARDARELLI et al., 2005; MAFRA et al., 2008). A grande parte dos artigos científicos publicados avalia mais de um protocolo de extração de DNA e mostram que o CTAB apresenta ótimos resultados (MEYER, R., 1999), (GREINER; KONIETZY; VILLAVICENCIO, 2004), (CARDARELLI et al., 2005) (MORIUCHI et al., 2005), (KAKIHARA et al., 2007), (GREINER; KONIETZY, 2008), (MAFRA et al., 2008).

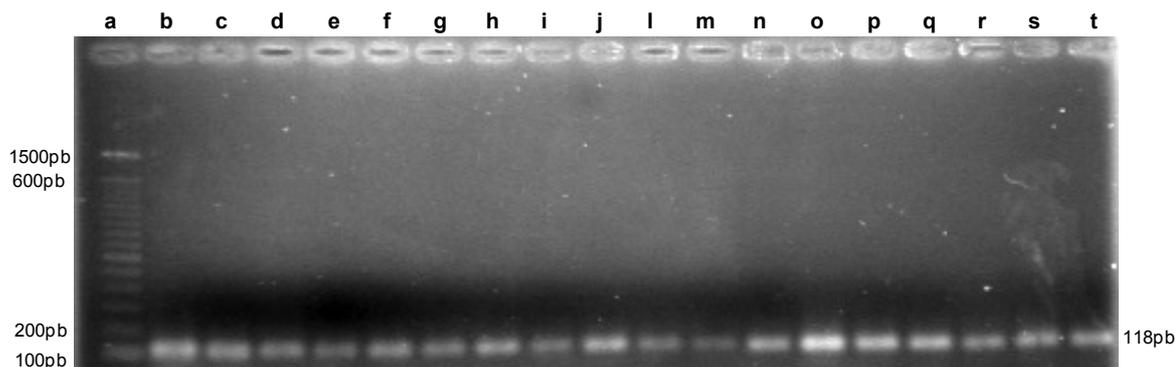
Na realidade, o sucesso dos métodos de amplificação do DNA depende dos protocolos de extração de DNA, que devem fornecer elevada quantidade e qualidade de DNA (MAFRA et al., 2008).

4.2 DETECÇÕES POR PCR QUALITATIVA

4.2.1 Amplificações do gene lecitina

A amplificação por PCR para o gene específico da soja, lecitina de soja, foi elaborada para identificar se havia inibição da amplificação pela enzima Taq polimerase. Tanto as amostras de campo quanto as amostras certificadas apresentaram a banda específica, de 118 pares de base (pb) confirmando a qualidade da amplificação e da extração do DNA (FIGURA 17, QUADROS 9 e 10).

FIGURA 17 - PCR DO GENE DA LECITINA A PARTIR DO DNA PURIFICADO CONCENTRADO (SOLUÇÃO-MÃE) DE DIVERSAS AMOSTRAS.



a) Marcador molecular de 100 pb a 1 μ g/ μ L; De b) a t) Produtos de PCR das sementes certificadas.

FONTE: O autor (2010).

Para acompanhar o processo de detecção de DNA e amplificação de sequências vários controles são necessários. Existem controles positivos, nos quais se utiliza iniciadores que amplificam um fragmento que é em qualquer caso, contido na planta sob investigação. Estes são projetados para controlar a qualidade da preparação do DNA e da adequação dos parâmetros químicos em geral para a amplificação de DNA. Uma falha na detecção, ou seja, se nenhum produto de PCR for gerado, significa que há fatores inibidores na reação, que a quantidade de DNA não é suficiente ou está em excesso, ou até mesmo que os parâmetros utilizados para que a reação ocorra não estão adequados (escolha dos iniciadores, tempo e temperatura para cada etapa da PCR, número de ciclos da amplificação de DNA) (GACHET et al., 1999).

QUADRO 9 - RESULTADO DAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE CAMPO CORRESPONDENTES AO GENE LECITINA.

Amostra	Diluição a partir da solução-mãe					
	1:1	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100
Coca 1	+	+	+	+	+	+
Coca 2	+	+	+	+	+	+
Coca 3	+	+	+	+	+	+
Coca 4	+	+	+	+	+	+
Coca 5	+	+	+	+	+	+
Coca 6	+	+	+	+	+	+
Coca 7	+	+	+	+	+	+
Coca 8	+	+	+	+	+	+
Coca 9	+	+	+	+	+	+
Coca 10	+	+	+	+	+	+
Coca 11	+	+	+	+	+	+
Coca 12	+	+	+	+	+	+
Coca 13	+	+	+	+	+	+
Coca 14	+	+	+	+	+	+
Controle de Transgenia	+	+	+	+	+	+
Controle de Extração	-	-	-	-	-	-

O sinal positivo (+) corresponde à amplificação do gene esperado. O sinal negativo (-) representa a ausência da amplificação gênica.

FONTE: O autor (2010).

QUADRO 10 - RESULTADO DAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS CERTIFICADAS CORRESPONDENTES AO GENE LECITINA.

Amostra	Diluição					
	1	01:05	01:10	01:20	01:50	01:100
SS 1	+	+	+	+	+	+
SS 2	+	+	+	+	+	+
SS 3	+	+	+	+	+	+
SS 5	+	+	+	+	+	+
SS 6	+	+	+	+	+	+
SS 9	+	+	+	+	+	+
SS 10	+	+	+	+	+	+
SS 15	+	+	+	+	+	+
SS 20	+	+	+	+	+	+
SS T	+	+	+	+	+	+
SS Ø	+	+	+	+	+	+
Ø	+	+	+	+	+	+
Controle de Transgenia	+	+	+	+	+	+
Controle de Extração	-	-	-	-	-	-

O sinal positivo (+) corresponde à amplificação do gene esperado. O sinal negativo (-) representa a ausência da amplificação.

FONTE: O autor (2010).

O método para detectar as espécies-específicas, como o gene da lecitina de soja (*le 1*) é necessário como controle da reação (HOLST-JENSEN et al., 2003). Este controle pode ser feito ao utilizar um par de iniciadores como GMO3 e GMO4, tanto para a soja convencional quanto para a soja geneticamente modificada. A reação eficaz amplifica um produto de DNA de 118 pares de base (GACHET et al., 1999).

O controle negativo, cuja solução não contém DNA, é projetado para verificar se há contaminação por DNA modificado no laboratório. Se uma banda é gerada significa que os procedimentos de prevenção contaminação dos materiais e/ou soluções utilizadas para DNA extração e amplificação falharam. No caso de um ensaio bem sucedido, o controle negativo não apresentará banda (GACHET et al., 1999).

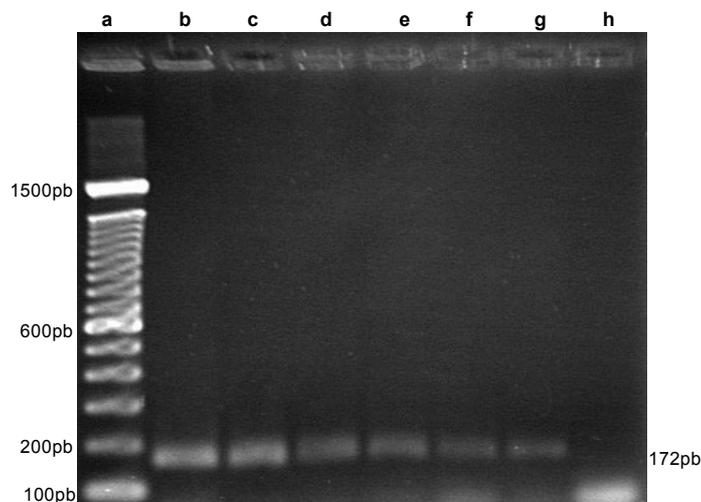
A primeira condição para a utilização de um teste para a análise da presença de DNA transgênico em ingredientes alimentares ou amostras de alimentos, é a sua especificidade (van DUIJN et al., 1999). Portanto, uma série de procedimentos foi adotada no presente trabalho para garantir a reprodutibilidade das reações. Além das amplificações do gene específico da lecitina de soja, as amostras foram preparadas em triplicata, e controles positivos e negativos de reação foram utilizados.

Outros autores também utilizaram a amplificação do gene da lecitina de soja com os mesmos iniciadores como controle (GREINER; KONIETZY e VILLAVICENCIO, 2004), (ROTT et al., 2004), (CARDARELLI, et al. 2005), e (GREINER e KONIETZY, 2008).

4.2.2 Amplificações do gene *Roundup Ready*TM

Todas as amostras analisadas, com exceção dos controles negativos, apresentaram a banda específica para o gene *RR*TM, cujo tamanho é de 172 pb, caracterizando-as, assim, como amostras transgênicas independentemente da quantidade de DNA transgênico contido na amostra (FIGURA 18). Diferentes diluições foram realizadas para averiguar qual apresentava maior intensidade da banda característica de transgenia, e observou-se que os resultados diferem entre as amostras, oscilando entre as mais contaminadas daquelas para menos contaminadas (QUADRO 11).

FIGURA 18 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE *RR*TM OBTIDA A PARTIR DAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DO DNA PURIFICADO CONCENTRADO (SOLUÇÃO-MÃE).



a) Marcador molecular de 100 pb a 1 µg/µL; b) Produto de PCR *RR*TM da solução-mãe; c) Produto de PCR *RR*TM da diluição 1/5; d) Produto de PCR *RR*TM da diluição 1/10; e) Produto de PCR *RR*TM da diluição 1/20; f) Produto de PCR *RR*TM da diluição 1/50; g) Produto de PCR *RR*TM da diluição 1/100; h) Controle negativo da reação.

FONTE: O autor (2010).

QUADRO 11 - RESULTADO DAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE CAMPO CORRESPONDENTES AO GENE *RR*TM.

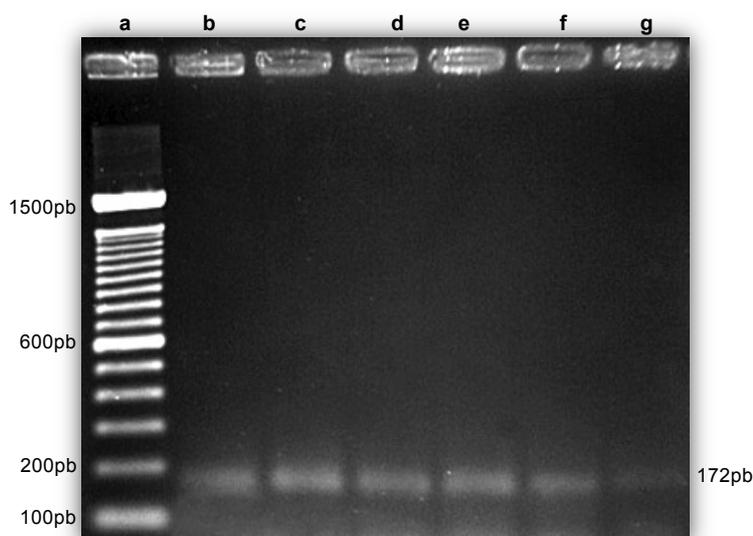
Amostra	Diluição					
	1	01:05	01:10	01:20	01:50	01:100
Coca 1	+	-	-	-	-	-
Coca 2	+	+	+	+	+	-
Coca 3	+	+	+	+	+	-
Coca 4	+	+	+	+	+	-
Coca 5	+	+	+	+	+	+
Coca 6	+	+	+	+	+	+
Coca 7	+	+	+	+	+	+
Coca 8	+	+	+	+	+	+
Coca 9	+	+	+	+	+	+
Coca 10	+	+	+	+	+	+
Coca 11	+	+	+	+	+	+
Coca 12	+	+	+	+	+	+
Coca 13	+	+	+	+	+	+
Coca 14	+	+	+	+	+	+
Controle de Transgenia	+	+	+	+	+	+
Controle de Extração	-	-	-	-	-	-

O sinal positivo (+) corresponde à amplificação do gene esperado. O sinal negativo representa a ausência da amplificação.

FONTE: O autor (2010).

O principal aspecto deste trabalho é representado de acordo com os resultados das ampliações do gene específico para soja transgênica *Roundup Ready*TM. Assim, as ampliações realizadas para identificar se a técnica molecular PCR era capaz de detectar a presença da transgenia em diferentes concentrações de soja convencional foi eficaz (FIGURA 19).

FIGURA 19 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE *RR*TM OBTIDA A PARTIR DAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DO DNA PURIFICADO CONCENTRADO (SOLUÇÃO-MÃE) DE UMA AMOSTRA.



a) Marcador molecular de 100 pb a 1 μ g/ μ L; b) Produto de PCR RR da solução-mãe; c) Produto de PCR RR da diluição 1/5; d) Produto de PCR RR da diluição 1/10; e) Produto de PCR RR da diluição 1/20; f) Produto de PCR RR da diluição 1/50; g) Produto de PCR RR da diluição 1/100.

FONTE: O autor (2010).

Diferindo dos resultados obtidos por meio da amplificação do gene *RR*TM para as amostras de campo, as amostras certificadas não mostraram ampliações diluídas nas mesmas proporções (QUADRO 12). Isto indica que o DNA concentrado foi suficiente para a amplificação gênica. No entanto, a partir das amostras contaminadas com 20 sementes de soja *RR*TM, nota-se o aparecimento das bandas características deste gene nas diferentes diluições, o que é justificado pelo fato de haver mais gene transgênico nessa amostra. De modo semelhante, a amostra de controle positivo de transgenia também apresentou as bandas nas diluições decrescentes, porém, com mais intensidade. Este fato é esclarecido devido à amostra ser genuinamente transgênica.

QUADRO 12 - RESULTADO DAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS NAS AMOSTRAS CERTIFICADAS CORRESPONDENTES AO GENE *RR*TM.

Amostra	Diluição					
	1	01:05	01:10	01:20	01:50	01:100
SS 1	+	-	-	-	-	-
SS 2	+	-	-	-	-	-
SS 3	+	-	-	-	-	-
SS 5	+	-	-	-	-	-
SS 6	+	-	-	-	-	-
SS 9	+	-	-	-	-	-
SS 10	+	-	-	-	-	-
SS 15	+	-	-	-	-	-
SS 20	+	+	+	+	+	+
SS T	+	+	+	+	+	+
SS Ø	-	-	-	-	-	-
Ø	-	-	-	-	-	-
Controle de Transgenia	+	+	+	+	+	+
Controle de Extração	-	-	-	-	-	-

O sinal positivo (+) corresponde à amplificação do gene esperado O sinal negativo representa a ausência da amplificação.

FONTE: O autor (2010).

Diferentes pares de iniciadores para a análise da soja *RR*TM em PCR foram desenvolvidos e publicados (HOLST-JENSEN et al., 2003). Estes se enquadram em categoriais que os diferem de acordo com seu nível de especificidade (QUADRO 13).

O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado neste trabalho, p35s-f2 e petu-r1, amplificam um fragmento de 172 pares de base, que contém a ligação artificial entre o promotor 35S e uma parte de um gene da petúnia. O fragmento gênico é típico da soja *Roundup Ready*TM (GACHET et al., 1999).

Trabalhos que utilizaram os mesmo iniciadores foram publicados (GREINER; KONIETZY; VILLAVICENCIO, 2004), e (GREINER; KONIETZY, 2008) e nossa escolha foi pautada na eficácia dos resultados anteriores. Segundo Dong et al., (2008) o par de iniciadores é validado por seus resultados e contínuo uso.

Outros autores empregaram diferentes iniciadores para amplificar um fragmento correspondente ao gene da soja *Roundup Ready*TM, contudo de acordo com o par de iniciador utilizado o fragmento possuiu um tamanho diferenciado (LIPP et al., 1999), (MEYER, 1999), (van DUIJN et al., 1999), (TENDEL et al.,

2001), (CARDARELLI et al., 2005), (MORIUCHI et al., 2005), (ABDULLAH et al., 2006), (KAKIHARA et al., 2007), (ZHOU et al., 2007), (MAFRA et al., 2008), (UJHELYI et al., 2008), (ZHU et al., 2008).

QUADRO 13 - OLIGOLUCLEOTÍDEOS INICIADORES DISPONÍVEIS PARA AS AMPLIFICAÇÕES POR PCR (MÉTODO QUALITATIVO).

Estratégia	Iniciador	Tamanho do Fragmento	Validação
Triagem	P35s-cf3/ P35s-cf3cr4	123 pb	Sim
	HA-nos-118f/ HA-nos-118r	118 pb	Sim
	tNOS 2-5/tNOS 2-3	151 pb	-
	35s-1/35s-2	195 pb	Sim
	35sFZMP1/35sFZMP2	158 pb	-
	nosFZMP1/ nosFZMP2	125 pb	-
Gene-específico	sttmf3a/ sttmf2a	145 pb	-
Construção-específica	GMO07/GMO08	169 pb	-
	p35s-f2/petu-r1	172 pb	Sim
	SPA/SPB	320 pb	-
	P-E35S for/ RR rev	125 pb	-
Evento-específico	RR04/RR05	180 pb	-
	41_39-L/41_39-R	151 pb	-
	41_40-L/41_40-R	177 pb	-
	35S2/RRS	359 pb	-

FONTE: Adaptado de DONG, W. et al. (2008).

4.2.3 Diluições do DNA

As diluições de DNA de cada amostra a partir das soluções-mãe de DNA preparadas anteriormente às amplificações foram utilizadas para analisar a diluição e condição mais adequada para análise dos resultados das amplificações, tanto do gene da lecitina quanto do gene *RR*TM.

Os QUADROS 09 e 10, cujos resultados representam as amplificações realizadas nas amostras de campo e certificadas, respectivamente, correspondentes ao gene da lecitina apontam que em todas as diluições das amostras (com exceção dos controles negativos) há amplificação gênica, comprovando, portanto, a qualidade do DNA extraído pelo método escolhido previamente.

O QUADRO 11, que representa os resultados obtidos das amplificações realizadas nas amostras de campo (grãos) correspondentes ao gene *RR*TM, demonstra claramente a importância das diluições. De modo que, a solução-mãe

(designada por 1), ou seja, a solução mais concentrada foi satisfatória para a amplificação gênica. Por conseguinte, de modo que as contaminações intencionais aumentavam as diluições também poderiam ser aumentadas, apresentando fragmentos gênicos possíveis de serem identificados através da amplificação do respectivo gene.

A diferença verificada dos resultados obtidos no QUADRO 12 (resultado das amplificações realizadas nas amostras certificadas (sementes) correspondentes ao gene *RRTM*) é explicado pelo fato de as amostras serem puras, ou seja, sementes certificadas possuem menos contaminantes do que grãos e, assim, apenas a amostra com mais material transgênico resultou em amplificação em todas as diluições realizadas, além do controle de transgenia.

4.2.4 Comparativo da PCR com outros métodos qualitativos

Muitos dos cultivares geneticamente modificados aprovados para comercialização contêm genes recentemente introduzidos que são expressos nas plantas transgênicas e, portanto, podem ser detectáveis pelas análises de DNA, bem como pelos métodos à base de proteínas (LÜTHY, 1999).

As técnicas imunológicas, como o ELISA, podem, portanto, permitir a detecção de produtos derivados de OGM. No entanto, todos os imunoenaios dependem da disponibilidade da nova proteína expressa nas plantas GM e da disponibilidade de anticorpos específicos. Outro obstáculo para a aplicação dos imunoenaios são os níveis de expressão bastante reduzidos nos produtos OGMs (LÜTHY, 1999).

Segundo Holst-Jensen et al. (2003) e Poms, Klein e Anklam (2004) a PCR é conhecida por ser um método muito sensível, especialmente em comparação com os métodos elaborados à base de proteínas, como a técnica de ELISA.

Sendo o código genético universal, a informação genética é sempre carregada pelo DNA seja qual for o organismo (bactéria, fungo, vegetal ou animal). Assim, o DNA é recombinado e facilmente transferido de um organismo para outro. Além disso, é uma molécula ubíqua, de modo que todas as células que formam um organismo contêm o mesmo DNA, sendo também resistente ao calor e às variações de acidez. Todas essas propriedades representam vantagens da

técnica de PCR para a detecção desta molécula nos gêneros alimentícios e sementes a frente de métodos baseados na detecção protéica (GACHET, 1999).

Assim, conclui-se que a PCR se mostra a técnica mais precisa aplicável às sementes e aos produtos comerciais, sem ser afetada pelo nível de processamento do alimento. Além disso, até agora nenhuma outra técnica de análise atingiu o mesmo nível de especificidade que o fornecido pela PCR (QUERCI et al., 2010).

O QUADRO 14 demonstra a comparação de algumas características dos testes utilizados atualmente na identificação de Soja *Roundup Ready*TM.

QUADRO 14 - COMPARATIVO DOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DE OGMS.

Características Principais	TFL	ELISA	PCR
Rapidez	+++	-	-
Custo	+++	+	-
Sensibilidade, Precisão, Confiabilidade e Reprodutibilidade	+	++	+++
Validade e Aceitação Internacionais	-	+/-	+++

FONTE: Adaptado de HIRATA, 2002.

4.2.5 Análise de alimentos processados e de matérias-primas

Moriuchi, et al. (2005) alegam que a maior parte do mercado alimentício é, voluntariamente rotulado como não-GM pelos seus respectivos fabricantes. Os autores analisaram soja semi-processada, processada e matéria-prima, utilizando o método CTAB para extração de DNA. No entanto, os resultados desse trabalho mostraram que os genes da lecitina e da soja geneticamente modificada foram amplificados em todos os produtos. De tal modo, os autores concluem que não há fiscalização suficiente na inspeção dos padrões de rotulagem de alimentos, sugerindo, desta forma, a necessidade de checar se os produtos não-GM correspondem à sua rotulagem. O método aqui validado poderia ser útil na inspeção de alimentos e regulação, não só na detecção de OGM nos alimentos, mas também na detecção de adulterações de alimentos (MAFRA et al., 2008).

De acordo com Zhou et al. (2007), o monitoramento de alimentos que contêm OGMs em sua composição é de grande importância devido ao elevado alastre dos mesmo no mundo em poucos anos, uma vez que o risco a longo prazo dos mesmos ainda não foi validado. Na verdade deve haver preocupação

com os direitos dos consumidores como para a sensibilização sobre as características de alimentos e a criação de um sistema eficaz de regulamentação para o plantio de culturas GM e fiscalização do mercado de alimentos.

Trabalhos semelhantes de monitoramento foram realizados em outros países e/ou regiões do mundo (MIRAGLIA et al., 2004), (ABDULLAH et al., 2006), (VILJOEN, DAJEE e BOTHA, 2006), (KAKIHARA et al., 2007), (UJHELYI et al., 2007), (ZHOU et al., 2007), e (MILJUŠ-DJUKIĆ et al., 2010). Nota-se que a grande maioria abrange a monitoração de alimentos derivados de matérias-primas que possam conter genes modificados em sua composição. Contudo, para que se possa analisar este estágio da cadeia alimentar, é relevante destacar a monitoração das sementes, que compõe a base desta cadeia como propõe o presente trabalho.

De acordo com Lüthy (1999), é importante destacar a autenticidade dos alimentos, visto que esta palavra é definida, geralmente, por como confiável, ou seja, de origem indiscutível. Portanto, a identificação correta das espécies alimentícias é uma questão chave para a autenticidade dos alimentos e devem ser preferencialmente com base em parâmetros que não sofram alterações durante o processamento de muitos alimentos. Os métodos baseados em PCR são exemplos de métodos confiáveis para a aplicação neste quesito.

No Brasil, trabalhos de rastreamento foram realizados visando à detecção de OGM em soja *RR*TM presente em alimentos processados (CARDARELLI et al., 2005); (GREINER; KONIETZY; VILLAVICENCIO, 2004), (GREINER; KONIETZY, 2008), (BRANQUINHO, FERREIRA e CARDARELLI-LEITE, 2010), e (DINON et al., 2010).

No entanto, nenhum trabalho avaliou a qualificação de sementes. Este trabalho direcionou as análises para sementes de soja e matérias-primas alimentícias (grãos de soja). Esta condução deu-se pois se sabe que o Brasil e, em especial o estado do Paraná, mantém a sua competitividade no mercado nacional e internacional de *commodities* agrícolas, produzindo em sua maioria sementes não geneticamente modificadas. Contudo, o desenvolvimento e, principalmente, a comercialização de plantas GM não deixa de crescer, tratando-se de uma corrida tecnológica acirrada entre as empresas líderes no mercado de sementes de variedades GM.

Considerando o avanço dos cultivos geneticamente modificados no país, torna-se relevante o uso de uma técnica de detecção eficiente, relativamente rápida e de custo-benefício acessível, cujos resultados possam ser reproduzidos em laboratórios com diferentes condições. A Reação de Polimerização em Cadeia enquadrando-se exatamente neste quesito, provando ser um método ideal para o rastreamento de grãos e sementes de soja, transgênicos ou não, desde que os padrões de controle de qualidade de reação sejam garantidos.

A coexistência de 22 eventos transgênicos liberados para comércio no Brasil nos últimos anos é preocupante tanto para o agricultor (sementes) quanto para o consumidor final (grãos e alimentos derivados), posto que ambos visam a qualidade do produto cujo fim se destina. Além disso, os produtores de determinadas sementes receiam perder mercado interno e externo caso novas variedades sejam liberadas, visto que até hoje a CTNBio aprovou todos os pedidos a ela submetidos.

Tão relevante quanto o estabelecimento de um padrão qualitativo para as sementes de soja convencional comercializadas no país, é o desenvolvimento de um padrão de metodologia quantitativa para análise de resíduos transgênicos presentes em amostras de semente de soja convencional. Outro aspecto a ser destacado é análise quantitativa de alimentos transgênicos, uma vez que os limites máximos de OGM são a base para a rotulagem obrigatória. Portanto, um método de quantificação adequado deve estar disponível ao consumidor e aos órgãos públicos.

Assim, após a análise de diferentes publicações recentes, o método de PCR em Tempo Real demonstra-se necessário de ser avaliado. Hipoteticamente, este deve gerar uma curva de detecção percentual e comparar estatisticamente sua relação com o valor absoluto e conhecido de contaminação por sementes transgênicas.

A PCR em Tempo Real poderá permitir um contínuo monitoramento do produto. A eliminação da necessidade de utilizar pós-PCR rendeu um amplo uso da PCR em Tempo Real para quantificação os OGMs. A informação obtida nas curvas de amplificação pode ser usada para quantificar a quantidade inicial de molde de DNA presente na matéria prima ou no produto.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, o método de extração de DNA de grãos e de sementes de soja que demonstrou melhor resultado foi o processo utilizando o CTAB.

A técnica de PCR padronizada neste trabalho foi capaz de detectar a presença de OGM em apenas um grão acrescentado em 100g de soja convencional e a PCR para mistura intencional foi capaz de detectar DNA de apenas duas sementes de soja transgênica em 500g de soja convencional. Portanto, a sensibilidade da metodologia demonstra que este método é confiável e facilmente reproduzível, desde que os parâmetros de controle de reação sejam seguidos conforme os padrões estabelecidos.

Assim sendo, este trabalho pode ser visto como um fio condutor que leva a pesquisa eficaz da análise qualitativa de soja convencional por PCR para possíveis tentativas de análise de outros eventos comerciais liberados no país pela mesma metodologia, desde que se adéque a cada matéria-prima a ser analisada.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, T. et al. Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. **Food Chemistry**, v. 98, p. 575-579, 2006.

ALBUQUERQUE, A. C. (Ed); SILVA, A., da (Ed). **Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas**. Vol I. Brasília - DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2008.

ANKLAM, E. The validation of methods based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in food. **Analytica Chimica Acta**, v. 393, p.177-179, 1999.

BINSFELD, P. C. **Biossegurança em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2004.

BORÉM, A. **Biotecnologia e Meio Ambiente**. Brasil: Folha de Viçosa, 2004.

BRANQUINHO, M. R., FERREIRA, R. T. B., CARDARELLI-LEITE, P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p. 220-225, 2010.

BRASIL, Resolução Normativa nº 2, de 27 de Novembro de 2006. Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção. **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)**, 2006. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3913.html>> Acesso em: 11/Junho/2008.

BRASIL, Resolução Normativa nº 5, de 12 de março de 2008. Dispõe sobre normas para liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados e seus derivados. **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)**,

2008. Disponível em:
<<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/69259.html>> Acesso em:
11/Junho/2008.

BRASIL. Decreto 5705, de 16 de fevereiro de 2006. Promulga o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança da Convenção sobre Diversidade Biológica. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 17 de fevereiro de 2006. Disponível em:
<<http://elegis.bvs.br/leisref/public/search.php??=ptewords=toxicologia+and+genetica>> Acesso em: 11/Junho/2008.

BRASIL. Decreto nº 4680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou que sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 25 de abril de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>> Acesso em: 09/Abril/2008.

BRASIL. Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas - SNSM, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 23 de julho de 2004.

BRASIL. Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas - SNSM, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 23 de julho de 2004.

BRASIL. Instrução Normativa nº 18, de 15 de dezembro de 1998. Dispõe sobre a liberação planejada no meio ambiente e comercial da soja *Roundup Ready*TM. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 30 de dezembro de 1998.

Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0000/8.pdf> Acesso em: 11/Junho/2008.

BRASIL. Instrução Normativa nº 24, de 16 de dezembro de 2005. Aprova as Normas para Produção, Comercialização e Utilização de Mudas. **Diário Oficial da União**, 20 de dezembro de 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em: 19 de junho de 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 25, de 16 de dezembro de 2005. Estabelecer normas específicas e os padrões de identidade e qualidade para produção e comercialização de sementes. **Diário Oficial da União**, 20 de dezembro de 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em: 19 de junho de 2010.

BRASIL. Lei nº 11.460, de 21 de março de 2007. Dispõe sobre o plantio de organismos geneticamente modificados em unidades de conservação; acrescenta dispositivos à Lei no 9.985, de 18 de julho de 2000, e à Lei no 11.105, de 24 de março de 2005; revoga dispositivo da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003; e dá outras providências. **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)**, 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Lei/L11460.htm> Acesso em: 18/Maio/2008.

BRASIL. Lei nº 11105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei no 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória no 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 28 de março de 2005. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm>

Acesso em: 09/Abril/2008.

BRASIL. Medida Provisória nº 131, de 25 de setembro de 2003. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja da safra de 2004, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 26 de setembro de 2003. Disponível em: <http://ftp.mct.gov.br/legis/mp/mp131_2003.htm> Acesso em: 18/Maio/2008.

BRASIL. Portaria nº 520, de 10 de julho de 2007. Institui Comissão de Avaliação de Segurança de produtos sujeitos à vigilância sanitária que contenham ou consistam de organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 12 de julho de 2007. Disponível em: <http://www.conass.org.br/admin/arquivos/PORTARIA_ANVISA_520_12_JULHO_2007.pdf> Acesso em: 09/Junho/2008.

BRASIL, Ministério da Justiça, Secretaria de Direito Econômico (SDE), Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor (DPDC). **Código de Proteção e Defesa do Consumidor**. Brasília - DF, 2009.

CARDARELLI, P. et al. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, v. 16, n. 10, p. 859-866, 2005.

CONCEIÇÃO, F. R. et al. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, v. 36, p. 315 - 324, 2006.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/>> Acesso em: 19 de julho de 2010.

CRESPO, M. T. B., et al. **Detecção de Organismos Geneticamente Modificados em Alimentos e Ingredientes Alimentares**. Disponível em <<http://www.deqb.ist.utl.pt>>. Acesso em 15 de dez. 2009.

DEN NIJS, H. C. M.; BARTSCH, D.; SWEET, J. **Introgression from Genetically Modified Plants into Wild Relatives**. UK: CABI Publishing, 2004.

DEISINGH, A. K.; BADRIE, N. Detection approaches for genetically modified organisms in foods. **Food Research International**, v. 38, p. 639-649, 2005.

DINON, A. Z. et al. Monitoring of GMO in Brazilian processed meat and soy-based products from 2007 to 2008. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 226-229, 2010.

DONG, W. et al. GMDD: a database of GMO detection methods. **BMC Bioinformatics**, v. 9:260, 2008.

ELENIS, D. S. et al. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2008.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/>> Acesso em: 20 de setembro de 2010.

FERMENT, G.; ZANONI, M.; BRACK, P.; KAGEYAMA, P.; NODARI, R. O. **Coexistência**: O caso do milho. Proposta de Revisão da Resolução Normativa nº4 da CTNBio. MDA, Brasília, 2009.

FOLONI, L. L. et al. Aplicação de Glifosato em Pós-emergência, em Soja Transgênica Cultivada no Cerrado. **Revista Brasileira de Herbicidas**, nº 3, p. 47-58, 2005.

GACHET, E. et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. **Trends in Food Science e Technology**, v. 9, p. 380-388, 1999.

GOLDIM, J. R. La Prévention et La Protection dans La Société du Risque: Le Principe de Précaution. **Elsevier**, v. 15-16, p. 23-34, 2001.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005. **Food Control**, v. 19, p. 499-505, 2008.

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

GRYSON, N.; MESSENS, E. K.; DEWETTINCK, E. K. PCR detection of soy ingredients in bread. **Eur Food Res Technol**, 2007.

HIRATA, M. H. **Manual de Biossegurança**. Barueri: Ed. Manole, 2002.

HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 985-993, 2003.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). **Handbook on Seed Sampling**, 2nd ed, p. 5-9, 2004.

JUNIOR, O. P. de A. et al. Gliofosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Química Nova**, v. 25, 2002.

KAKIHARA, Y., et al. Detection of recombinant DNA of genetically modified (GM) soybeans in heat-treated GM and comercial natto. **Food Control**, v. 18, p. 1289-1294, 2007.

LOK-TING, L. et al. Detection and characterization of recombinant DNA in the Roundup Ready soybean insert. **Food Control**, v. 15, p. 471-478, 2004.

LIPP, M. et al. Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soybeans and maize. **Food Control**, v. 10, p. 379-383, 1999.

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

MACEK, T. et al. Genetically Modified Plants with Improved Properties For Phytoremediation Purposes. **Springer Printed in the Netherlands**, p. 85-108, 2006.

MARTIN, G. G. et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. **Food Science e Technology**, v. 9, 380-388, 1999.

MAFRA, I. et al. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. **Food Control**, v. 19, p. 1183-1190, 2008.

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

MILJUŠ-DJUKIĆ, J. et al. Abundance of soybean Roundup Ready modification in food and feed samples from Serbian retail markets. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, p. 102-109, 2010.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. **A Ciência do DNA**. Segunda edição. Artmed, 2005.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 21 de setembro de 2010.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1157-1180, 2004.

MORIUCHI, R. et al. Applicability of quantitative PCR to soy processed foods containing Roundup Ready Soy. 2005.

NADAL, A. et al. A new PCR-CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events. **Electrophoresis**, v. 27, p. 3879-3888, 2006.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Revista de Nutrição**, v. 16(1), p.105-116, 2003.

PELAEZ, V.; SCHMIDT, W. A difusão dos OGM no Brasil: imposição e resistências. **Estudos Sociedade e Agricultura**, v. 14, p. 5-31, 2000.

POMS, R.E.; KLEIN C.L.; ANKLAM E. Methods for allergen analysis in food: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 21(1), p. 1-31, 2004.

QUERCI, M. et al. New approaches in GMO detection. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, p. 1991-2002, 2010.

ROTT, M. E. et al. Detection and Quantification of Roundup Ready Soy in Foods by Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 5223-5232, 2004.

SCHOLZE, S. H. C. Biossegurança e Alimentos Transgênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/biosseg.pdf>> Acesso em: 20 de Setembro de 2010.

SILVA, M. **Informatização Oficial da Divisão de Fiscalização da Produção e Comércio de Insumos e Serviços Agrícolas (DEFIS) da Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB)**. Curitiba, 02 de março de 2010. Informação verbal.

TENGEL, C. et al. PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs. *BioTechniques*, v. 31, p. 426-429, 2001.

TERRY, C. F.; HARRIS, N. Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR detection chemistries. **European Food Research Technology**, v. 213, p. 425-431, 2001.

UJHELYI, G. et al. Surveying the RR soy content of commercially available food products in Hungary. **Food Control**, v. 19, p. 967-973, 2008.

van DUIJN, G. et al. Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**, v.10, p.375-378, 1999.

VILJOEN, C. D.; DAJEE, B. K.; BOTHA, G. M. Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labeling. **African Journal of Biotechnology**, v. 5(2), p. 73-82, 2006.

WINDELS, P. et al. Characterization of the Roundup Ready soybean insert. **European Food Research Technology**, v. 213, p. 107-112, 2001.

ZAHA, A. et al. **Biologia Molecular Básica**. Terceira edição. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

ZHOU, X. et al. Monitoring of Roundup Ready™ soybean in Guangdong province in China. **Food Control**, v. 18, p. 1219-1222, 2007.

ZHU, H. et al. A specific qualitative and real-time PCR detection of MON863 maize based on the 50-transgene integration sequence. **Journal of Cereal Science**, p. 1-6, 2008.

GLOSSÁRIO

ANÁLISE DE SEMENTE: Procedimentos técnicos utilizados para avaliar a qualidade e a identidade da amostra.

CATEGORIA DE SEMENTE: Unidade de classificação, dentro de uma classe de semente, que considera a origem genética, a qualidade e o número de gerações.

CLASSE DE SEMENTE: Grupo de identificação da semente de acordo com o processo de produção.

CONTAINER: Recipiente.

COMMODITIES AGRÍCOLAS: Economicamente, são matérias-primas agrícolas utilizadas como objetos de troca em larga escala nos intercâmbios especializados.

CULTIVAR: Variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas, por margem mínima de descritores e por sua denominação própria.

FISCALIZAÇÃO: Exercício do poder de polícia, visando coibir atos em desacordo com os dispositivos desta Lei e de sua regulamentação.

GERMOPLASMA VEGETAL: Conjunto de genótipos de uma espécie vegetal.

HÍBRIDO: Resultado de um ou mais cruzamentos, sob condições controladas, entre progenitores de constituição genética distinta, estável e de pureza varietal definida.

IDENTIDADE: Conjunto de informações necessárias à identificação de sementes ou mudas, incluindo a identidade genética.

IDENTIDADE GENÉTICA: Conjunto de caracteres genotípicos e fenotípicos da cultivar que a diferencia de outras.

LENTE DIÓPTRICA: Lente que utiliza somente a refração para a formação de imagem.

ORIGEM GENÉTICA: Conjunto de informações que identifica os progenitores e especifica o processo utilizado para a obtenção de uma cultivar.

PADRÃO: Conjunto de atributos de qualidade e identidade.

PELLET: Utilizado em Biologia Molecular para representar o DNA extraído de um produto. Também pode ser considerado um pequeno sólido.

PRAGA: Qualquer espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos aos vegetais.

QUALIDADE: Conjunto de atributos inerentes a sementes ou a mudas, que permite comprovar a origem genética e o estado físico, fisiológico e fitossanitário delas.

TRANSILUMINAÇÃO: Processo no qual a luz ultravioleta passa pelo gel de agarose e se dá a visualização da área do gel corado com brometo de etídio, quando com azul de metileno ou bromofenol.

ANEXO 1 - IX DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2005. PADRÕES PARA PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA.

1. Espécie:		SOJA			
Nome científico:		<i>Glycine max</i> L.			
2. Peso máximo do lote (kg):		25.000			
3. Peso mínimo das amostras (g):					
- Amostra submetida ou média		1.000			
- Amostra de trabalho para análise de pureza		500			
- Amostra de trabalho para determinação de outras sementes por número		1.000			
4. PADRÃO					
PARÂMETROS			PADRÕES		
4.1. Campo:					
Categorias		Básica	C1 ¹	C2 ²	S1 ³ e S2 ⁴
Rotação (Ciclo agrícola) ⁵		-	-	-	-
Isolamento ou Bordadura ⁶ (mínimo em metros)		3	3	3	3
Fora de tipo (plantas atípicas) ⁷ (nº máximo)		1/2.000	1/1.000	1/700	1/350
Feijão miúdo (<i>Vigna unguiculata</i>) (nº de plantas)		zero	zero	zero	zero
Número mínimo de vistorias ⁸		2	2	2	2
Área máxima da gleba para vistoria (ha)		50	50	50	100
4.2. Semente:					
P U R E Z A	Semente pura (% mínima)	99,0	99,0	99,0	99,0
	Material inerte ⁹ (%)	-	-	-	-
	Outras sementes (% máxima)	zero	0,05	0,08	0,1
Determinação de outras sementes por número (nº máximo):					
- Semente de outra espécie cultivada ¹⁰		zero	zero	1	2
- Semente silvestre ¹⁰		zero	1	1	1
- Semente nociva tolerada ¹¹		zero	1	1	2
- Semente nociva proibida ¹¹		zero	zero	zero	zero
Verificação de outras cultivares por número ¹² (nº máximo):		2	3	5	10
Germinação (% mínima)		75 ¹³	80	80	80
Praças ¹⁴		-	-	-	-
5. Validade do teste de germinação ¹⁵ (máxima em meses)		6	6	6	6
6. Validade da reanálise do teste de germinação ¹⁵ (máxima em meses)		3	3	3	3
7. Prazo máximo para solicitação de inscrição de campos (dias após o plantio)		30	30	30	30

FONTE: BRASIL. Instrução Normativa nº 25, de 16 de dezembro de 2005.

