

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS GENETICAMENTE MODIFICADOS: O PANORAMA BRASILEIRO

Francismar Corrêa Marcelino¹
Marta Fonseca M. Guimarães²
Everaldo Gonçalves de Barros³

RESUMO

A ampliação da área mundial de cultivo com plantas geneticamente modificadas, em especial no Brasil, reflete-se também no aumento de resíduos transgênicos em produtos alimentícios. No Brasil, a rotulagem de alimentos que contêm resíduos de transgênicos acima do limite de 1,0% do produto final é obrigatória desde 2003. Desde a publicação das normas de rotulagem no País, nenhum estudo referente à detecção e quantificação de transgênicos em alimentos, rotineiramente consumidos pela população, foi realizado. O objetivo deste trabalho foi apresentar o panorama nacional de organismos geneticamente modificados em diferentes produtos alimentícios, analisados durante o período de 2000 a 2005. Foram analisados diferentes tipos de alimentos que apresentam, principalmente, soja e/ou milho em sua composição, bem como grãos e produtos *in natura*, oriundos de diversas regiões do País. De acordo com os resultados, alimentos geneticamente modificados estão sendo comercializados no País pelo menos desde 2000. A cada ano, o número de amostras contendo resíduos transgênicos foi se elevando com relação ao total de amostras analisadas, sendo principalmente detectado em alimentos que apresentam alto conteúdo de soja em sua composição, como amostras de salsichas e empanados.

Palavras-chave: OGM, alimentos transgênicos, rotulagem, PCR em tempo real, soja, milho.

ABSTRACT

DETECTION AND QUANTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED FOODS: THE BRAZILIAN PROFILE

The increase on the cultivation of genetically modified crops, especially in Brazil, is paralleled by an increase on the presence of transgenic residues in food products. Since 2003, food labelling in Brazil is mandatory when the total amount of transgenic residues in the food is more than 1%. Since the publication of the labelling decree in the country no study has been published on the detection and quantification of transgenic residues in foods regularly used by the population. The objective of this work was to present a picture of the presence of genetically modified organisms in different foods consumed in Brazil between 2000 and 2005. Samples of different types of foods were analyzed, mainly those that use soybean or maize in their composition and also grains and products *in natura*, derived from different regions of the country. Based on the results, the transgenic residues are present in foods commercialized in the country at least since the year of 2000. Year after year, the number of samples containing transgenic residues increased, particularly in foods with high soybean content in their composition, such as sausages and breaded foods.

Key words: GMO, Transgenic Foods, Labelling, Real Time PCR, Soybean, Maize

¹ Embrapa Soja. Cx. Postal 231, Rodovia João Carlos Strass, Distrito de Warta. CEP 86001-970 Londrina, PR. E-mail: francem@cnpso.embrapa.br

² Embrapa Gado de Leite. Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco. CEP 36038-330 Juiz de Fora, MG. E-mail: mmartins@cnpGLembrapa.br

³ Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Av. P. H. Rolfs s/n. CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: ebarros@ufv.br

INTRODUÇÃO

A adoção do cultivo de organismos geneticamente modificados (OGM) é uma realidade no mundo atual. Desde a primeira liberação em escala comercial, em 1995, até os dias atuais, a área total plantada com lavouras transgênicas cresceu mais de 50 vezes, passando de 1,7 milhão de hectares em 1996 para 102 milhões de hectares em 2006. Dentre os produtos cultivados, destacam-se a soja tolerante ao herbicida glifosato (58,6 milhões de hectares), seguida do milho tolerante a inseto (25,2 milhões de hectares), do algodão tolerante a inseto e herbicida (13,4 milhões de hectares), e da canola tolerante a herbicida (4,8 milhões de hectares) (James, 2007). Outras culturas também são ou já foram liberadas para cultivo em alguns países, como o tomate com amadurecimento tardio, a batata resistente a inseto e vírus, a chicória, o arroz e a beterraba tolerantes a herbicida, e o mamão resistente a vírus (AGBIOS Database).

No Brasil, apenas três produtos transgênicos foram liberados para plantio comercial: a soja resistente ao glifosato (Soja Roundup Ready® Monsanto GTS-40-3-2) em 2003; o algodão resistente a inseto (Algodão BollGard® 531 Monsanto) em 2005; e mais recentemente, em maio de 2007, o milho resistente a inseto (*Milho Liberty Link Bayer CropScience*). Apesar disso, grãos e farelo de soja geneticamente modificados (GM) têm sido detectados no País desde 2000. Grãos de milho GM foram detectados inicialmente em 2003 (Marcelino *et al.*, 2003), e apenas em 2004 houve uma autorização, pela CTNBio, para importação de 400 mil toneladas de milho GM de Bt11, *LibertyLink* e NK603, a pedido da Associação Avícola de Pernambuco. Todo o carregamento deveria apenas ser utilizado como ração e para consumo próprio da Associação (Parecer 530 da CTNBio/2004).

Pela análise de sementes de soja fiscalizadas e certificadas, que foram utilizadas para o plantio na safra 2002/2003, nos principais estados produtores (RS, PR, MT e MG), 19,69% das sementes oriundas do estado do RS eram transgênicas (Pimenta, 2003). O Brasil foi um dos países que mais aumentou o cultivo de plantas GM, passando de 5 milhões de hectares plantados em 2004 para 9,4 milhões de hectares em 2005, atingindo 11,5 milhões de hectares em 2006 (James, 2007).

A ampliação da área mundial cultivada com OGM, em especial no Brasil, reflete-se também no aumento de transgênicos em produtos alimentícios. No Brasil, uma legislação específica para rotulagem de alimentos GM foi inicialmente publicada em 2001, estabelecendo o limite

de 4% para presença acidental de soja transgênica entre os grãos comercializados no País. Em 2003, mediante Decreto N° 4.680 de 25 de abril, a rotulagem passou a ser obrigatória para produtos embalados, a granel ou *in natura*, que contêm ou que são produzidos a partir de OGMs, acima do limite de 1,0% do produto final.

Desde a introdução de culturas transgênicas e da publicação das normas de rotulagem no País, nenhum estudo referente à detecção e quantificação de transgênicos em alimentos rotineiramente consumidos pela população foi realizado. Alguns órgãos nacionais vêm realizando trabalhos de validação de métodos de detecção de transgênicos nos mais variados tipos de produtos alimentícios, comumente consumidos pela população brasileira, no entanto nenhuma informação existe em termos da abrangência e oferta desses alimentos aos consumidores (Cardarelli *et al.*, 2006). Informações a cerca do nível médio de resíduos transgênicos em diferentes tipos de produtos, compostos pelos mais variados tipos de matrizes, são importantes para suporte a trabalhos de fiscalização, conhecimento dos tipos de resíduos transgênicos que já vêm sendo consumidos pela população e por qual período, além de fornecer subsídios para o estabelecimento de protocolos de rastreabilidade.

Este trabalho tem como objetivo apresentar um panorama dos principais tipos de produtos compostos pelas mais variadas matrizes, em que foram detectados resíduos transgênicos dentre os diversos tipos de alimentos comercializados no País e, ainda, identificar quais apresentaram percentuais acima do limite estabelecido pela legislação nacional, no período de 2000 a 2005.

MATERIAL E MÉTODOS

Material de referência

Como material de referência para determinação do percentual de OGMs nas amostras, foram utilizados padrões de referência certificados (CRM) produzidos pelo *Institute for Reference Materials and Measurement* (IRMM). Os padrões contêm 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% ou 5,0% (p/p) de farinha de soja Roundup Ready® ou de milho para os produtos que conferem resistência a insetos Bt11 YieldGard™ e Bt176™ (Syngenta) e Mon 810 YieldGard® (Monsanto). Embora tenha sido possível a detecção de OGM nas amostras, apenas os produtos descritos, que apresentavam CRMs disponíveis, puderam ser identificados.

Material para análise

Todas as amostras foram analisadas pelo Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, empresa que foi criada no sistema de Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa. O Laboratório é credenciado na norma NBR/ISO IEC 17025 (Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração) para emissão de laudos oficiais ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento desde 2003.

Os produtos analisados foram aqueles enviados para análise de detecção e quantificação de OGM por clientes nacionais, como produtores, associações, portos, beneficiadora de grãos e empresas alimentícias de diferentes regiões do País. As amostras analisadas represen-

tam a demanda dos tipos de produtos e estado de origem, analisados pela empresa durante o período. Os principais estados onde houve demanda foram Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Bahia. A demanda das amostras por estado, durante o período 2000 a 2005, pode ser observada na Tabela 1.

Foram analisadas 3.944 amostras dos mais variados produtos industrializados, *in natura* e grãos, compostos principalmente pelas matrizes soja e/ou milho, para análise de detecção de resíduos transgênicos. A distribuição das amostras no decorrer dos anos foi: 180 amostras em 2000; 439 em 2001; 730 em 2002; 751 em 2003; 1347 em 2004; e 497 em 2005. A distribuição dos tipos de produtos analisados no período de 2000 a 2005, pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 1. Distribuição dos produtos analisados para detecção de OGM durante o período 2000 a 2005

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

Tabela 2. Demanda de amostras para análise de detecção e quantificação de resíduos transgênicos por Estado no período de 2000 a 2005

ESTADO	2000		2001		2002		2003		2004		2005	
	Nº de Amostras	%	Nº de Amostras	%	Nº de Amostras	%	Nº de Amostras	%	Nº de Amostras	%	Nº de Amostras	%
AM	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,27	1	0,07	2	0,40
BA	0	0,00	16	3,64	0	0,00	0	0,00	83	6,16	23	4,63
CE	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	15	1,11	17	3,42
ES	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,13	1	0,07	0	0,00
GO	4	2,22	0	0,00	0	0,00	3	0,40	10	0,74	1	0,20
MG	7	3,89	33	7,52	1	0,14	9	1,20	28	2,08	28	5,63
MS	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,27	0	0,00	0	0,00
MT	0	0,00	0	0,00	1	0,14	0	0,00	0	0,00	0	0,00
PR	116	64,44	210	47,84	146	20,00	112	14,91	104	7,72	84	16,90
PE	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,22	1	0,20
RS	13	7,22	20	4,56	100	13,70	71	9,45	42	3,12	13	2,62
SC	22	12,22	100	22,78	377	51,64	353	47,00	455	33,78	103	20,72
SP	18	10,00	60	13,67	105	14,38	198	26,36	605	44,91	225	45,27
TOTAL	180		439		730		751		1347		497	

Extração de DNA

O DNA genômico dos padrões de referência foi extraído pelo método *PrepMan* (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. O DNA das amostras foi extraído pelas metodologias CTAB (Rogers & Benedich, 1988) e Wizard™ (Promega).

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

Oligonucleotídeos e condições de amplificação por PCR qualitativo e quantitativo

Para a verificação da qualidade do DNA, as amostras contendo soja em sua composição foram amplificadas com os iniciadores específicos para o gene de referência endógena lecitina (Meyer *et al.*, 1994), aquelas contendo milho para o gene da *delta zeina* (Studer *et al.*, 1998),

algodão para o gene que codifica a proteína carreadora acil fibra específica (Monsanto, 2004), e aquelas contendo canola para o gene *acetil-CoA carboxilase (ACC)* (Hernandez *et al.*, 2001). Produtos para os quais nenhuma referência endógena tenha sido descrita, a qualidade do DNA foi verificada pela sua amplificação com *primers RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)*. Para a detecção de resíduos GM na composição das amostras, estas foram amplificadas com oligonucleotídeos específicos para a região promotora CaMV35S (EMBL AJ308514), e terminadora NOS (EMBL 308515), ambas presentes na maioria das construções transgênicas. Para a identificação de soja RR, foram utilizados oligonucleotídeos específicos que partem na sequência que codifica a região codificadora EPSPS (EMBL AY592954). Para a identificação de milho Bt11 YieldGard™, Bt 176™ (Syngenta) e Mon 810 YieldGard® (Monsanto), foram utilizados oligonucleotídeos específicos para a região codificadora da endotoxina Cry1Ab (Zimmermann *et al.*, 2000). As sequências dos oligonucleotídeos, bem como os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados e as temperaturas de anelamento empregadas, estão apresentadas na Tabela 3.

As reações de PCR convencional foram conduzidas em termociclador modelo 7900 (Applied Biosystems), com período inicial de desnaturação a 94°C, por 4 min, seguidas por 35 ciclos de polimerização (94°C por 30 s, 55°C por 1 min, e 72°C por 2 min) e período adicional de

Tabela 3. Sequência de *primers* e sondas utilizados nas reações de PCR qualitativo.

<i>Primers</i>	Alvo	Sequência	TA*	Amplicon
Lec-F	Gene da lecitina da soja	5'GCCCTCTACTCCACCCCATCC 3'	55 °C	118 pb
Lec-R		5'GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG 3'		
Nos-Long F	Região terminadora NOS	5'ATTGCGGGACTCTAATCATAAAAA 3'	58 °C	180 pb
Nos Long-R		5'ATCGTTCAAACATTTGGCAATAA 3'		
RR-F	Região codificadora EPSPS	5'TGATGTGATATCTCCACTGACG 3'	62 °C	172 pb
RR-R		5'TGTATCCCTTGAGCCATGTTGT 3'		
Zei-F	Gene da deltazeína do milho	5'AGTGCAGCCATATTCCAG 3'	55 °C	277 pb
Zei-R		5'GACATTGTGGCATCATCATTT 3'		
Bt 11-F	Região codificadora Cry1Ab	5'TATCATCGACTTCCATGACCA 3'	60 °C	128 pb
Bt11-R		5'AGCCAGTTACCTTCGGAAAA 3'		
Acc1-F	Gene da acetil-CoA carboxilase da canola	5'GGCGCAGCATCGGCT 3'	55 °C	82 pb
Acc1-F		5'GGTGAGCTGTATAATCGAGCGA 3'		
Acp1-F	Gene que codifica a proteína acilfibra específica do algodão	5'ATTGTGATGGGACTTGAGGAAGA 3'	55 °C	76 pb
Acp1-R		5'CTTGAACAGTTGTGAATGGATTGTG 3'		
35-S	Região promotora 35S do vírus do mosaico da couve-flor	5'GATAGTGGGATTGTGCGTCA 3'	62 °C	195 pb
35-R		5'GCTCCTACAAATGCCATCATTGCG 3'		

* TA – temperatura de anelamento.

polimerização a 72°C por 7 min. Para cada par de *primers*, foi utilizada a temperatura de anelamento mais apropriada. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 mM de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 0,2 pmol de cada *primer*, 100 ng DNA molde, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3 e MgCl₂ 1,5 ou 2,0 mM. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose 2,0% (p/v), contendo 0,1 µg/mL de brometo de etídeo imerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), e visualizados por meio de luz ultravioleta.

As reações de PCR quantitativo foram efetuadas no equipamento ABI PRISM® 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). As amostras contendo soja foram amplificadas com o kit *TaqMan GMO Soy 35S Detection Kit*, e aquelas contendo milho, com o kit *TaqMan GMO Maize 35S Detection Kit* (Applied Biosystems). As termociclagens e concentrações dos reagentes foram realizadas conforme recomendações do fabricante. Estes kits empregam a metodologia *TaqMan*® para a quantificação da soja e/ou milho GM das amostras.

Todos os métodos de detecção e quantificação de transgênicos em alimentos utilizados para análise neste

trabalho foram previamente validados por órgãos internacionais (Joint Research Center) ou intralaboratorialmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mais importantes pré-requisitos para o emprego de métodos de detecção e quantificação de OGMs em alimentos, utilizando a metodologia de PCR, são o conhecimento da construção genética exógena a ser detectada e a habilidade em extrair quantidades suficientes de DNA amplificável da amostra a ser investigada (WURZ *et al.*, 1999).

Como a Lei de Rotulagem em vigor no Brasil se aplica à quantidade de transgênico no produto final, e não na matéria-prima adicionada ao produto, metodologias de extração de DNA para os mais variados tipos de produtos e matrizes avaliados neste trabalho, como biscoitos, produtos cárneos, bebidas lácteas, sucos, entre outros, foram desenvolvidas e validadas intralaboratorialmente. Alguns métodos de extração largamente utilizados para obtenção de amostras com qualidade satisfatória para análise de OGM, tanto de matérias-primas vegetais (Lipp

et al., 2005) como de produtos processados, como tofu, farinha de soja, patês, entre outros (Zimmermann *et al.*, 1998; Hupfer *et al.*, 1998; Hotzel *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1997), foram utilizados como referência.

A detecção e quantificação de OGM nas amostras se deu pela técnica de PCR, que vem sendo a principal metodologia empregada para análise de alimentos geneticamente modificados (Bonfini *et al.*, 2001). Além de apresentar um custo relativamente baixo, possui alta sensibilidade e o DNA-alvo para a análise pode ainda apresentar certo nível de degradação, comum em amostras de alimentos.

A Figura 1 mostra os possíveis resultados obtidos em uma análise qualitativa, incluindo a avaliação da qualidade da amostra a ser analisada, através da amplificação de um gene de referência endógena. Para tornar a detecção de OGM mais precisa e confiável, o uso de um gene de referência é indispensável. Para ser utilizado como referência endógena, o gene deve ser espécie-específico, apresentar baixo número de cópias no genoma e exibir baixa heterogeneidade entre cultivares (Ding *et al.*, 2004).

Embora as características mais marcantes do método de detecção de transgenes, baseado na reação de PCR convencional são a sua precisão e a sua sensibilidade, o método é incapaz de fornecer informação acurada sobre a quantidade do alvo que está sendo amplificado devido a oscilações na eficiência de amplificação em diferentes reações, bem como nos diferentes ciclos de uma mesma reação. Estas variações estão relacionadas com o acúmulo de inibidores, perda da processividade da enzima DNA polimerase e escassez dos reagentes ao longo dos ciclos. Em especial, nos últimos ciclos da PCR, os produtos de amplificação são produzidos de modo não exponencial, o que torna inviável a correlação da quantidade inicial de alvo com a quantidade de alvo amplificado no decorrer dos ciclos. Desse modo, a quantificação do percentual de DNA GM nas amostras foi avaliado pela técnica de PCR quantitativo. Na Figura 2, pode ser visualizada uma curva de amplificação numa análise quantitativa em tempo real, onde a quantificação de determinada amostra é feita com base na comparação da sua curva de amplificação com as de padrões certificados contendo quantidades conhecidas de OGMs. A técnica expressa o percentual de DNA GM modificado com relação ao total de DNA da espécie avaliada.

Ao longo dos anos em que grãos e diferentes tipos de alimentos *in natura* e processados foram analisados quanto a resíduos GM, pôde-se observar um aumento gradual no número de amostras positivas, demonstran-

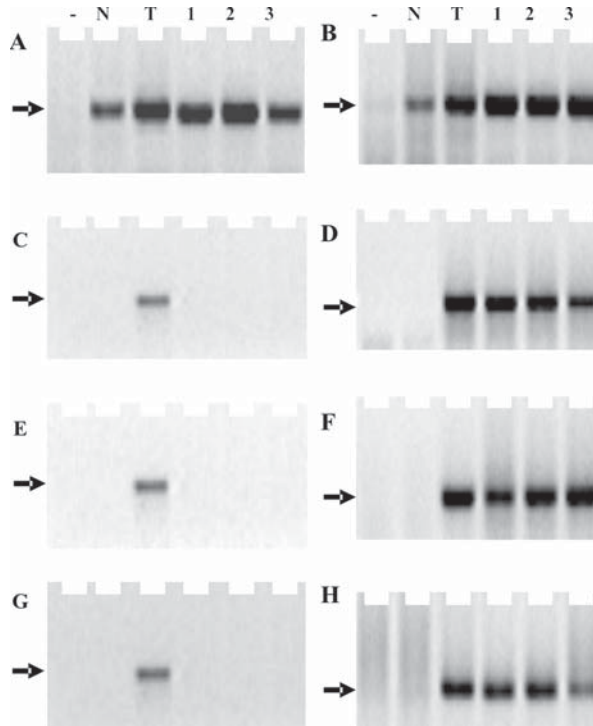


Figura 1: Análise qualitativa de OGM em amostras de grãos de soja. O DNA das amostras foi extraído pelo método Wizard e amplificado com *primers* específicos que anelam ou no gene de referência endógena lectina (controle A e B), ou na região do promotor 35S do CaMV (C e D), ou na região codificadora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

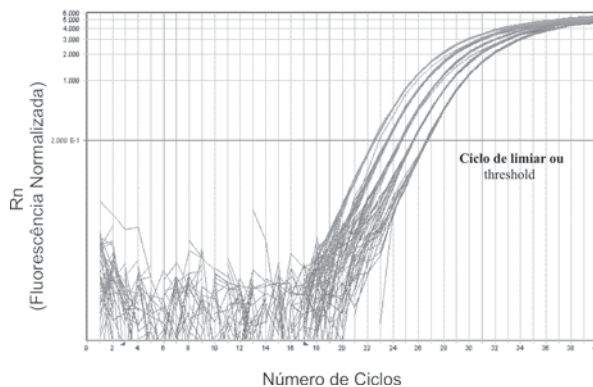


Figura 2. Curva de amplificação de uma análise quantitativa em PCR de tempo real. A determinação da porcentagem de resíduos de OGM é baseada na comparação da curva de amplificação da amostra analisada com as curvas de amplificação de padrões certificados contendo quantidades conhecidas de OGM.

do que, mesmo quando o plantio e a comercialização de OGM eram proibidos no País, estes de alguma forma estavam no mercado, pelo menos desde o ano de 2000.

Em 2000, apenas 5% do total das amostras analisadas foram positivas. Em 2001, esse percentual subiu para 11,39%, e atingiu o percentual de 28,45% em 2002. Em 2003, o percentual permaneceu constante em torno de 28,23%, sofrendo uma leve redução em 2004 para 25,69%, o que pode ser devido à publicação do decreto de rotulagem em abril do ano anterior. No ano seguinte, 2005, o percentual de amostras positivas continuou a subir, atingindo o valor de 28,17%. A distribuição das amostras positivas e negativas detectadas por PCR, com relação ao total de amostras analisadas anualmente, durante o

período de 2000 a 2005, pode ser observada na Tabela 4.. Em 2000, apenas 9 amostras, ou seja, 5% do total de 180 analisadas, continham soja Roundup Ready®. Em 2001, houve um aumento tanto no total de amostras analisadas quanto no número de positivas, que foram 480 e 50, respectivamente, o que elevou o percentual de amostras positivas para 11,39% do total de amostras analisadas naquele ano. Nos anos posteriores, os percentuais de amostras positivas em cada ano se mantiveram acima de 25% do total de amostras analisadas; em 2004, foi observado o maior valor absoluto de amostras positivas, 347 do total de 1346 analisadas no ano. As primeiras amostras de milho grão GM foram detectadas em 2003, e neste mesmo ano foi detectada a presença de milho GM em

Tabela 4. Distribuição de amostras positivas e negativas com relação ao total de amostras analisadas anualmente durante o período de 2000 a 2005

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

Produtos	2000				2001				2002			
	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)	N*	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)
Amido de Milho	65	65	0	0,00	22	13	9	0,67	10	7	3	0,60
Bebidas Lácteas	8	8	0	0,00	18	14	4	0,30	12	12	0	0,00
Biscoitos	0	0	0	0,00	16	16	0	0,00	12	7	5	1,01
Condimentos e Temperos	17	7	10	1,33	95	65	30	2,23	12	11	1	0,20
Empanados	0	0	0	0,00	23	13	10	0,74	10	0	10	2,01
Farelo de Soja	90	39	51	6,79	59	38	21	1,56	23	12	11	2,21
Farinha de Trigo	0	0	0	0,00	70	48	22	1,63	69	61	8	1,61
Fubá de Milho	7	6	1	0,13	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Lecitina	0	0	0	0,00	5	4	1	0,07	3	2	1	0,20
Macarrão e Massas	0	0	0	0,00	27	11	16	1,19	4	2	2	0,40
Matinais	8	5	3	0,40	56	52	4	0,30	23	17	6	1,21
Milho em Grão	108	102	6	0,80	337	330	7	0,52	130	122	8	1,61
Mistura para Bolo	0	0	0	0,00	44	29	15	1,11	14	8	6	1,21
Mistura para Empanados	24	16	8	1,07	132	82	50	3,71	12	1	11	2,21
Óleos e Gorduras	5	5	0	0,00	35	25	10	0,74	2	2	0	0,00
Outros	34	29	5	0,67	95	84	11	0,82	42	38	4	0,80
Produtos Cárneos	14	6	8	1,07	22	10	12	0,89	5	2	3	0,60
Ração	47	34	13	1,73	68	49	19	1,41	22	18	4	0,80
Salsicha	35	6	29	3,86	90	38	52	3,86	62	7	55	11,07
Soja em Grão	104	47	57	7,59	33	19	14	1,04	19	17	2	0,40
Sopas	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Sucos Naturais	5	5	0	0,00	0	0	0	0,00	3	3	0	0,00
Produtos Protéicos de Soja	180	159	21	2,80%	100	61	39	2,90	8	8	0	0,00
Total	751	539	212	28,23	1347	1001	346	25,69	497	357	140	28,17

N – número de amostras analisadas;

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

amostras processadas de fubá, e, em 2004, em amostras de amido de milho. Todas as amostras continham resíduos de milho GM para Bt11 YieldGard™ (Syngenta).

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

elevação no ano seguinte, 2005, para 53,72%. A elevação da demanda pela análise de produtos processados, principalmente em 2004 e 2005, anos posteriores à publicação do decreto de rotulagem, pode ser interpretada como reflexo deste. Embora não haja dados concretos da fiscalização ter-se efetivamente intensificado no País, percebeu-se maior atenção das empresas que utilizam soja e/ou milho na constituição de seus produtos, em relação à rastreabilidade e aos percentuais de resíduos de OGM em seus produtos. A demanda pela análise dos produtos de acordo com o nível de processamento, no período de 2000 a 2005, pode ser observada na Figura 3.

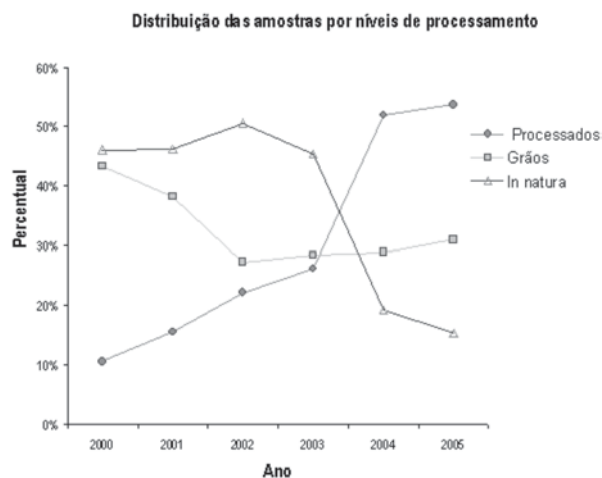


Figura 3. Percentual de produtos analisados de acordo com os níveis de processamento no período de 2000 a 2005.

Estas classes foram, de acordo com a ordem de predominância, milho em grão (18,41%), diferentes produtos protéicos de soja (15,42%), soja em grão (11,36%) farelo de soja (8,52%) e ração (5,81%). Considerando o nível de predominância, as amostras de farelo de soja e soja em grão foram as que mais se destacaram com relação ao percentual de amostras positivas atingindo os valores de 44,35% e 35,49%. Em contrapartida, as amostras de milho grão apresentaram um baixo percentual de amostras positivas, apenas 2,89%, o que representa apenas 21 amostras positivas do total de 726 analisadas no período, uma vez que a predominância da demanda por este tipo de amostra foi a mais elevada, considerando-se o total de amostras analisadas nos seis anos.

Dentre os produtos processados, a demanda de análise de amostras de salsichas foi a que mais se destacou, atingindo o total de 4,74% do total de amostras analisadas. Da mesma forma, o percentual de amostras positivas foi significativamente mais elevado, superando o total de 72% das amostras de salsichas analisadas. Resultado

similar foi observado na análise de produtos cárneos, em que o percentual de amostras positivas com relação ao total de amostras de produtos cárneos analisados superou o percentual de 50%. Esses resultados podem ser atribuídos a prática comum de adição de proteína na composição destes tipos de produtos, a fim de elevar o seu teor protéico.

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

Do total de amostras analisadas durante todo o período, 1.530 foram quantificadas a fim de se determinarem os níveis de resíduos transgênicos. Das 1.530 amostras quantificadas, 40,92% apresentaram resíduos de DNA GM acima de 0,1% do total de DNA da espécie analisada. Desse total, cerca de 46,01% apresentou resíduos transgênicos acima de 1,0%, e 27,48% acima de 5,0%. A distribuição das amostras quantitativas, positivas e negativas para resíduos de transgênicos, e ainda de acordo com os níveis percentuais de resíduos transgênicos, 1% e 5%, analisadas durante o período de 2002 a 2005, encontra-se na Tabela 5.

Dentre os quatro anos em que as amostras foram quantificadas (2002-2005), o ano de 2003 apresentou o maior percentual de amostras com resíduos GM superiores a 1,0%, superando 60% do total de amostras positivas quantificadas, enquanto 2005 apresentou o menor percentual, com cerca de 25% de amostras. O ano de 2003 também se destacou com o maior percentual de amostras contendo resíduos de transgênicos acima de 5,0% do total de DNA da espécie analisada, atingindo o percentual de 39,78%. Em contrapartida, em 2005, amostras contendo resíduos transgênicos acima de 5% foi de apenas 14,63%.

Embora tenham sido detectadas amostras contendo percentuais de DNA GM acima de 1% e 5% do total de

Tabela 5. Distribuição das amostras positivas com relação aos níveis percentuais de resíduos transgênicos no período de 2002 a 2005

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

DNA da espécie analisada, acima de 50% do total das amostras positivas analisadas por PCR quantitativo apresentaram resíduos transgênicos com percentuais inferiores a 1%, logo não necessitariam ser rotuladas. Com relação às amostras com níveis de DNA GM superiores a 1% e 5% do DNA total da espécie analisada, para se inferir sobre a necessidade de rotulagem, segundo os critérios legislativos nacionais, seria necessário verificar quanto da composição do produto é atribuída à espécie analisada. Isto ocorre pelo fato da legislação nacional sobre rotulagem se referir ao percentual de resíduo transgênico com relação ao produto final, e a técnica de quantificação baseia-se apenas no DNA da espécie em questão. Embora a extração de DNA seja feita a partir do produto final, a quantificação do percentual de OGM se dá pela relação entre a quantidade de cópias do alvo transgênico e do alvo endógeno, espécie-específico, co-amplificados na reação de PCR quantitativo.

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

CONCLUSÕES

Verificou-se que há produtos contendo resíduos transgênicos em alimentos consumidos no Brasil pelo menos desde 2000. A presença de resíduos transgênicos foi detectada tanto em amostras de grãos, produtos *in natura* e processados. Dentre os produtos analisados, considerando o nível de predominância da demanda pela análise, as classes de farelo de soja e soja em grão foram as que mais se destacaram com relação ao percentual de amostras positivas. Dentre os produtos processados, as amostras de salsichas, empanados, produtos cárneos, mistura para empanados e condimentos foram as que apresentaram os maiores percentuais de resíduos transgênicos.

De todos os tipos de produtos analisados durante os seis anos, excetuando-se as amostras de sucos naturais e sopas, pelo menos uma amostra com resíduos transgênicos foi detectada em determinado momento.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Laboratório de Análises Genéticas - AgroGenética.

REFERÊNCIAS

- AGBIOS Database. Disponível em <http://www.agbios.com/dbase.php>.
- Bonfini L, Heinze P, Kay S & Van den Eade, G (2001) Review of GMO detection and quantification techniques. Report from the European Commission Joint Research Center, Ispra, Italy, 67p.
- Cardarelli P, Branquinho MR, Ferreira RTB, Cruz FP & Gemal A (2006) Detection of GMD in food products in Brazil: the INPCQS experience. *Food Control*, 16:859-866.
- Ding J, Jia J, Yang L, Wen H, Zhang C, Liu W & Zhang D (2004) Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:3372-3377.
- Hernandez M, Río A, Esteve T, Prat S & Pla MA (2001) Rapeseed-specific gene, acetyl-coA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49:3622-3627.
- Hotzel H, Müller W & Sachse K (1999) Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *European Food Research and Technology*, 209:192-196.
- Hupfer C, Hotzel H, Sachse K & Engel KH (1998) Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 206:203-207.
- James C (2007) Global status of commercialized transgenic crops: 2006. ISAAA Briefs 35: 1-13. International Services for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, 2007.
- Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D, Song P. (2005) Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88:136-9154.
- Mackenzie DJ (2000) Agriculture and biotechnology strategies (Canadá) inc., comparison of international regulatory regimes for food products of biotechnology, 62p.
- Marcelino FC, Guimaraes MFM, Pimenta MAS, Moreira MA & Barros EG (2003) Detecção de resíduos transgênicos em grãos e produtos derivados: a experiência da Universidade Federal de Viçosa. *Revista Brasileira de Ciência e Biotecnologia*, 31:15-22.
- Meyer R, Candrian U & Luèthy J (1994) Detection of pork in heated meat products by polymerase chain reaction (PCR). *Journal of AOAC International*, 77:617-622.
- Meyer R, Chardonnens F, Hubner P & Luthy J (1996). Polymerase Chain Reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 203:339-344.

- Meyer R & Jaccaud E (1997) Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for specific detection of glyphosate tolerant soybeans. In: Amadò R, Battaglia R (Eds) authenticity and adulteration of food – the analytical approach. Ninth European Conference on Food Chemistry, Interlaken, Proceedings, 1:23-28.
- Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (2004) A recommended procedure for real time quantitative Taqman® PCR for Bollgard® Cotton 531, 7 p.
- Pimenta MAS (2003) Detecção de transgênicos em soja e produtos derivados no Brasil. Tese de doutorado. Viçosa, Universidade Federal De Viçosa, 74p.
- Rogers SO & Benedich AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology*, 6:1-10.
- Studer E, Rhyner C, Luthy J & Hubner P (1998) Quantitative competitive PCR for detection of genetically modified soybean and maize. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 207:207-213.
- Zimmermann A, Luthy J & Pauli U (1998) Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 207:81-90.
- Zimmermann A, Luthy J & Pauli U (2000) Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 33: 210-216.
- Wurz A, Bluth P, Zeltz P, Pfeifer C & Willmund R (1999) Quantitative analysis of genetically modified organism (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control*, 10:385-389.