

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DO CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ROBSON RODRIGO MIRANDA

SHEILA BOREIKO

OTIMIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2011

ROBSON RODRIGO MIRANDA

SHEILA BOREIKO

**OTIMIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Vitória
Messias Bittencourt

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Silva

PONTA GROSSA

2011



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa

Diretoria de Graduação e Educação Profissional



TERMO DE APROVAÇÃO

**OTIMIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA SOJA GENETICAMENTE
MODIFICADA**

por

**ROBSON RODRIGO MIRANDA
SHEILA BOREIKO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 25 de outubro de 2011 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. Os candidatos foram arguidos pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Juliana Vitória Messias Bittencourt
Prof.(a) Orientador(a)

Prof. Dr. Marcio Silva
Membro titular

Prof. Msc. Renato Peres da Silva
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, o autor da vida que me proporcionou coragem, força e equilíbrio para continuar até o fim dessa maravilhosa e difícil caminhada. Agradeço a minha família que sempre esteve ao meu lado, dando apoio, incentivo e compreensão para que eu pudesse seguir em frente.

A minha orientadora professora Dr^a Juliana Vitória Messias Bittencourt e ao professor Dr. Marcio Silva por toda contribuição e sugestão para o desenvolvimento deste trabalho.

Robson Rodrigo Miranda

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de vencer mais um desafio. Também agradeço a meus queridos pais Pedro Boreiko e Olga Boreiko pelo apoio, sustento e carinho que apesar das dificuldades, sempre lutaram e continuam lutando para a realização dos meus objetivos.

Agradeço a meu namorado Alfonso Sanchez Ayala pelo companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

Em especial a professora Dr^a. Juliana Vitória Messias Bittencourt e o professor Dr. Marcio Silva pela orientação e paciência desde o primeiro momento.

A minha gratidão aos demais familiares e amigos que, embora não citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização da presente pesquisa.

Sheila Boreiko

RESUMO

MIRANDA, Robson Rodrigo; BOREIKO, Sheila. **Otimização de diagnóstico molecular para soja geneticamente modificada**. 2011. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2011.

Segundo a legislação brasileira, todo produto com mais de 1% de matéria-prima geneticamente modificada deve informar sua condição de produto transgênico no rótulo (Decreto-Lei nº 4.680 de 2003). Atualmente a soja transgênica é a semente de soja mais comercializada no mundo, e seus grãos podem ser utilizados como matéria-prima para uma série de alimentos destinados ao consumo humano, que vão desde o óleo vegetal obtido na moagem inicial das sementes, até a posterior utilização destes mesmos grãos como fontes protéicas em alimentos processados. O objetivo deste estudo foi adaptar uma tecnologia de detecção molecular de soja geneticamente modificada, para utilização em trabalhos de verificação da presença de seus resíduos em produtos alimentícios empregando técnicas moleculares baseadas em PCR. A extração de DNA das amostras do tecido foliar e de farinha de soja transgênica foi realizada seguindo protocolo publicado por Mazza e Bittencourt (2000), com ligeiras modificações, sendo realizada a avaliação de duas réplicas independentes de cada um dos materiais analisados. As reações de PCR foram conduzidas seguindo as recomendações de Tsai et al., (2010), que recomenda a adição de alguns ciclos de PCR no modo “touch-down” para reduzir o efeito da especificidade da temperatura de anelamento entre equipamentos e reagentes de diferentes fabricantes. Foram utilizadas nas reações de PCR *primers* capazes de identificar a presença do promotor 35S que corresponde a um fragmento de 195 pb específico do transgene existente na em soja e milho. A verificação de soja GM em farinha de soja foi realizada a partir da comparação com um padrão de identificação positivo, estabelecido a partir do tecido foliar de soja transgênica. O fragmento do gene obtido pela técnica de PCR foi de 195 pb tanto para as amostras de DNA isolado a partir do tecido foliar de soja quanto para as amostras de DNA isoladas a partir de farinha de soja, indicando que as duas réplicas dos dois tipos de amostras avaliadas são de origem transgênica. Estes resultados indicam que apesar dos diferentes tratamentos e condições adversas pelos quais os grãos de soja são submetidos até transformação do grão em farinha de soja, é possível realizar a verificação de soja transgênica na cadeia produtiva.

Palavras-chave: DNA. PCR. Soja transgênica.

ABSTRACT

MIRANDA, Robson Rodrigo; BOREIKO, Sheila. **Optimization of molecular diagnosis for genetically modified soy**. 2011. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2011.

According to the Brazilian law, any product containing more than 1% of genetically modified raw materials must inform its condition as genetically modified product on the label (Decree-Law No. 4680 of 2003). Currently genetically modified soy is the most traded soybeans in the world, and its grains can be used as feedstock for a number of foods destined for human consumption, ranging from vegetable oil obtained from the initial milling of seeds, to the subsequent use of these same grains as protein source in processed foods. The aim of this study was to adapt a technology of molecular detection of genetically modified soybeans, for use in the work of verifying the presence of their residues in food products using molecular techniques based on PCR. The extraction of DNA samples from leaf tissue and transgenic soy flour was carried out following the protocol published by Mazza and Bittencourt (2000), with slight modifications, being conducted the evaluation of two independent replicas of each of the analyzed materials. PCR reactions were performed as recommended by Tsai et al. (2010), which recommends the addition of a few cycles of PCR in the "touch-down" mode in order to reduce the specificity effect of the annealing temperature among equipment and reagents from different manufacturers. Primers have been used in PCR reactions, which are capable to identify the presence of the 35S promoter, that corresponds to a fragment of 195 bp, specific from the transgene that exists in soybeans and corn. The verification of GM soybean in soy flour was made from the comparison with a positive identification pattern, established from leaf tissue of transgenic soybeans. The gene fragment obtained by PCR technique was 195 bp for both DNA samples isolated from the soybean leaf tissue as for the DNA samples isolated from soy flour, indicating that the two replicas of the two types of analyzed samples are of transgenic origin. These results indicate that despite the different treatments and adverse conditions by which soybeans are subjected until the transformation of the grain into soy flour, it is possible to perform the verification of transgenic soy in the food chain.

Keywords: DNA. PCR. Transgenic soybean.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Símbolo que deve constar no rótulo de alimentos que contenham mais de 1% de compostos transgênicos em sua composição.....	21
Figura 2 - DNAs isolados de amostras de soja e farinha transgênica.....	27
Figura 3- Gel de agarose com o resultado da amplificação do promotor 35S.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área, produtividade e produção nas safras 2009/2010 e 2010/2011 de soja.....	18
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados nas análises das amostras do tecido foliar e farinha soja.....	25
Tabela 3 - Reagentes para PCR.....	26

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

PB	Pares de base
CIA	Clorofórmio/álcool isoamílico
CTAB	Ácido etilenodiaminotetracético
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Brometo de cetiltrimetilamônio
GM	Geneticamente Modificado
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MP	Medida Provisória
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
TBE	Tris borato EDTA
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ISSSA	International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
IDEC	Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
rpm	rotação por minuto
°C	graus centígrados
V	Volt
μl	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanograma
mg	Miligrama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo Geral	13
1.1.2 Objetivos Específicos	13
1.2 JUSTIFICATIVA	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 EXPANSÃO GEOGRÁFICA DO CULTIVO DA SOJA	15
2.2 BIOTECNOLOGIA, CONCEITOS E IMPLICAÇÕES	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 ISOLAMENTO DO DNA DAS AMOSTRAS DO TECIDO FOLIAR E FARINHA DE SOJA TRANSGÊNICA	23
3.2 AVALIAÇÃO DOS DNAs ISOLADOS	24
3.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	25
3.4 ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A grande quantidade de OGMs atualmente disponível no mercado agrícola mundial, aliada ao aumento da área plantada, faz com que alimentos contendo resíduos destes venham a ser consumidos pela população humana em larga escala, em muitos países (MARCELINO, 2006). Segundo dados do ISAAA (2011), o Brasil é o país onde o plantio de transgênicos mais avança e a produção brasileira de sementes modificadas já ocupa mais de 25 milhões de hectares.

A suspeita de que o consumo de OGMs não seja seguro para o consumo humano, levaram os mesmos ao centro das atenções públicas, pois muitas vezes, o alimento transgênico chega à mesa dos brasileiros sem o conhecimento do consumidor (CONCEIÇÃO et al., 2006).

A soja transgênica talvez seja o principal exemplo de OGMs de interesse agrônômico comercializado mundialmente. A partir do cultivo e comercialização desta variedade no Brasil, foram necessárias mudanças na Legislação Nacional, principalmente no tocante a rotulagem e rastreabilidade de OGMs (CUNHA et al., 2005). Após a comprovação do cultivo ilegal da soja GM a demanda por análises de presença de resíduos transgênicos em matéria-prima e em alimentos tem aumentado significativamente no Brasil. Nesse cenário tornou-se imprescindível a procura por metodologias simples e econômicas para detecção, identificação e quantificação de plantas GM (CUNHA et al., 2005 e MARCELINO, 2006).

Dentre outras possibilidades, a técnica de análise de ácidos nucleicos (DNA e RNA), através do método da PCR mostra-se bastante eficiente e viável devido suas características intrínsecas de precisão e rapidez. Essas técnicas de diagnóstico genético molecular têm como exemplo de aplicação, o uso nos laboratórios das agroindústrias de produtos vegetais com a finalidade de verificação da presença de transgenia (SANTOS et al., 2005).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral adaptar uma tecnologia de detecção molecular de soja geneticamente modificada, para utilização em trabalhos de verificação da presença de seus resíduos em produtos alimentícios empregando técnicas moleculares baseadas em PCR.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Otimizar um protocolo de isolamento de DNA para soja transgênica em tecido foliar com qualidade e quantidade suficiente para uso em PCR;
- b) Padronizar uma metodologia capaz de identificar a presença de soja transgênica;
- c) Validar o protocolo de diagnóstico de OGMs em um alimento que utilize soja transgênica em sua formulação.

1.2 JUSTIFICATIVA

A expansão da produção de soja em terras paranaenses fez com que o Estado tenha destaque internacional, tanto na produção como na exportação do produto. Nesse contexto, Ponta Grossa se projetou no cenário paranaense, pois além de entreposto comercial passou a assumir a condição de forte pólo agroindustrial de beneficiamento do produto (JÚNIOR, 2002). O parque moageiro de grãos da região faz uso da modificação da matéria-prima para produção de alimentos, e estes muitas vezes empregam derivados de soja. Esta característica designa a cidade como um mercado atraente para profissionais especializados nos mais diversos níveis da cadeia produtiva do setor alimentício, inclusive utilizando técnicas modernas de análises moleculares para diagnóstico de OGMs.

Atualmente as técnicas moleculares baseadas em PCR podem ser utilizadas como uma ferramenta confiável para identificar OGMs, pois são simples, econômicas, com resultados rápidos, extremamente confiáveis e com elevada

capacidade de reprodutibilidade em diferentes condições laboratoriais (BONETTI et al., 2006).

O presente trabalho representa uma relevante contribuição para a adaptação e padronização de um protocolo de diagnóstico molecular da soja transgênica, fornecendo subsídios para posteriores rastreabilidade de OGMs na cadeia agroalimentar, a partir de derivados de soja na região dos Campos Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EXPANSÃO GEOGRÁFICA DO CULTIVO DA SOJA

A soja (*Glycine max* L.) é uma leguminosa herbácea anual considerada um alimento funcional, pois fornece nutrientes ao organismo e traz benefícios para saúde, é rica em proteínas, possui isoflavonas e ácidos graxos insaturados, também é uma excelente fonte de minerais como ferro, potássio, fósforo, cálcio e vitaminas do complexo B (EMBRAPA, 2008), seu processamento tem inúmeras aplicações na indústria alimentícia, dando origem a diversas matérias-primas como farinhas de soja, (GÓES-FAVONI et al., 2004) que podem ser aplicadas na fabricação de pães, doces e na composição de algumas massas, sendo também empregada na composição de cereais prontos para consumo.

A fácil aclimação a diversos fatores, incluindo foto período colocam a soja entre as principais oleaginosas do mundo, sendo a mais cultivada e comercializada (ROCHA, 2009).

Atualmente, os principais países produtores e exportadores são respectivamente: Estados Unidos, Brasil e Argentina. O Brasil, segundo maior produtor da oleaginosa, com 22,1% da produção, responde por 22,4% das exportações mundiais, ocupando também a segunda colocação nas vendas de derivados ao exterior. Os principais mercados de destino são Irã, China, Índia e Holanda (VILELA e MOREIRA, 2007).

Segundo a EMBRAPA (2004), o primeiro registro de cultivo de soja no Brasil data de 1914 no município de Santa Rosa. Somente a partir dos anos 40 ela adquiriu alguma importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional em 1941, no Anuário Agrícola do RS.

Até 1950, a soja era utilizada por pequenos criadores, como fonte de proteínas na alimentação de suínos e como adubo. A história da produção de soja em escala comercial está relacionada à introdução da chamada “Revolução Verde”, traduzida em ampla mecanização e utilização de agroquímicos, com forte apoio do governo, sob a forma de créditos subsidiados (BRUM, 2005).

Na década de 1950, o trigo recebeu incentivos por parte do governo federal e surgiu a necessidade de se encontrar uma leguminosa para ser produzida em

regime de rotação de cultura, durante o verão. No começo dos anos 1960, a soja começa a exercer essa função. O binômio trigo-soja mostrava-se altamente viável, à medida que permitia o compartilhamento do solo, de insumos e máquinas em uma região com características favoráveis, nada comuns no restante do mundo. Com isso, a produção brasileira, que representava 0,5% do total mundial em 1954, passou a 16% deste total, já em 1976 (SCHLESINGER, 2006).

Além de apoiar o avanço da soja com créditos subsidiados, através da prática de taxas de juros abaixo da inflação, o Brasil se faz presente também aportando recursos para infra-estrutura e pesquisa. Em 1973, é criada a Embrapa, e em 1975, a Embrapa Soja e a Embrapa Cerrados, que contribuiriam em seguida para o desenvolvimento de sementes adaptadas ao clima tropical, viabilizando a extensão da produção às regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (SCHLESINGER e NUNES, 2008).

Naquele período também era parte da política do governo federal o estímulo à implantação de indústrias de esmagamento e produção de óleo de soja (SCHLESINGER, 2006). Estas empresas, em sua maioria, seriam absorvidas pelas grandes transnacionais do setor que viriam a se instalar no Brasil alguns anos mais tarde. A partir daí, a decisão sobre a exportação da soja em grãos ou com algum grau de processamento passa a ser tomada por estas grandes empresas, ao largo das fronteiras e interesses do país (SCHLESINGER et al., 2006).

Na década de 1980, com a volta dos preços da soja aos níveis anteriores aos da crise dos anos 1970, a expansão da soja prossegue, mas em ritmo menor: reduz-se de 7,3% para 3,7% ao ano, em média. Este ritmo iria acelerar-se novamente nos anos 1990 onde a soja ocupou o lugar de principal produto agrícola, impulsionado pelas políticas de liberalização comercial e financeira postas em prática a partir de então. Estas políticas concedem especial atenção ao agronegócio voltado para a exportação e, em particular, à soja (SCHLESINGER, 2008).

A produção voltada para a exportação, entretanto, cresceu em função de um profundo processo de transformação. Como resultado da abertura às importações e ao investimento estrangeiro, as empresas multinacionais de alimentos passam a exercer o domínio da produção agrícola, onde a soja passa a ser produzida sob um modelo de alta sofisticação tecnológica e utilização intensiva de capital (SCHLESINGER, 2008).

Outro aspecto importante da reestruturação produtiva decorrente das políticas de liberalização é o forte processo de fusões e aquisições de empresas nacionais, particularmente na produção e comercialização de grãos e leite. No que diz respeito à soja, este processo de concentração e desnacionalização fez com que as quatro maiores empresas do segmento venham respondendo por parcela crescente do processamento e das exportações de grãos, farelo e óleo de soja (SCHLESINGER e NORONHA, 2006). A partir daí, com a participação da produção de soja na economia brasileira, esta cultura se expandiu significativamente para o restante do país, liderando uma nova implantação econômica e tecnológica. Atualmente é cultivada em praticamente todo o território nacional, sendo o principal produto agrícola do país (SCHLESINGER, 2006), conforme representado na tabela 1.

Tabela 1- Área, produtividade e produção de soja nas safras 2009/2010 e 2010/2011

REGIÃO/UF	ÁREA (Em mil ha)			PRODUTIVIDADE (Em Kg/ha)			PRODUÇÃO (Em mil t)		
	Safra 09/10 (a)	Safra 10/11 (b)	Var. % (b/a)	Safra 09/10 (c)	Safra 10/11 (d)	Var. % (d/c)	Safra 09/10 (e)	Safra 10/11 (f)	Var. % (f/e)
NORTE	574,9	639,5	11,2	2.943	3.060	4,0	1.691,7	1.956,8	15,7
RR	1,4	2,4	71,4	2.800	2.800	-	3,9	6,7	71,8
RO	122,3	132,3	8,2	3.142	3.215	2,3	384,3	425,3	10,7
PA	86,9	104,8	20,6	2.675	3.000	12,1	232,5	314,4	35,2
TO	364,3	400,0	9,8	2.940	3.026	2,9	1.071,0	1.210,4	13,0
NORDESTE	1.861,7	1.945,7	4,5	2.852	3.213	12,7	5.309,5	6.251,5	17,7
MA	502,1	518,2	3,2	2.650	3.087	16,5	1.330,6	1.599,7	20,2
PI	343,1	383,6	11,8	2.531	2.983	17,9	868,4	1.144,3	31,8
BA	1.016,5	1.043,9	2,7	3.060	3.360	9,8	3.110,5	3.507,5	12,8
CENTRO-OESTE	10.539,2	10.817,5	2,6	2.997	3.138	4,7	31.586,7	33.940,2	7,5
MT	6.224,5	6.398,8	2,8	3.015	3.190	5,8	18.766,9	20.412,2	8,8
MS	1.712,2	1.760,1	2,8	3.100	2.937	(5,3)	5.307,8	5.169,4	(2,6)
GO	2.549,5	2.605,6	2,2	2.880	3.140	9,0	7.342,6	8.181,6	11,4
DF	53,0	53,0	-	3.196	3.340	4,5	169,4	177,0	4,5
SUDESTE	1.591,2	1.636,9	2,9	2.801	2.824	0,8	4.457,6	4.622,1	3,7
MG	1.019,0	1.024,1	0,5	2.818	2.845	1,0	2.871,5	2.913,6	1,5
SP	572,2	612,8	7,1	2.772	2.788	0,6	1.586,1	1.708,5	7,7
SUL	8.900,9	9.133,5	2,6	2.881	3.124	8,4	25.642,7	28.534,6	11,3
PR	4.485,1	4.590,5	2,4	3.139	3.360	7,0	14.078,7	15.424,1	9,6
SC	439,6	458,2	4,2	3.060	3.250	6,2	1.345,2	1.489,2	10,7
RS	3.976,2	4.084,8	2,7	2.570	2.845	10,7	10.218,8	11.621,3	13,7
NORTE/NORDESTE	2.436,6	2.585,2	6,1	2.873	3.175	10,5	7.001,2	8.208,3	17,2
CENTRO-SUL	21.031,6	21.587,9	2,6	2.933	3.108	6,0	61.687,0	67.096,9	8,8
BRASIL	23.467,9	24.173,1	3,0	2.927	3.115	6,4	68.688,2	75.305,2	9,6

FONTE: CONAB - Levantamento: Agosto/2011

Nota-se na tabela 1 que o Paraná é o segundo maior produtor brasileiro de soja atrás apenas do Mato Grosso. A produção da última safra 2010/2011 superou os 75 milhões de toneladas. Este volume é quase 10% superior (aproximadamente 6,7 milhões de toneladas) em relação à produção obtida na safra 2009/2010, mantendo o ritmo de crescimento das últimas safras. Essa produção expressiva é decorrência do manejo adequado da terra (SOUZA et al. 2008), aliado ao uso de sementes com elevado grau de melhoramento genético (RAMALHO et al., 2008).

2.2 BIOTECNOLOGIA, CONCEITOS E IMPLICAÇÕES

A Biotecnologia Tradicional ou Clássica é constituída por um conjunto de técnicas amplamente difundidas, que utilizam seres vivos encontrados na natureza e/ou aqueles melhorados pelo homem para exercer determinada função produtiva. Dentre tais técnicas destacam-se: o isolamento, a seleção e os cruzamentos genéticos naturais entre espécies sexualmente compatíveis (CARVALHO, 1993 e SILVEIRA et al., 2002).

A biotecnologia moderna surgiu no início dos anos 1970 como resultado de descobertas científicas no campo da engenharia genética (FIGUEIREDO et al., 2006). Segundo Carvalho (1993), a engenharia genética, inicia seu trabalho a partir de seres vivos com genoma natural e procura manipulá-los de forma a criar um OGM. Variedades de plantas transgênicas comerciais são exemplos de sucesso da aplicação dessa metodologia, pois se destacam por oferecer maior produtividade agrícola e com características agrônômicas especiais, tais como facilidade e flexibilidade no uso e aplicação de herbicidas e controle mais eficiente de plantas daninhas (TESSARO, 2010).

A técnica para a transformação genética de plantas consiste na inserção de genes exógenos ou na modificação da expressão dos genes endógenos da planta em questão (NODARI e GUERRA, 2001). A transgenia em plantas pode ser realizada por dois métodos: um deles utiliza a *Agrobacterium tumefaciens*, bactéria do solo que se associam com algumas espécies de plantas, transferindo a elas alguns de seus genes de forma espontânea. O segundo método é o bombardeamento com microprojéteis, que são partículas de ouro ou tungstênio revestidas com fragmentos de DNA, contendo o gene de interesse. Após o processo

de transformação, as células serão devidamente cultivadas em meios nutritivos, onde darão origem a plantas geneticamente modificadas (VIEIRA et al., 2003).

Nas sojas transgênicas o processo de transformação é feito através do acréscimo, retirando ou modificando um ou mais genes (LINS, 2004 e VIEIRA, 2004). O acréscimo de genes obedece a uma construção molecular organizada em três elementos: o promotor, que controla a expressão do transgene no organismo; a região codificadora que codifica a proteína de interesse; e uma região terminadora que determina o final do processo de transcrição do gene (MARCELINO et al., 2003).

Conforme dados registrados na Folha do Agronegócio (2011), a área plantada com soja transgênica no Brasil na safra 2010/11 será 13,4% maior do que na safra anterior, ocupando 20,8 milhões de hectares com 82,7% da área total prevista. Paralelamente, segundo MAPA (2003), produtores rurais de 11 estados brasileiros, declararam ter plantado soja transgênica na safra atual. Quais sejam: Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Piauí, Santa Catarina, Bahia e Goiás. O Rio Grande do Sul representa, no entanto, 98% do total de agricultores do País que assinaram o termo de compromisso, responsabilidade e ajustamento de conduta, exigido como contrapartida pela Medida Provisória (MP) 131 para que os produtores possam comercializar a safra transgênica.

Com o avanço da biotecnologia e a introdução no mercado de um novo tipo de alimento, os geneticamente modificados ou transgênicos, têm gerado muita polêmica (MESSIAS e LEITE, 2008). No Brasil, a discussão a respeito dos riscos dos alimentos geneticamente modificados (OGMs), nas últimas décadas, tem provocado manifestações de diversos segmentos sociais, como vem ocorrendo em todo o mundo (VIEIRA et al. 2003). De um lado, a indústria da biotecnologia deposita extrema confiança na segurança da engenharia genética e sua importância para o desenvolvimento econômico e, de outro lado, há uma desconfiança generalizada da sociedade, motivada em parte pela ausência de informação (ANEZ, 2005). Essas discussões sobre a segurança desses alimentos seus riscos e benefícios, ocupam espaço importante desde o meio científico, industrial, até junto à população, que não tem, entretanto, a verdadeira dimensão de o quanto os produtos transgênicos já fazem parte de seu cotidiano (LAZZARINI, 2007).

Devido à utilização de soja transgênica em grande parte dos alimentos processados e a necessidade de esclarecimento junto aos consumidores a legislação brasileira através do Decreto-Lei nº 4.680 de 2003 (BRASIL, 2003) diz que todo produto com mais de 1% de matéria-prima GM em sua composição deve informar a condição de produto transgênico no rótulo através do símbolo. A Portaria nº 2658 de 2003 (BRASIL, 2003) define que o símbolo apresentado na figura 1 deve constar nas embalagens dos produtos que contenham compostos transgênicos em sua formulação.



Figura 1- Símbolo de transgênicos
Fonte: IDEC (2003)

O aumento na demanda por análises da presença de resíduos transgênicos em matérias-primas e em alimentos processados exige o isolamento de DNA amplificável (DINON et al., 2006). Este isolamento é um passo fundamental para o desenvolvimento de qualquer método de análise direta da molécula de ácido desoxirribonucléico, seja para seqüenciamento, ou amplificação via PCR. Para a extração e purificação de ácidos nucleicos, é preciso separá-los com eficiência dos outros componentes celulares. Em relação aos ácidos nucleicos, também é essencial conservar a integridade das moléculas, que devem continuar inalteradas durante o processo de extração, pois as informações contidas tanto no DNA quanto no RNA dependem da sua seqüência (LISBÔA, 2011).

A PCR é uma técnica que permite obter cópias de seqüências de ácidos nucleicos específicos, por meio de uma reação enzimática (GANDRA et al. 2008). Este método consiste em copiar as duas fitas da seqüência de DNA desejada, aumentando a quantidade de DNA alvo. O processo envolve ciclos de variação na temperatura, de forma que, por aquecimento, as fitas de DNA são separadas, em seguida, a temperatura é abaixada para que os *primers* anelem-se ao DNA por complementariedade de bases. Novamente, a temperatura é elevada para que a enzima *Taq* DNA polimerase, em presença de outros fatores e dos dNTPs

(deoxinucleotídeos trifosfatados), copie a fita molde que é o DNA que se deseja amplificar (BONETTI et al., 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DO DNA DAS AMOSTRAS DO TECIDO FOLIAR E FARINHA DE SOJA TRANSGÊNICA

Para verificar a presença de soja transgênica na amostra de farinha, inicialmente foi estabelecido um padrão de identificação positivo (controle). Este controle positivo foi desenvolvido a partir do tecido foliar coletado em lavouras cultivadas com sementes de soja transgênica. Após a coleta das folhas, estas foram acondicionadas em gelo para serem transportadas até o Laboratório de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - *Campus* Ponta Grossa.

A extração do DNA das amostras do tecido foliar de soja transgênica foi realizada em duplicata, as quais seguiram o protocolo publicado por Mazza e Bittencourt (2000), com ligeiras modificações e finalizando os seguintes passos:

1. Macerar 0,5 g da amostra em almofariz com adição 1000 µl de tampão de extração (CTAB);
2. Transferência do triturado adquirido para um microtubo de 1,5 mL;
3. Solubilização e homogeneização da suspensão em banho-maria à 65°C durante 30 minutos, com agitação, por inversão a cada 15 minutos;
4. Retirada dos tubos do banho, deixando-os esfriar a temperatura ambiente;
5. Adição de 600 µl de CIA (24:1). Agitação dos tubos no vortex de mesa por 5 minutos;
6. Centrifugação durante 5 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente;
7. Transferência do (sobrenadante) para um novo microtubo 1,5 mL;
8. A fase aquosa no novo tubo seguiu da adição 1/10 do volume (~60 µl de uma solução de CTAB 10%);
9. Agitação em vortex de mesa durante 5 minutos;
10. Adição de 600 µl de CIA e agitação dos tubos no vortex de mesa por 5 minutos;
11. Repetição das etapas 6 e 7;

12. À fase aquosa no novo tubo segue da adição de 5 µl de proteinase-K e mantendo sob temperatura de 30°C durante 45 minutos;
13. Repetição das etapas 10 e 6 e 7 e adição de 2/3 do volume da solução aquosa (~400 µl) de isopropanol gelado (-20°C). Misturar por inversão os tubos para a precipitação de ácidos nucleicos. Incubar-los à 40°C por 30 minutos;
14. Centrifugação dos tubos a 13000 rpm por 5 minutos;
15. Eliminação do isopropanol;
16. Adição de 1000 µl de etanol 70% gelado no pellet, e centrifugar por 4 minutos;
17. Adição de 1000 µl de etanol 96% gelado no pellet, e centrifugar por 4 minutos;
18. O pellet deve ser seco a temperatura ambiente;
19. Ressuspensão do pellet em 100 µl de água miliq.

Posteriormente, utilizando o protocolo anteriormente descrito e de acordo com a característica do alimento a ser extraído foi feito o isolamento do DNA da amostra de farinha de soja transgênica que pode ser utilizada como matéria-prima para diversos alimentos processados destinados ao consumo humano e animal. A amostra foi adquirida em uma cooperativa agrícola da região de Ponta Grossa - PR, sendo que foi realizada a avaliação de duas réplicas.

3.2 AVALIAÇÃO DOS DNAs ISOLADOS

A análise dos DNAs extraídos foi feita em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE a uma tensão elétrica de 70 V por 30 minutos, e em seguida corado com brometo de etídeo, para visualização sobre luz ultravioleta e análise do DNA.

Os DNAs isolados das amostras foram mantidos em microtubo de 1,5 mL no freezer (-20°C) para posterior utilização. De acordo com Belotserkovski (1996), apud Melo (2010), é recomendado que o DNA isolado seja armazenado abaixo de 0°C, para minimizar a atividade de degradação pelas DNases, em tubo plástico, hidrofóbico e com tampa de vedação eficaz.

3.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A partir do DNA isolado, uma alíquota de 5ng/mL foi utilizada em uma reação de amplificação em termociclador. Os testes para amplificação foram realizados seguindo as recomendações descritas para detecção do promotor 35S conforme trabalhos de Tsai et al. (2010), que recomenda a adição de alguns ciclos de PCR no modo *touch-down*. Neste modo de PCR a temperatura de anelamento sofre sutis alterações ao longo de alguns ciclos, com o objetivo de reduzir as restringências com relação à especificidade da temperatura de anelamento, que é crítica para o pareamento das sequências iniciadoras com o DNA molde. As etapas da PCR realizadas neste trabalho encontram-se descritas a seguir: desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguida de 10 ciclos no modo “*touch-down*” com desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento inicial de 67°C por 1 minuto com decréscimo de 0,5°C por ciclo até atingir 62°C após 10 ciclos, mais extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por mais 25 ciclos na temperatura de anelamento de 62°C por 1 minuto. Finalizando estes 35 ciclos, foi adicionado um ciclo de extensão de 10 minutos na temperatura de 72°C, com o objetivo de finalizar possíveis amplificações inacabadas.

Os *primers* utilizados para detecção de soja transgênica amplificam um fragmento com tamanho de 195pb, conforme tabela 2.

Tabela 2- Primers utilizados nas análises das amostras do tecido foliar e farinha de soja

Promotor	Posição	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento a ser amplificado
35S	Senso	GCTCCTACAAATGCCATCA	195 pb
	Antisenso	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	

As amostras de DNAs isoladas foram amplificadas em duplicatas em um volume final da reação de 25 µl, sendo 22 µl da reação preparada e 3 µl de DNA na concentração de 5ng/ µl.

A tabela 3 mostra os reagentes utilizados na reação de amplificação, bem como as concentrações e volumes empregados na detecção do promotor 35S

presente em soja transgênica, realizada no Laboratório de Bioengenharia da UTFPR - *Campus* Ponta Grossa.

Tabela 3 - Reagentes para PCR

Concentração Inicial	Para 1 amostra (µl)
Buffer 10X PCR	2,5
MgCl ₂ 50 mM	0,75
dNTP's 10 mM	0,8
P- 35S f 5 pmoles/µl	1,25
P- 35S r 2 5 pmoles/µl	1,25
Taq 5U/µl	0,3
DNA	3,0
Água	15,15
Volume final	25,0

3.4 ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO

Concluída a fase de amplificação da região alvo, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5 % submetendo o DNA a uma tensão elétrica (eletroforese) de 80 V por 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio para posterior visualização sob luz ultravioleta do fragmento amplificado e análise da presença do promotor 35S nas amostras do tecido foliar e farinha de soja transgênica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo para extração de DNA utilizado neste estudo se mostrou eficaz para o isolamento de DNA a partir das amostras do tecido foliar e farinha de soja transgênica. O resultado reflete a eficiência da técnica para isolar ácidos nucleicos de tecidos. Conforme Walker e Rapley (1999), esta é uma fase essencial na prática da biologia molecular e seu sucesso é associado à quantidade e pureza do isolamento genômico. Segundo Romano e Brasileiro (1999), independente do tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras o suficiente para não interferir na atividade enzimática requerida nas etapas posteriores de amplificação de DNA ou causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese. As amostras obtidas representaram a qualidade e quantidade desejadas.

A integridade do ácido nucleico tem grande influência no resultado das técnicas que serão nele aplicadas, como o procedimento da PCR (Walker e Rapley, 1999) utilizado neste estudo. No presente trabalho o isolamento de DNA com a qualidade necessária só foi possível após o tratamento enzimático com proteinase-K. Essa enzima promove a digestão removendo o excesso de proteínas das amostras. Por outro lado não se optou pela utilização de RNase já que segundo Oliveira (2007), a etapa de utilização de RNase é opcional e contribui apenas para aumentar a pureza da amostra do DNA molde e não interfere na reação de PCR. Na figura 2 pode ser visualizado o DNA isolado das amostras do tecido foliar de soja e farinha de soja transgênica.

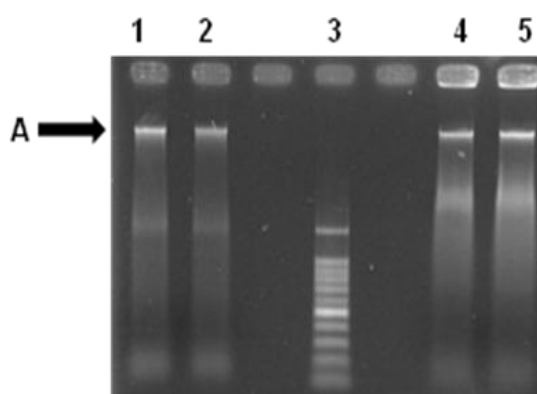


Figura 2 - DNAs isolados de amostras de soja e farinha transgênicas – colunas 1 e 2: DNA do tecido foliar; coluna 3: marcador de peso molecular 100 pb; colunas 4 e 5: DNA de farinha de soja transgênica; letra A: DNA isolado

Durante a fase de amplificação, a técnica da PCR teve como propósito checar a presença do promotor 35S no DNA isolado. A presença deste promotor indica o evento de transgenia na soja e milho (MARCELINO et al. 2003). A PCR é uma análise sensível e precisa para a detecção de plantas transgênicas, podendo detectar OGMs presentes em uma proporção de apenas 0,01% da amostra em grãos e produtos derivados (DUIJN et al., 1999 e MARCELINO et al., 2003).

Segundo Terzi et al. (2003) apud Cunha et al. (2005), a PCR pode detectar pequenas quantidades do DNA alvo sendo considerada uma ferramenta fidedigna para identificação de produtos derivados de OGM. Entretanto, o uso de uma adequada combinação de *primers* e um controle da performance do experimento é imprescindível. Cunha et al. (2005) ao trabalhar com diferentes lotes de cultivares de sojas geneticamente modificadas, concluíram que embora existam outras sequências capazes verificar a presença de soja transgênica, a sequência para o promotor 35S é a mais expressa nas sementes geneticamente modificadas, permitindo a diferenciação das amostras transgênicas com elevada segurança.

De acordo com Câmara et al. (2008), vários estudos referentes aos transgênicos mostraram a preocupação com a falta de cumprimento da legislação para a rotulagem dos produtos formulados a partir dos OGMs. Tais estudos enfatizaram a rotulagem dos transgênicos como um direito previsto no Código de Defesa do Consumidor, bem como uma oportunidade de utilizar ferramenta biotecnológica para a avaliação de OGMs. Apesar disso, devido à crescente utilização de OGMs pela indústria, muitas vezes os consumidores são levados a consumir transgênicos inconscientemente ou mesmo sem a opção de escolha. Na indústria alimentícia, o limite máximo de 1% é considerado a base para rotulagem no Brasil (BRASIL, 2003). Por esse motivo o estabelecimento de um padrão de soja GM amplificada torna-se fundamental para a identificação e possível rastreabilidade de alimentos que possuam OGMs de soja na formulação.

Segundo Marcelino et al. (2003), a demanda por análises da presença de resíduos transgênicos em matérias-primas e em alimentos tem aumentado significativamente no Brasil. Tendo em vista o atual cenário, este estudo realizado na UTFPR - *Campus* Ponta Grossa otimizou esta metodologia baseada em PCR para detectar a presença de transgenia em alimentos, dessa maneira, o presente trabalho representa uma relevante contribuição para a formação de profissionais

com conhecimento em biologia molecular para atuar em diversos níveis da cadeia produtiva de alimentos.

Ferreira et al. (2009), ao efetuarem rastreabilidade em amostras de preparados a base farinhas de trigo, para verificar possíveis adições de farinha de soja transgênicas, verificou que das amostras analisadas 75% (12/16) continham transgênicos acima do limite (1%), portanto, deveriam estar informando no rótulo a condição de alimentos transgênicos.

Para estabelecer um protocolo de identificação de soja transgênica, foi necessário realizar ajustes na técnica PCR, principalmente no tocante as concentrações e volumes dos reagentes utilizados. De acordo com Tsai et al. (2010), a concentração de dNTP recomendada é 100 μ M, entretanto, esta concentração testada nas condições do Laboratório de Bioengenharia da UTFPR não apresentou resultado efetivo, a partir disto foram testadas outros volumes deste reagente aumentando a concentração em 100, 150 e 160%, sendo a última a mais indicada para a amplificação em nossas condições. O dNTP é fundamental por ser um componente básico para a amplificação, pois fornece as bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina e timina, as quais constituem o DNA (BONETTI et al., 2006).

O DNA molde foi preponderante, pois seu gradual incremento foi efetivo para as amplificações, neste sentido os testes iniciaram com um volume mais baixo (1,0 μ l) até atingir a quantidade de 15 ng de DNA em 3 μ l, a qual foi selecionada como a mais específica para o trabalho. O volume dos *primers* não foi alterada, pois segundo Carvalho (2001), a quantidade de DNA em relação ao *primer* é um dos fatores fundamentais para o sucesso da reação de PCR, uma vez que poderá não ocorrer amplificação se esta relação for excessivamente baixa ou alta.

A amplificação de soja transgênica, com o *primer* 35S, está representada na figura 3 – A. Nota-se que foi possível amplificar o DNA em quantidade adequada para análise em gel de agarose, permitindo a visualização de bandas nítidas, pouco abaixo da região dos 200 pb do marcador de peso molecular. O resultado obtido a partir do DNA do tecido foliar de soja foi similar ao descrito em literatura, indicando que as condições experimentais foram bem ajustadas.

Nas amostras avaliadas a partir de DNA isolado de farinha de soja transgênica (figura 3 - B), também foi verificada a presença de um fragmento de DNA amplificado, com tamanho idêntico ao observado nas amostras controle, porém

com uma banda não tão nítida quanto as verificadas nas amostras do controle. Esta perda da nitidez em relação ao padrão é decorrente da menor quantidade de DNA amplificado obtida nas condições experimentais utilizadas.

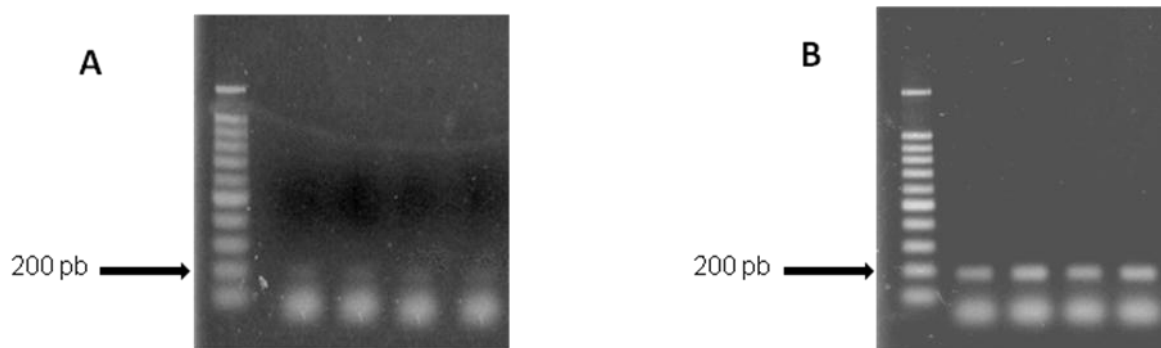


Figura 3- Gel de agarose com o resultado da amplificação do promotor 35S a partir do tecido foliar (A) e farinha de soja transgênica (B)

Estes resultados indicam que apesar dos diferentes tratamentos e condições adversas pelos quais os grãos de soja são submetidos até transformação do grão em farinha de soja, é possível realizar a rastreabilidade de soja transgênica em subprodutos industrializados. O fragmento do gene obtido pela técnica de PCR foi de 195 pb tanto para as amostras de DNA isolado a partir do tecido foliar quanto para as amostras de DNA isoladas a partir de farinha de soja transgênica, indicando que todas as réplicas dos dois tipos de amostras avaliadas são de origem transgênica.

A identificação de soja transgênica em farinha de soja rotineiramente utilizada como matéria-prima para alimentos destinados ao consumo humano e animal, após o beneficiamento primário dos grãos de soja é alarmante, visto que muitos alimentos processados que utilizam soja transgênica em sua composição ainda não atualizaram o rótulo de seus produtos de acordo com a legislação vigente. É preciso que novos estudos sejam realizados com alimentos que possuam graus de beneficiamento mais apurados, para que seja realizada a rastreabilidade de soja transgênica nestes alimentos processados. Desta maneira as autoridades e órgãos de defesa do consumidor poderão ter argumentos sólidos para se mobilizar e exigir que as indústrias alimentícias informem aos consumidores que os alimentos que estão comprando contêm produtos de origem transgênica em sua composição.

O consumidor de alimentos, dia-a-dia vem se tornando mais exigente, a possibilidade da escolha de alimentos corretamente rotulados faz parte deste selecto

mercado, portanto a oportunidade de disponibilizar a indústria tal ferramenta é ponto crucial para apresentação da rotulagem adequada.

5 CONCLUSÃO

O protocolo de isolamento do DNA com as devidas modificações para o Laboratório de Bioengenharia mostrou-se satisfatório, pois a qualidade e a quantidade de DNA obtidas foram suficientes para análise de PCR. As condições de PCR indicadas por Tsai et al. (2010) também com algumas modificações, permitiram identificar a presença de soja transgênica, nas amostras do tecido foliar de soja e farinha transgênica.

Esta metodologia poderá ser empregada para realizar a rastreabilidade de soja transgênica em alimentos processados e lotes de sementes destinados para a exportação. O protocolo de tecido foliar de soja avaliado neste trabalho poderá ser utilizado como controle positivo para a identificação da presença de sementes de soja geneticamente modificadas em alimentos com diferentes graus de processamento, desde que o DNA isolado destes alimentos processados possua qualidade suficiente para ser amplificado em reação de PCR.

Finalizando, este trabalho oportunizou não só a otimização de uma metodologia molecular para a avaliação de transgenia em alimentos, bem como abriu a oportunidade de formação de profissionais qualificados para estas técnicas. O Laboratório de Bioengenharia hoje conta com infra-estrutura para as avaliações e ambiente para formação de demais acadêmicos interessados nesta temática.

REFERÊNCIAS

- ANEZ, T. L. W. **Organismos geneticamente modificados: uma abordagem à luz do direito nacional e internacional.** 2005.
- BONETTI, A. M.; VIEIRA, C. U.; SIQUIEROLI, A. C. S. 2006. **Amplificação de DNA.** Disponível em <<http://www.geneticanaescola.com.br/ano1vol2/07.pdf>>. Acesso em 03 set. 2011.
- BRUM, A. L. **A Economia de Soja: História e Futuro - Uma Visão desde o Rio Grande do Sul.** 2005. Disponível em <<http://www.agromil.com.br/econosoja.html>>. Acesso em: 10 out. 2011.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 abril 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4680_03.htm>. Acesso em 05 ago. 2011.
- BRASIL. Ministério da Justiça. Portaria nº 2658, de 22 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dezembro 2003. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 05 ago. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de orientação aos consumidores. **Você sabe o que está comendo?** 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/rotulos/manual_consumidor.pdf>. Acesso em 11 out. 2011.
- CÂMARA, M. C. C.; MARINHO, C. L. C.; GUILAM, M. C.; BRAGA, A. M. C. B. A produção acadêmica sobre a rotulagem de alimentos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v. 23, n. 1, Washington Jan. 2008.
- CARRARO, I. M. Soja geneticamente modificada tolerante a herbicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Potafos, 2006. p.140-143.
- CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G. E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Neotropical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 593-600, 2001.
- CARVALHO, A. P. **Ciência e Tecnologia no Brasil: uma nova política para um mundo global.** Rio de Janeiro, 1993. Disponível em <<http://www.schwartzman.org.br/simon/scipol/pdf/biotec.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Jun. 2011. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_09_11_44_03_boletim_agosto-2011..pdf>. Acesso em 05 set. 2011.

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

CUNHA, C. S. M.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A.; DODE, L. B.; BALERINI, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 167-175, 2005.

DINON, A. Z.; TAGLIARI, C.; ARISI, A. C. M. Avaliação do protocolo de isolamento do DNA em alimentos derivados de milho para análise de OGM. In: 58ª Reunião Anual da SBPC, Florianópolis. **Anais...** julho/2006.

DUIJN, G.; BIERT, R.; BLEEKER-MARCELIS, H.; PEPPELMAN, H.; HESSING, M. Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**, Zeist, v.10, p.359-361, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja na alimentação**. Embrapa Soja. Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/>. Acesso em 10 out. 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004 - A soja no Brasil**. Embrapa Soja, Sistema de Produção, nº 1. Disponível em <www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. Acesso em: 10 out. 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª. ed. Brasília, DF: EMBRAPA, CERNAGEM, 1998.

FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; CARDARELLI-LEITE, P. Soja geneticamente modificada em alimentos contendo farinha e preparados à base de farinha de trigo. Detecção e adequação à legislação de rotulagem. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 241-248, jul./set. 2009.

FIGUEIREDO, L. H. M.; PENTEADO, M. I. O.; MEDEIROS, P. T. Patentes em biotecnologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** ano IX - nº 36, jan./jun. 2006.

FOLHA DO AGRONEGÓCIO. **Brasil tem novo recorde na adoção de lavouras transgênicas**. Ago. 2011. Disponível em http://www.folhadoagronegocio.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1276:brasil-tem-novo-recorde-na-adocao-de-lavouras-transgenicasa-area-cultivada-no-brasil-com-sementes-transgenicas-ja-cresce-a-um-ritmo-superior-ao-crescimento-da-area-total-plantada-por-lavouras-de-soja-milho-e-algodao-as-tres-culturas-que-possuem-varieda&catid=71:transgenicos&Itemid=103>. Acesso em: 31 ago. 2011.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, 24(4): p. 582-586, out.- dez. 2004.

IDEC. Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor. **Idec esclarece suas dúvidas sobre rotulagem de transgênicos**. Disponível em <<http://www.adocontb.org.br/index.php?codwebsite=&codpagina=00008286>>. Acesso em: 11 ago. 2011.

ISAAA - international Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - **Plantações biotecnológicas superam 1 bilhão de hectares: 2011**. Disponível em <[http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/pressrelease/pdf/Brief%2042%20-%20Press%20Release%20-%20Portuguese%20\(Brazil\).pdf](http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/pressrelease/pdf/Brief%2042%20-%20Press%20Release%20-%20Portuguese%20(Brazil).pdf)>. Acesso em: 09 set. 2011.

JUNIOR, S. C. **PLADEI - Plano de Desenvolvimento Industrial de Ponta Grossa**. Jun. 2002. Disponível em <<http://www.uepg.br/dicion/verbetes/n-z/pladei.htm>>. Acesso em 03 set. 2011.

KRUSE, N. D.; TREEZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**. Brasília, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.

LAZZARINI, M. **Alimentos transgênicos: a posição do IDEC**. Out. 2007. Disponível em <<http://terradereitos.org.br/biblioteca/alimentos-transgenicos-a-posicao-do-idec>>. Acesso em: 06 set. 2011.

LINS, L. C. T. **Panorama da rotulagem de alimentos derivados da biotecnologia no Brasil**. Brasília: Universidade de Brasília, 2004.

LISBÔA, R. S. **Biologia Molecular para iniciantes**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtores assinam termo de compromisso e MAPA prepara fiscalização da soja transgênica**. Nov. 2003. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2003/11/produtores-assinam>>

termo-de-compromisso-e-mapa-prepara-fiscalizacao-da-soja-transgenica>. Acesso em 18 set. 2011.

MARCELINO, F. C. **Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise**. 2006. 173 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

MARCELINO, F. C.; MARTINS, M. F.; PIMENTA, M. A. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Detecção de resíduos de transgênicos em grãos e produtos derivados. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 31, p. 14-17, jul./dez. 2003.

MARTÍN, T. S. **Plantas transgênicas**. Jun. 2008. Disponível em <<http://www.uned.es/experto-biotecnologia/alimentos/TrabajosSelecc/TrinidadSanchez.pdf>>. Acesso em: 31 ago. 2011.

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. Extração de DNA de tecido vegetal de araucária angustifolia (araucariaceae). **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n. 41, p.12-17, jul./dez. 2000.

MELO, F. H. **Comércio internacional, segurança alimentar e agricultura familiar**. Rio de Janeiro, 2001. Disponível em <http://www.actionaid.org.br/Portals/0/Docs/comercio%20internacional_agricultura%20familiar.pdf>. Acesso em: 18 set. 2011.

MELO, M. R.; MARTINS, A. R.; BARBOSA, I. V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Bras Pato Med Lab**, v. 46, n. 5, p. 375-381, out. 2010.

MESSIAS, M. P.; LEITE, W. B. **Alimentos geneticamente modificados, seus riscos e a segurança alimentar - proteção através do direito ambiental ou do direito do consumidor?** 2008. Disponível em <<http://www.pge.ac.gov.br/site/arquivos/bibliotecavirtual/teses/IBAPtesesPDF/Alimentogeneticamentemodificados.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2011.

NODARI, R.; GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar. **Revista de Nutrição**. Campinas, v.16, n.1, Jan./Mar. 2003.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.18, n.1, p. 81-116, jan./abr. 2001.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGRIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. 2007. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Disponível em <<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/ebook/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2011.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4º ed. Piracicaba: Livro, 2008.

ROCHA, R. S. **Avaliação de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude**. Teresina, 2009. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2009.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 9, p. 40-43, 1999.

SANTOS, J. S.; GLENDAY, L. R.; OSAIDA, S. M.; WESCHENFELDER, W. J. **Biotecnologia na agroindústria**. Santa Cruz do Sul, 2005. Disponível em <http://www.geocities.ws/wilsonjuniorw/Graduacao/Biotec_Agroin.pdf>. Acesso em: 01 set. 2011.

SCHLESINGER, S. **O grão que cresceu demais: a soja e seus impactos sobre a sociedade e o meio ambiente**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em <http://www.boelllatinoamerica.org/download_pt/O_grao_q_cresceu_demais.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2011.

SCHLESINGER, S. **Soja: o grão que segue crescendo**. 2008. Disponível em <<http://ase.tufts.edu/gdae/Pubs/rp/DP21SchlesingerJuly08.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2011.

SCHLESINGER, S.; LASCHEFSKI, K.; ASSIS, W. F. T.; RODRIGUES, D.; ORTIZ, L. **Impactos cumulativos e tendências territoriais da expansão das monoculturas para a produção de bioenergia**. 2006. Disponível em <<http://www.fboms.org.br/files/agronegocioagroenergia.pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2011.

SCHLESINGER, S.; NORONHA, S. **O Brasil está nu! O avanço da monocultura da soja, o grão que cresceu demais**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em <http://br.boell.org/downloads/soja_livro_rev_final_b1.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2011.

SCHLESINGER, S.; NUNES, S. P. **A agricultura familiar da soja na região sul e o monocultivo no Maranhão**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em <http://www.fase.org.br/v2/admin/anexos/acervo/5_soja_regiao_sul_e_maranhao.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2011.

SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V. T.; TEIXEIRA, A. I.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microsatélites. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 3, mar. 2004.

SILVEIRA, J. M. F. J.; FUTINO, A. M.; OLALDE, A. R. Biotecnologia: corporações, financiamento da inovação e novas formas organizacionais. **Economia e Sociedade**, v. 11, n. 1, p. 129-164, jan./jun. 2002.

SOUZA, L. C. D.; SÁ, M. E.; CARVALHO, M. A. C.; SIMIDU, H. M. Produtividade de quatro cultivares de soja em função da aplicação de fertilizante mineral foliar a base de cálcio e boro. **Revista de biologia e ciências da terra**. v. 8, n. 2 - 2º Semestre, 2008.

TESSARO, L.C. Manejo da Soja com o gene Roundup Ready no Brasil. **Informativo Pioneer**, ano XV - n. 31, p. 4, 2010.

TSAI, M. S.; GOMES, E. J. CANNAVAN, F. **Deteção de OGMs em produtos agropecuários e alimentos derivados processados**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, p. 13-15, 2010.

VIEIRA, A. C. P.; BUAINAIN, A. M.; LIMA, F.; JUNIOR, P. A. V.; CAPACLE, V. H. **Debates atuais sobre a segurança dos alimentos transgênicos e os direitos dos consumidores**. Campinas, 2003. Disponível em <<http://www.sober.org.br/palestra/5/676.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

VIEIRA, E. G. L. Organismos Geneticamente Modificados. **Ciência Hoje**, v. 34, n. 203, p. 28-52, abr. 2004.

VILELA, P. S.; MOREIRA, A. C. S. D. **O complexo soja e o mercado de energia no Brasil**. Minas Gerais: Federação da Agricultura de Minas Gerais - FAEMG, 2007.

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo : Atheneu Editora, 1999.