

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

GABRIELA REZENDE COSTA

**ANÁLISE DOS TEORES DE ISOFLAVONAS E MINERAIS EM
CULTIVARES DE SOJA TRANSGÊNICAS E COMERCIAIS**

Belo Horizonte
2013

GABRIELA REZENDE COSTA

ANÁLISE DOS TEORES DE ISOFLAVONAS E MINERAIS EM
CULTIVARES DE SOJA TRANSGÊNICAS E COMERCIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Ciências de Alimentos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Renata Adriana Labanca

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Belo Horizonte

2013

Costa, Gabriela Rezende.

C837a Análise dos teores de isoflavonas em minerais e cultivares de soja transgênicas e comerciais / Gabriela Rezende Costa. – 2013.

148 f. : il.

Orientadora: Dra. Renata Adriana Labanca.

Co-orientador: Dr. Roberto Gonçalves Junqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Soja - Teses. 2. Organismos transgênicos – Teses. 3. Minerais – Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Labanca, Renata Adriana. II. Junqueira, Roberto Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.19

Nome da Mestranda: Gabriela Rezende Costa

Nome da Orientadora: Prof.^aDr.^a. Renata Adriana Labanca

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Linha de Pesquisa do PPGCA

Propriedades Funcionais dos Alimentos

Áreas de conhecimento (CNPq/CAPES)

5.07.01.00-2 – Ciência de Alimentos

Instituições participantes:

- ✓ Laboratórios de Bromatologia (Análise de Alimentos e Nutrição Experimental) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia
- ✓ Laboratório de Contaminantes Metálicos (LCM), Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA), Instituto Octávio Magalhães (IOM) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED),
- ✓ Laboratório de Diagnóstico Vegetal e OGM, Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LANAGRO-MG)
- ✓ Núcleo temático de Utilização, Pós Colheita e Segurança Alimentar, Embrapa Soja - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Londrina do Paraná
- ✓ Financiamento CAPES (bolsa) e FAPEMIG (Projeto)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

GABRIELA REZENDE COSTA

**"ANÁLISE DOS TEORES DE ISOFLAVONAS E MINERAIS EM
CULTIVARES DE SOJA TRANSGÊNICAS E COMERCIAIS"**

APROVADA EM 20 DE MARÇO DE 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Flávia Beatriz Custódio

Profa. Dra. FLÁVIA BEATRIZ CUSTÓDIO

Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira

Profa. Dra. JOVITA EUGÊNIA GAZZINELLI CRUZ MADEIRA

Raquel Linhares Bello de Araujo

Profa. Dra. RAQUEL LINHARES BELLO DE ARAUJO

Renata Adriana Labanca

**Profa. Dra. RENATA ADRIANA LABANCA
Orientadora e Presidente da Comissão**

Dedico esta, parte tão importante da minha vida, à minha mãe. Sempre presente ela até errou, mas sempre tentando acertar. Amou tanto que por momentos chegou a sufocar. Ser que nem o divino pode ignorar e fez o poeta silenciar, me deu, não somente a luz como também a liberdade de caminhar.

AGRADECIMENTO

À Deus, energia maior que sob diferentes nomes nos inspira, nos dá forças, nos guia e nos conduz a sempre querer e fazer o bem.

À família, núcleo sem o qual somos incapazes de superar tantos desafios. De onde vem a bronca severa para superarmos e os braços fortes no auxílio do reaparecimento das inúmeras fênix nos tornamos.

Ao meu companheiro de todas as horas, Nobuiuki Costa Ito, misto de paixão e razão que me ajudou e ajuda na construção da minha fortaleza.

Aos meus amigos que são a família que escolhemos, aqueles que nos acompanham a cada dia e, mesmo que distantes, estão sempre presentes. Pessoas pelas quais estamos torcendo todos os dias e que certamente também torcem por nós. Em especial à Flávia Liparini por trazer mais luz aos meus dias com nossas conversas eternas e discussões não menos memoráveis

À Profa Renata Adriana Labanca por ter feito além do profissional enquanto orientadora com seu caráter doce e humano.

Ao Prof. Roberto Gonçalves Junqueira por sua compreensão da pessoa além do aluno e por sempre buscar nos transmitir sua destreza com os números.

Ao grupo da BROMO por sempre estar disposto a auxiliar e nossas dúvidas tirar. À minha aluna de iniciação científica predileta Thaísa Corrêa de Sousa por sua eterna disposição.

Aos parceiros da FUNED em especial João Gustavo de Souza Alves Camões e Nilton de Oliveira Couto e Silva e pela gentileza em nos receber e auxiliar nas análises e também do LANAGRO na figura Nilson César Castanheira Guimarães pela presteza em esclarecer as inúmeras dúvidas.

À todos aqueles que foram um dia apenas conhecidos e que hoje podemos falar que marcaram nossas vidas para sempre, que nos auxiliaram no conhecimento e na construção de nós mesmos.

Por final aos que não estão mais aqui, que não menos importantes, embora ausentes nos inspiram a querer mais e dar sempre o melhor de nós mesmos.

"Só sei que nada sei",
Sócrates 470a.C.-399a.C.

RESUMO

O aumento do consumo de organismos geneticamente modificados assim como a descoberta de compostos biologicamente ativos tem sido temas constantes tanto no meio acadêmico como na mídia leiga. O presente estudo une os dois temas tendo como objetivo avaliar as diferenças de composição entre a soja convencional comercializada no município de Belo Horizonte e a geneticamente modificada colhida na região de Minas Gerais no ano de 2011. Enfocou-se a análise do perfil de isoflavonas e da fração mineral, questionando a equivalência substancial do organismos convencional e geneticamente modificado. A fim de checar a conformidade da declaração do rótulo com o conteúdo de gene modificado no grão, foram utilizados métodos tradicionais de avaliação de rotulagem em conjunto com métodos modernos de avaliação de transgenia (PCR-Real time). Nas amostras comerciais estudadas não foi encontrada a presença do promotor 35S, indicando a ausência de inserção de transgene nas sojas comerciais. Para análise de minerais, a escolha pelo método de ICP-OES foi pautada pela em seu escopo e possibilidade de análise multielementar. A quantificação de isoflavonas realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, possibilitou maior precisão na quantificação, bem como melhor estratificação dos compostos. Os resultados demonstraram diferença estatística entre os grupos soja convencional e soja transgênica tanto nos teores de isoflavonas como na composição do mineral. O potássio, principal componente mineral da soja, foi quantificado em maiores teores nas sojas convencionais comparando-se às que sofreram modificação gênica. As sojas GM, por sua vez, apresentaram maior conteúdo de ferro. O teor total de isoflavonas foi maior nas sojas transgênicas, todavia a genisteína aglicona, isoflavona mais bioativa, foi encontrada em quantidades significativamente maiores nas sojas convencionais. Esses resultados colocam em questão a equivalência substancial entre os organismos, independente da origem convencional ou transgênica. Embora o pareamento entre os grupos não tenha sido feito no formato tradicional, onde se compara a soja convencional e sua quase isogênica, o delineamento representa a realidade vivida pelo consumidor do estado de Minas Gerais, com relação ao que está sendo produzido e ao que está sendo consumido.

ABSTRACT

The increased consumption of genetically modified organisms and the discovery of biologically active compounds have been constant subjects in academia. This study combines these two subjects aiming to evaluate the composition differences between conventional soybeans traded in Belo Horizonte and genetically modified soybeans harvested in Minas Gerais in 2011. We focused on the analysis of isoflavones profile and the mineral fraction, questioning the substantial equivalence of conventional and genetically modified organisms. In order to check whether GM declaration on labels agrees to transgenic content within grains, we used traditional methods to evaluate labeling combined with modern methods of transgenic assessment (PCR Real-time). It was not found presence of the 35S promoter indicating the absence of transgene insertion. Regarding minerals analysis, the chosen method was ICP-OES because of its scope and possibility of multi-element analysis. Quantification of isoflavones done by High Performance Liquid Chromatography - HPLC led to greater precision of quantification as well as better stratification of their groups. Statistical difference was found between conventional and transgenic soybean groups regarding isoflavone levels and mineral composition. Potassium, the main mineral component, was quantified in higher concentrations in conventional soybeans, while GM presented higher concentrations of iron. Genistein, the more bioactive aglycone, was found in significantly higher quantities in conventional soybeans, however the total content of isoflavones was higher in transgenic samples. Results call attention to the lack of substantial equivalence among organisms, whatever conventional or GM origins. Although the pairing between groups was not done in the traditional format, which compares conventional soybeans and its almost isogenic, the design represent the reality experienced by consumers in the state of Minas Gerais, in relation to what is produced and consumed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quadro demonstrativo de "Biotecnologia" apresentando as interfaces desta tecnologia.	30
Figura 2: Esquema de Produção de Vegetal Geneticamente Modificado por meio de infecção bacteriana.....	32
Figura 3: Esquema de Produção de Vegetal Geneticamente Modificado por meio de biobalística.....	33
Figura 4: Introdução múltipla de transgene em célula vegetal demonstrando as etapas de hibridação, retransforação e cotransformação.	34
Figura 5: Reação em cadeia da polimerase. F: fluoróforo, molécula que é reconhecida pelo equipamento e visualmente demonstrada na plotagem das curvas CTs.	40
Figura 6: Símbolo indicativo de modificação genética.....	42
Figura 7: Estrutura química das isoflavonas.....	52
Figura 8: Classificação e estrutura química das isoflavonas.	53
Figura 9: Isoflavona aglicona e β -glicosídeos	56
Figura 10: Perfil cromatográfico de isoflavonas em padrões e amostra de soja	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção anual de soja, mundial, norte americana, nacional e estadual expressas em milhões de toneladas.....	23
Tabela 2: Plantio anual de soja, norte americano, nacional e estadual expressos em milhões hectares.....	24
Tabela 3: Composição centesimal da soja em grão e de produtos a base de soja (%).....	26
Tabela 4: Adoção de OGM – Mundial e Nacional.....	35
Tabela 5: Exemplo de culturas de soja geneticamente modificadas com características nutricionais modificadas, com o propósito de fornecerem benefícios à saúde dos humanos e animais domésticos	39
Tabela 6: Conteúdo de minerais em soja em grão e produtos a base de soja	50
Tabela 7: Valores comparativos de isoflavonas em diversos alimentos	53
Tabela 8: Quantificação de isoflavonas por diferentes estudos em grãos de soja e derivados, expressa em suas doze formas:.....	64
Tabela 9: Quantificação de isoflavonas por diferentes estudos em grãos de soja e derivados, agrupadas por radical.....	66
Tabela 10: Quantificação de isoflavonas por diferentes estudos em grãos de soja e derivados, expressa em agliconas.....	67
Tabela 11: Comparação entre estudos no período de 2001-2012 para avaliar diferentes métodos de análise utilizados para quantificar isoflavonas	70
Tabela 12: Matérias-primas de grãos de soja comercial	77
Tabela 13: Mastermix para reação de amplificação do evento OGM (Promotor 35S).....	80
Tabela 14: Iniciadores e sonda para ensaio de detecção do promotor 35S	81
Tabela 15: Mastermix para reação de amplificação do controle endógeno (Lecitina).....	81
Tabela 16: Iniciadores e sonda para ensaio de detecção do controle endógeno (Lecitina).....	82
Tabela 17: Programa de amplificação para promotor 35S e controle endógeno	83
Tabela 18: Matérias-primas de grãos de soja transgênico	88
Tabela 19: Parâmetros da mufla para abertura das amostras e posterior análise de minerais	89

Tabela 20: Pontos da curva analítica de macrominerais utilizados para análise no ICP-OES.....	90
Tabela 21: Pontos da curva analítica de microminerais utilizados para análise no ICP-OES.....	91
Tabela 22: Esquema de diluição das amostras de soja.....	91
Tabela 23: Parâmetros do ICP-OES para análise de minerais nas amostras de soja.....	92
Tabela 24: Perfil de macrominerais em sojas transgênicas e convencionais, cultivadas e comercializadas em MG, em 2011	95
Tabela 25: Perfil de microminerais em sojas transgênicas e convencionais, cultivadas e comercializadas em MG, em 2011	96
Tabela 26: Condições de análise de isoflavonas por CLAE em grão de soja..	99
Tabela 27: Perfil de Isoflavonas em grão de soja cru, convencional e transgênicos, comercializados e cultivados em MG, em 2011	102
Tabela 28: Perfil de Isoflavonas agrupadas por radical em Grãos de soja cru, transgênicas e convencionais	104

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AlCl ₃	Cloreto de Alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
VB	Valor biológico
CaMV	Vírus Mosaico da Couve-flor
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
CLC	Cromatografia Líquida Clássica
CO ₂	Dióxido de Carbono
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
CP4	Cepa da bactéria de solo <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
Ct	“ <i>Cycle threshold</i> ” ou Ciclo de limiar
DAI	Daidzeína
DNA	“ <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ” ou ADN/ Ácido Desoxirribonucleico
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPSPS	Gene da enzima 3-enolpiruvil-shiquimato 5-fosfato sintase
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
GEN	Genisteína
GLI	Gliciteína
GM	Geneticamente Modificado
GTS-40	Evento “ <i>Roundup Ready</i> ”
HPLC	“ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”
ICP-AES	“ <i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy</i> ”

ICP-OES	Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente, em inglês: " <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> "
IFS	Isoflavona Sintetase
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
Lambda - λ	Comprimento de onda
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, em inglês: " <i>Low Density Lipoprotein</i> "
MeOH	Metanol
NaCl	Cloreto de sódio,
Nos	Nopalin Sintase
NptII	Terminador do marcador de resistência à canamicina genes
NPU	Utilização da proteína líquida
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
OMC	Organização Mundial do Comércio
P.A.	Para análise
PCR	Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase
PER	Taxa de eficiência proteica
PPAR	Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo, em inglês: " <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> "
Ppm	Parte por milhão
PTK	Proteína Tirosina Quinases
RNAse	Ribonuclease
Tampão TE	Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM
Taqman	Sondas de hidrólise
TNF	Fator de necrose tumoral
UNG	Uracil N-glicosilase
USDA	" <i>United States Department of Agriculture</i> "
UV	Ultravioleta

Sumário

INTRODUÇÃO	18
REVISÃO DE LITERATURA	21
1. A SOJA.....	21
1.1 Histórico	21
1.2 Produção.....	22
1.3 Aspectos nutricionais	25
1.3.1 Proteínas.....	26
1.3.2 Lipídios	27
1.3.3 Carboidratos e Fibras.....	28
1.3.4 Aspectos Antinutricionais	28
2 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS – OGM	30
2.1 Histórico	30
2.1.1 Tecnologias de desenvolvimento	32
2.1.2 Importância econômica e ambiental.....	34
2.2 Modificação gênica na soja	36
2.3 Métodos de Quantificação.....	39
2.4 Rotulagem.....	41
3 MINERAIS	42
3.1 Importância	42
3.1.1 Saúde Humana.....	43
3.1.2 Cultivo	46
3.2 Minerais na soja	49
3.3 Método de quantificação	50
4 ISOFLAVONAS	51
4.1 Histórico	51
4.2 Atividades.....	55
4.2.1 Absorção, Metabolismo e Excreção.....	55
4.2.2 Mecanismos de Ação	56
4.2.3 Principais Funções Fisiológicas	57
4.3 Isoflavonas na soja.....	60
4.4 Método de quantificação	69
CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÃO GÊNICA EM SOJA.....	76

1	INTRODUÇÃO	76
2	OBJETIVOS	76
3	MATERIAL E MÉTODOS	76
3.1	Laboratório	76
3.2	Materiais.....	77
3.2.1	Amostras.....	77
3.3	Métodos	77
3.3.1	Levantamento de dados de rotulagem.....	77
3.3.2	Preparo da Amostra.....	78
3.3.3	Análise de modificação gênica em soja por PCR-Tempo Real	78
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	84
5	CONCLUSÕES	86
CAPÍTULO 2 ANÁLISE DE MINERAIS EM SOJA POR ICP-OES		87
1	INTRODUÇÃO	87
2	OBJETIVOS	87
3	MATERIAL E MÉTODOS	87
3.1	Laboratório	87
3.2	Materiais.....	88
3.2.1	Amostras.....	88
3.3	Métodos	89
3.3.1	Preparo das Amostras.....	89
3.3.2	Análise de macro e micro minerais em soja por ICP-OES.....	91
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	92
5	CONCLUSÕES	94
CAPÍTULO 3 ANÁLISE DE ISOFLAVONAS EM SOJA POR CLAE		97
1	INTRODUÇÃO	97
2	OBJETIVOS	97
3	MATERIAL E MÉTODOS	97
3.1	Laboratório	97
3.1.1	Amostras.....	97
3.2	Métodos	98
3.2.1	Preparo das Amostras.....	98
3.2.2	Análise de isoflavonas em soja por CLAE.....	99

4	RESULTADO E DISCUSSÃO	100
5	CONCLUSÕES	105
	CONCLUSÕES INTEGRADAS E SUGESTÕES	107
	REFERÊNCIAS	109
	Apêndice I	120
	Layout do Experimento de Detecção de Modificação Gênica	120
	Apêndice II	122
	Curvas de amplificação - Padrões.....	122
	Apêndice III	124
	Curvas de amplificação - Amostras.....	124
	Apêndice IV	126
	Macrominerais - Gráficos de dispersão tipo Whiskers	126
	Apêndice V	129
	Microminerais - Gráficos de dispersão tipo Whiskers.....	129
	Apêndice VI.....	133
	Isoflavonas - Gráficos de dispersão tipo Whiskers.....	133
	Anexo I	140
	Listagem de OGM autorizados no Brasil.....	140
	Anexo II	143
	Trabalhos Apresentados em Congresso	143

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max (L.) Merril*) representa hoje a principal oleaginosa cultivada no mundo e ainda integra o conjunto de atividades agrícolas com maior relevância do mercado mundial (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2011). Embora originária do oriente tem hoje sua principal produção na América, região que se tornou principal fornecedora mundial do grão (MARTINS e RAMOS, 2009). Sua expansão não apenas de área plantada mas também de produtividade (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2011), sobretudo deste último tem sido atribuída não somente à demanda de mercado e aprimoramento no cultivo mas também a adoção de novas tecnologias.

Recentemente muito tem sido discutido sobre novas tecnologias empregadas no desenvolvimento de novos produtos alimentares. Nesse contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar na adoção de culturas biotecnológicas ao mesmo tempo em que a produção mundial atingiu o marco dos 160 milhões de hectares de organismos geneticamente modificados (OGM) produzidos (JAMES, 2011).

Em 2005 foi instituída no Brasil, pela lei nº 11.105 de 24 de março, a CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Esta instância colegiada multidisciplinar presta apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal. A CTNBio participa da formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGM, bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados. Os órgãos responsáveis pela fiscalização seriam o MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária e MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Assim o MAPA divulga anualmente a listagem de OGM autorizados no Brasil (CTNBio, 2011).

Atualmente país possui aprovação para 33 eventos sendo 5 para soja (MAPA, 2012). Considerada a principal *commodity* em termos de expansão na área de alimentos geneticamente modificados (GM) a soja foi a lavoura destaque e representou quase 50% da área global cultivada com esta tecnologia no ano de 2011 (JAMES, 2011).

Tamanho expansão desta nova tecnologia trouxe a discussão mundial entorno do direito de informação do consumidor sobre o produto que está adquirindo. Neste sentido o Brasil é dotado de um conjunto de normas que versam a favor do direito à informação do consumidor, sendo no âmbito de alimentos GM a lei nº 4680, de 24 de abril de 2003, o principal instrumento garantidor deste direito (BRASIL, 2003a).

Não obstante, a modificação gênica possa ser realizada com diferentes objetivos, incluindo melhoramento sensorial e nutricional (MOREIRA, 2011), os eventos aprovados para a soja no Brasil são voltados à tolerância a herbicida, e mais recentemente, à resistência a insetos (MAPA, 2012). Embora exista uma exigência de equivalência nutricional para aprovação de novas modificações gênicas em alimentos e nenhuma evidência indique que estes organismos possam ser mais prejudiciais à saúde humana que os tradicionais, esta manipulação pode levar a efeitos secundários da expressão do gene. Devem ser avaliadas além da composição tradicional (macro e micro nutrientes) componentes como antinutrientes e substâncias fisiologicamente ativas (LAJOLO e NUTTI, 2011). A soja amplamente conhecida por sua composição de macronutrientes (proteínas, lipídios, carboidratos, fibras) tem sido visada também pelos sua composição de minerais e elementos não nutrientes que trazem benefícios à saúde humana (MANDARINO, 2008). Assim a descoberta e reconhecimento da bioatividade das isoflavonas (BALK et al., 2005; BU, SETCHELL e LEPHART, 2005; VANTYGHM, et al.; 2005; WOOD et al., 2006; CÉSAR et al., 2008; BARNES, 2010; NEWELL-MCGLOUGHLIN, 2010; KUROSU, 2011; LI et al., 2011) e o reconhecimento da soja como principal fonte destes provocou maior interesse na proposição do presente estudo.

Uma vez que a utilização de novas tecnologias no desenvolvimento de produtos alimentares, assim como a descoberta de funcionalidade em compostos presentes em alimentos que já fazem parte da dieta habitual do ser humano têm sido temas de destaque no campo da ciência de alimentos e mesmo na mídia leiga, o presente estudo visou avaliar a interação entre dois temas que ganharam destaque nas últimas décadas, biotecnologia e compostos bioativos. Buscou-se, então, correlacionar a presença de minerais e dos compostos bioativos isoflavonas e a presença de transgenia em grãos de soja.

Foram avaliados, para tanto, os teores de minerais e isoflavonas nos grãos de sojas transgênicas cultivadas na região de Minas Gerais (MG), bem como as sojas convencionais comercializadas no município de Belo Horizonte/MG, sendo que, estas últimas foram ainda avaliadas quanto à presença de transgêne para confirmar a ausência de modificação. A hipótese inicial é que a modificação gênica não altera o conteúdo nutricional do alimento a menos que seja feito com este intuito. Foram utilizados o método de PCR real time para identificação da modificação gênica, ICP-OES para quantificação de macro e microminerais e CLAE para quantificação das isoflavonas.

REVISÃO DE LITERATURA

1. A SOJA

1.1 Histórico

A soja (*Glycine max (L.) Merril*) é uma planta herbácea, de origem chinesa, pertencente à família das leguminosas que foi introduzida no Ocidente em meados do século XVI, chegando ao Brasil no final do século XIX (FAO, 2011).

Embora originária da China, atualmente esta comódite tem sua principal produção na América, região que se tornou destaque como fornecedora mundial. Dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*“Food and Agriculture Organization of the United Nations”* – FAO) demonstram que o crescimento da produção global da oleaginosa, de 1961 a 2007, foi da ordem de 4,6% ao ano, ao passar de 27 milhões para 216 milhões de toneladas, enquanto as produções de culturas como trigo, arroz, milho, feijão, cevada e girassol cresceram, em conjunto, apenas 2,1% ao ano (MARTINS e RAMOS, 2009).

Além de ser a principal oleaginosa cultivada no mundo, a soja faz parte do conjunto de atividades agrícolas com maior destaque no mercado mundial. Observando os dados para a safra 2010/11, pode-se verificar que apenas as produções mundiais de milho, trigo e arroz superam aquela obtida pela soja. Adicionalmente, considerando o crescimento das principais culturas agrícolas entre as safras agrícolas de 1970/1971 e 2010/11, a exploração da soja é a atividade que apresentou a maior expansão, com um incremento de produção de 526% (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2011).

O complexo agroindustrial da soja desenvolveu-se como atividade voltada ao mercado externo do farelo, sendo a principal proteína vegetal usada em rações visando a produção de carne durante os anos 1970. Posto isto, o principal fator para a predominância da soja no mercado mundial de oleaginosas não decorreu do desenvolvimento do mercado de óleos vegetais em si, mas do crescimento do mercado de farelo de soja a partir do pós-guerra, em especial nos países desenvolvidos. Assim, a expansão do óleo de soja como fonte de

gorduras vegetais justifica-se pela condição de subproduto da produção de farelo (NOGUEIRA JUNIOR et al., 1997; DALL'AGNOL e HIRAKURI, 2008; MARTINS e RAMOS, 2009).

Do grão de soja processado é extraído o farelo, relevante componente protéico na fabricação de rações para animais, onde praticamente 70% do farelo protéico destas é proveniente da soja, e importante fonte de proteínas para a alimentação humana. O óleo bruto, de mesma origem, é a matéria-prima para a subsequente produção de óleo refinado, bem como pode ser destinado à fabricação de biodiesel. O óleo refinado pode ser utilizado para a produção de gorduras hidrogenadas as quais tem sua presença marcante tanto no mercado varejista como em indústrias alimentícias. Este óleo é ainda utilizado em grande escala na produção de gorduras solidificadas dentre os quais as margarinas e cremes vegetais têm maior destaque mercadológico podendo se acrescer ainda nessa classe as maioneses (MARTINS e RAMOS, 2009). O grande incremento na produção de soja pode ser atribuído a diversos fatores, como seu elevado teor de proteínas de excelente qualidade (em torno de 40%); seu teor de óleo (ao redor de 20%), que pode ser usado para diversos fins, associados à alimentação humana e à produção de biocombustíveis; ser uma *commodity* padronizada e uniforme o que possibilita ser produzida e negociada por produtores de diversos países; apresenta alta liquidez e demanda e; ainda, o aumento expressivo da oferta de tecnologias de produção das últimas décadas as quais permitiram ampliar significativamente a área e a produtividade da oleaginosa (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2011).

1.2 Produção

Entre as safras de 1987/1988 e 2010/2011, enquanto a área cultivada cresceu 90,2%, a produção foi ampliada em 154,7%. O crescimento mais expressivo na produção, em relação à área, deveu-se, em grande parte, aos avanços tecnológicos, que, no referido período, fizeram com que a produtividade média evoluísse de aproximadamente 1.900 kg/ha para mais de 2.500 kg/ha. Essa afirmativa é confirmada ao se comparar as taxas anuais de crescimento da área, produção e produtividade mundiais de soja, no período, que foram, respectivamente, de 3,17%, 4,57% e 1,36%. A produção de soja está

concentrada, principalmente, em três países: Estados Unidos, Brasil e Argentina, que atualmente juntos representam cerca de 71,5% da área plantada e 81,5%, e da produção mundial da oleaginosa. Ressalta-se que o Brasil e Argentina são responsáveis por 46,2% dessa produção global, permitindo ao MERCOSUL produzir mais da metade do referido total (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2011). Na Tabela 1 podem ser vistos dados compilados de diferentes fontes acerca de produção estadual, nacional, mundial e norte americana de soja e, de forma semelhante, a Tabela 2 contém os dados por área plantada desta oleaginosa.

Tabela 1: Produção anual de soja, mundial, norte americana, nacional e estadual expressas em milhões de toneladas.

Ano	Mundial	USA	Brasil	Minas Gerais	Fonte
2012/13	269,41*	82,06*	82,50*		USDA, 2013
			82,63*	3,32*	CONAB, 2012
2011/12	238,73	84,19	66,50		USDA, 2013
			66,38	3,06*	CONAB, 2012
2010/11	263,59	90,61	75,30		USDA, 2013
			75,32	2,91	CONAB, 2012

* Previsão. USA - Estados Unidos da América; USDA - United States Department of Agriculture e CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento.

Para a safra brasileira de 2011/2012, a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) estimou uma área plantada 50,86 milhões de hectares, sendo este valor 2,0% (982,2 mil hectares) superior ao ocorrido no ano anterior. A produção nacional de grãos, por sua vez, foi estimada em 165,90 milhões de toneladas, e o volume produzido na safra foi 1,9% (3,09 milhões de toneladas) superior a produção até então recorde de 162,80 milhões de toneladas colhidas na safra 2010/11. Entretanto, a produção nacional de soja foi estimada em

66,38 milhões de toneladas, estimativa que foi 11,9% ou 8,94 milhões de toneladas inferior à produção da safra anterior. Estes resultados negativos da safra para oleaginosa podem ser correlacionados às condições climáticas adversas causadas pelo fenômeno “La Niña” que se caracteriza por estiagens prolongadas. Em Minas Gerais, desconsiderando-se os efeitos negativos da estiagem, especialmente nas sojas de ciclo médio e tardio, as condições climáticas foram de uma maneira geral favoráveis ao desenvolvimento da cultura. A produtividade estimada em 2.987 kg/ha é 5,0% acima da safra anterior, e a produção passou de 2.913,6 mil para 3.058,7 mil toneladas, ou seja, crescimento de 5,0% (CONAB, 2012).

Tabela 2: Plantio anual de soja, norte americano, nacional e estadual expressos em milhões hectares

Ano	USA	Brasil	Minas Gerais	Fonte
	31,2			USDA, 2013
2012/13		27,24 *	1,11 *	CONAB, 2012
		26,00*		USDA, 2012
	30,4			USDA, 2013
2011/12		25,04 *	1,02 *	CONAB, 2012
		25,00		USDA, 2012
	31,3			USDA, 2013
2010/11		24,18	1,02	CONAB, 2012
		24,20		USDA, 2012

*Previsão. USA - Estados Unidos da América; USDA - United States Department of Agriculture e CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento.

A soja é um das maiores *commodities* agrícolas e seu valor econômico se deve a sua composição química. O Brasil na safra 2009/2010 foi o segundo maior produtor mundial perdendo apenas para os EUA. De acordo com dados compilados pela EMBRAPA (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2011), a safra mundial teve a produção 263,7 milhões de toneladas, na América do Sul 135,7

milhões de toneladas, EUA (maior produtor mundial do grão) 90,6 milhões de toneladas, no Brasil 75,0 milhões de toneladas. Mato Grosso (maior produtor brasileiro de soja) 20,4 milhões de toneladas e Paraná (segundo produtor brasileiro de soja) 15,4 milhões de toneladas. A exportação do Complexo Soja em 2010 teve um total de US\$ 17,1 bilhões (grão, farelo, óleo) correspondendo: o grão a 11,0 bilhões US\$ (29,1 milhões t), o farelo 4,7 bilhões US\$ (13,7 milhões t) e o óleo 1,4 bilhões US\$ (1,6 milhões t). De acordo com dados divulgados pela SEAPA MG (Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais) no ano de 2011 o complexo soja (grão, farelo e óleo) foi destaque nas exportações do estado, as vendas cresceram 44,9% e atingiram US\$ 605,3 milhões. A soja em grão se sobressaiu com uma movimentação de US\$ 326,6 milhões. A China foi o país responsável por quase a metade das vendas dos produtos do complexo soja exportados, sendo destaque também outros mercados como Holanda, Tailândia, Índia e Espanha. Um total de 79 países importaram a soja em grão e seus derivados produzidos por Minas Gerais (SEAPA, 2012).

1.3 Aspectos nutricionais

O incentivo ao consumo de soja tem sido destacado por vários fatores, dentre eles a rica composição desta leguminosa que é fonte de carboidrato, lipídios e fornece boa quantidade de proteínas vegetal de alta qualidade (rica composição de aminoácidos essenciais). Ademais, a soja apresenta propriedades funcionais, uma vez que, além dos nutrientes, ela contém substâncias não nutrientes que comprovadamente trazem benefícios à saúde humana, tendo papel relevante na redução de risco para doenças crônicas não transmissíveis (MANDARINO, 2008).

A composição centesimal de alguns produtos à base de soja estão dispostos abaixo na Tabela 3 de forma a facilitar a comparação entre diferentes formas de consumo desta leguminosa.

Tabela 3: Composição centesimal da soja em grão e de produtos a base de soja (%)

Produto	Componentes (%)			
	Proteína	Lipídeo	Carboidrato	Fibra
Soja em grão*	40,5	22,1	22,1	21,67
Farinha de soja	36,0	14,6	38,4	20,2
Extrato de soja, natural	2,4	1,6	4,3	0,4
Extrato de soja em pó	35,7	26,2	28,5	7,3
Queijo de soja (tofu)	6,6	4,0	2,1	0,8

Fonte: Adaptado de TACO, 2006; *TBCA, 2012.

1.3.1 Proteínas

Alimento fonte de proteína de elevado valor biológico, a soja tem como aminoácidos limitantes aqueles os quais contêm enxofre em sua estrutura (metionina e cistina). De acordo com a Tabela de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo este componente representa 40,5% do peso total do grão de soja cru (TBCA, 2012). Quando comparada à proteína do ovo inteiro, padrão de alto valor biológico, a proteína de soja atinge percentuais de aproximadamente 70% sendo portanto este o "escore químico" da proteína desta oleaginosa. Por outro lado, por se tratar de uma proteína vegetal, é excepcionalmente rica em lisina, o que a torna um complemento valioso para os cereais, os quais a tem como um fator limitante (FAO, 2011).

O escore químico isoladamente não é uma medida satisfatória da qualidade da proteína, uma vez que não considera a digestibilidade da proteína e a disponibilidade biológica dos aminoácidos. Outros indicadores, tais como valor biológico (VB), taxa de eficiência protéica (PER) e utilização da proteína líquida (NPU) são melhores preditores, mas sofrem com o fato de que eles avaliam o desempenho nutricional da proteína sob condições experimentais as quais geralmente são muito diferente de situações da dieta da vida real (FAO, 2011). A presença de fatores antinutricionas como inibidores de proteases (o inibidor Kunitz e o inibidor Bowman–Birk) e lectina reduzem o valor nutricional desta proteína, a eliminação gênica do inibidor Knutiz e lectina tem sido amplamente

estudada com o intuito de melhorar o aproveitamento desta proteína de alto valor biológico em suporte aos tratamentos tradicionais de inativação destes fatores por métodos térmicos e/ou químicos (MACHADO et al., 2008).

1.3.2 Lipídios

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo, ao caracterizar o grão de soja cru quantifica em 21,7% seu teor de óleo, e o mesmo material possui um detalhamento da composição deste óleo que pode ser caracterizado enquanto composto por 16,4% de saturados, 23,5% de monoinsaturados e 59,3% de poliinsaturados (TBCA, 2012).

Os lipídios da soja (óleo de soja bruto) são compostos tipicamente de 96% de triglicerídeos, 2% fosfolipídios, 1,6% insaponificáveis, 0,5% de ácidos graxos livres e pequenas quantidades de pigmentos carotenóides. Todavia, a composição de ácidos graxos do óleo de soja depende da variedade e condições de crescimento sendo a porção insaturada representada por mais de 80% (FAO, 2011).

Os fosfolipídios, substâncias tensoativas, estão localizados na superfície do óleo. Embora a fração de fosfolipídeos de soja contenha um número de substâncias distintas, a lecitina é o termo técnico usado para nomear a fração inteira. A lecitina é um emulsificante valioso e tem muitas utilidades em alimentos, medicamentos e indústrias. Por isso, a maior parte de fosfolipídios deve ser removida do óleo antes da refinação. Isso é feito através de um processo conhecido como degomagem (FAO, 2011).

Os tocoferóis e esteróis são os principais lipídios insaponificáveis e são parcialmente removidos no processo da desodorização. Os ácidos graxos livres e pigmentos são removidos na etapa de refino e branqueamento. Assim, suas concentrações são reduzidas no óleo refinado para menos de um por cento. O alto teor de ácido linoléico e linolênico destaca a forte tendência do óleo de soja submeter-se a deterioração oxidativa, em parte justificada pela presença de ácido linolênico. Entretanto, avançadas tecnologias estão disponíveis para superar este problema e fazer deste um óleo bom e versátil (FAO, 2011).

1.3.3 Carboidratos e Fibras

A soja contém cerca de 30% carboidratos que podem ser divididos em dois grupos: açúcares solúveis (5% sacarose, 4% estaquiose, 1% rafinose) e insolúveis, que são as "fibras" (20%) (FAO, 2011). A Tabela de Composição da USP em sua composição centesimal para grão de soja cru quantificou fibra alimentar total em 21,67% e as fracionou em insolúvel (19,40%) e solúvel (2,10%) (TBCA, 2012).

A fração insolúvel é uma mistura complexa de polissacarídeos e seus derivados. Composta principalmente por carboidratos da parede celular: celulose, hemicelulose e substâncias pécticas. Não digeridos pelas enzimas gastro-intestinais os carboidratos insolúveis podem ser caracterizados como "fibra dietética", as quais absorvem a água e incham consideravelmente. Ao contrário de outras leguminosas, a soja contém muito pouco amido (menos de 1%) (FAO, 2011).

1.3.4 Aspectos Antinutricionais

Várias proteínas da soja foram identificadas por exercer efeitos fisiológicos específicos. Entre elas estão os inibidores de tripsina e hemaglutininas (lectinas) (FAO, 2011). Proteínas inibidoras de protease são comuns na natureza, todavia o valor nutritivo da soja está limitado principalmente por estes fatores. Os mais importantes são os inibidores da tripsina (a qual pode ser descrita como uma serina protease encontrada no aparelho digestivo). Estes inibidores diminuem a retenção de nitrogênio, reduzindo seu desempenho e aumentando a excreção de nitrogênio metabólico (EL-SHEMY, 2011).

Inibidores da protease (o inibidor Kunitz e o inibidor Bowman-Birk) são ativos contra tripsina e quimotripsina. Estes inibidores interferem na digestão de proteínas, resultando em diminuição do crescimento animal. A atividade desses inibidores em produtos de soja pode ser diminuída quando são aquecidos. Este aquecimento da soja e de seus produtos elimina acima de 90% da atividade antitripsina. Os animais respondem de forma diferente a inibidores de tripsina, dependendo da espécie. Ganso e galinhas são mais sensíveis a inibidores de

tripsina do que leitões e bezerros. Estudos em novos cultivares de soja reduziram o nível de tripsina a 10mg/kg (EL-SHEMY, 2011; FAO, 2011).

No entanto, foi observado que o inibidor de tripsina foi prejudicial ao crescimento mesmo quando os animais foram alimentados com dietas contendo proteínas completamente pré-digeridas, indicando que a inibição da tripsina não é o único efeito fisiológico destes inibidores. Sua ingestão pode resultar em aumento da secreção pancreática e hipertrofia do pâncreas. O aumento da secreção de enzimas no tubo digestivo representa uma perda interna de proteína. Sendo as proteínas excretadas pelo pâncreas particularmente ricas em aminoácidos sulfurados, esta perda interna pode ser especialmente importante se a dieta é marginal em metionina/cistina (FAO, 2011).

Apesar de não haver nenhuma evidência direta quanto aos efeitos fisiológicos em humanos, tornou-se habitual tomar as precauções necessárias para a remoção ou inativação dos inibidores de tripsina em produtos de soja destinados ao consumo humano (FAO, 2011).

As lectinas (hemaglutininas) são outro tipo de proteínas que podem interferir negativamente no valor nutricional da soja, todavia estas atuam ligando-se a carboidratos. Na soja crua as hemaglutininas podem diminuir o crescimento e causar aumento de mortalidade em animais (SILVA e SILVA, 2000). Recebem esta denominação, hemaglutininas, por possuírem a capacidade de aglutinar glóbulos vermelhos, e, embora estejam amplamente distribuídas nas plantas alguns representantes deste grupo, como a ricina e lectina de mamona, são altamente tóxicas. A lectina encontrada nos grãos de soja bruto, aparentemente, não tem nenhum efeito observável na dieta, podendo ainda ser facilmente inativada pelo calor (FAO, 2011).

2 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS – OGM

2.1 Histórico

O Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2000) divulgou documento referente à Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB, realizada em junho de 1992 no Rio de Janeiro, onde postula o significado de Biotecnologia. Este termo foi então definido enquanto “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica.” Rocha (2008) definiu “Biotecnologia” como a tecnologia baseada na biologia, utilizada em destaque nos campos da agricultura, ciência dos alimentos e medicina. A Figura 1 sumariza de forma simplificada a definição de biotecnologia.

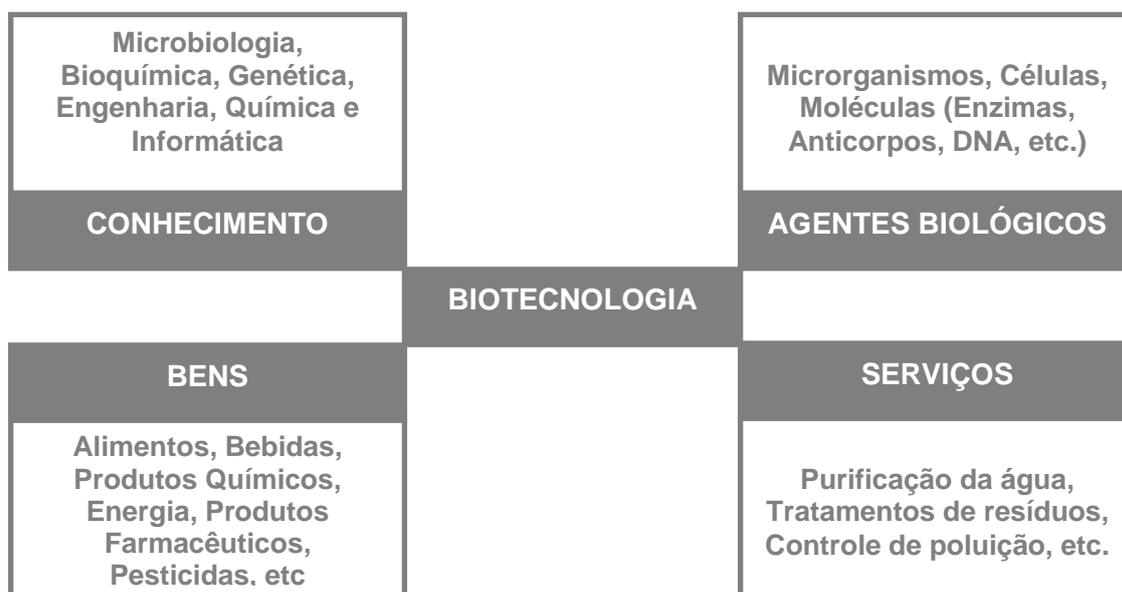


Figura 1: Quadro demonstrativo de "Biotecnologia" apresentando as interfaces desta tecnologia.

Fonte: Adaptado de ROCHA, 2008.

As culturas biotecnológicas por sua vez seriam aquelas as quais aplicaram-se conhecimentos acerca de processos biológicos e propriedades dos seres vivos

com o intuito de se resolver problemas e criar produtos de utilidade (MMA, 2000; ROCHA, 2008; LAJOLO e NUTTI, 2011).

A partir de 2010, as culturas biotecnológicas atingiram a marca de 160 milhões de hectares, um aumento de 12 milhões de hectares a uma taxa de crescimento de 8%. Observação relevante foi de que passados 15 anos de consecutivos aumentos na comercialização das culturas biotecnológicas (1996-2011) este crescimento continua notável (JAMES, 2011).

O Brasil ocupa o segundo lugar, ficando atrás apenas dos EUA, em área cultivada com biotecnologia do mundo (30,3 milhões de hectares) e está emergindo como um líder global em culturas biotecnológicas. Pelo terceiro ano consecutivo, o Brasil foi o motor de crescimento global, aumentando em 2011 sua área plantada de culturas biotecnológicas, mais do que qualquer outro país do mundo. Este aumento recorde de 4,9 milhões de hectares foi equivalente a um aumento anual impressionante de 20%. O país cresceu 19% da área global de 160 milhões de hectares e está consolidando sua posição, se aproximando de forma relevante das marcas alcançadas pelos EUA (JAMES, 2011).

O sistema de autorização brasileiro permitiu a aprovação de 8 (oito) novos eventos em 2010 e um adicional de 6 (seis) eventos em 2011. A primeira soja transgênica gerada por empilhamento “*stacked*”, tecnologia onde coexistem mais de uma modificação gênica, foi aprovada para comercialização no Brasil em 2012. Este novo produto apresenta simultaneamente as características de resistência a insetos e tolerância a herbicidas. A Embrapa, instituição do setor público brasileiro, obteve aprovação para comercializar um feijão resistente a vírus, desenvolvido inteiramente com recursos próprios, demonstrando, assim, a sua impressionante capacidade técnica para desenvolver, entregar e aprovar uma cultura biotecnológica (JAMES, 2011; MAPA, 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária, Coordenação de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados divulgou em 19/06/2012 uma listagem atualizada dos OGMs autorizados no Brasil (Anexo I), constituída de 5 eventos para soja (sendo 1 de dupla inserção), 18 para milho (sendo 13 múltiplo), 9 evento para algodão (2 duplos e 2 triplos) e 1 para feijão (MAPA, 2012). Pode-se observar o

incremento de aprovação para a inserção de múltiplos eventos, também denominado empilhamento.

2.1.1 Tecnologias de desenvolvimento

Lajolo e Nutti (2011) definem gene enquanto elementos presentes no núcleo das células e que contêm de forma codificada todas as informações necessárias à vida as quais serão transmitidas aos descendentes. A produção do organismo geneticamente modificado envolve diversas etapas, desde o isolamento do gene de interesse, passando pela proliferação do mesmo, até a inserção deste no cultivar selecionado, estes passos estão representados nas Figura 2 e 3.

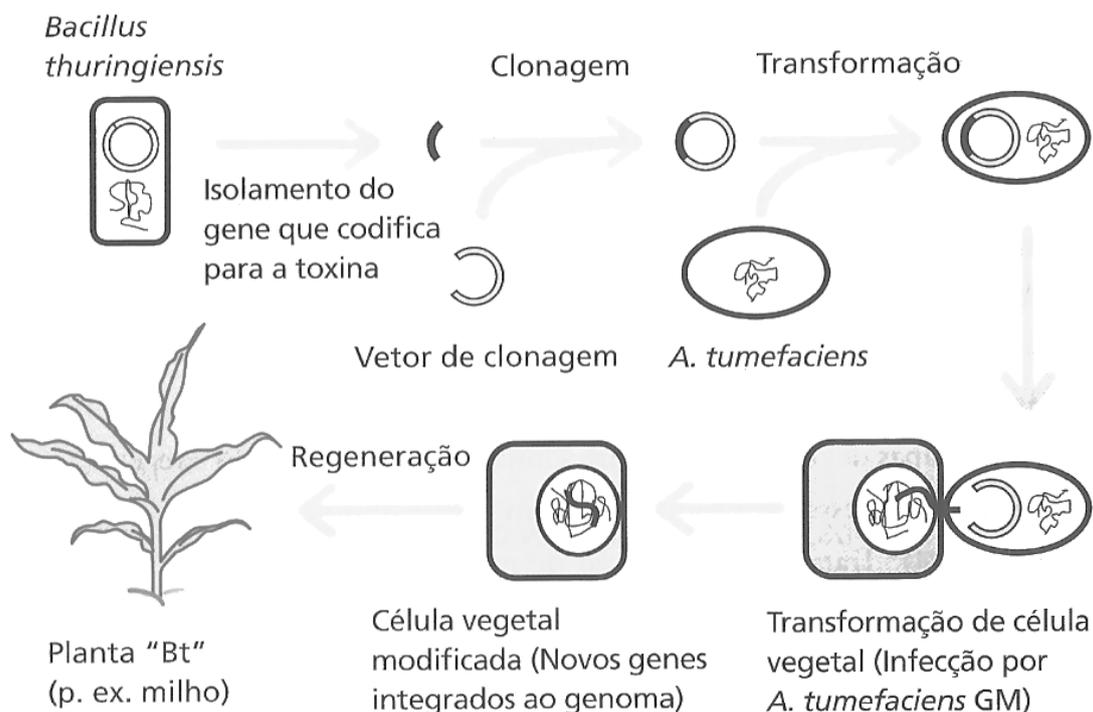


Figura 2: Esquema de Produção de Vegetal Geneticamente Modificado por meio de infecção bacteriana.

Fonte: LAJOLO e NUTTI, 2011.

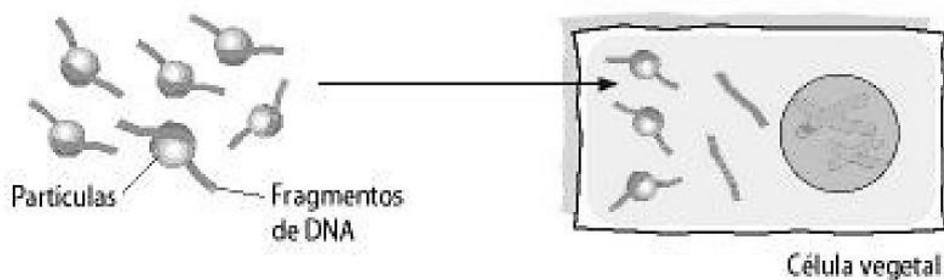


Figura 3: Esquema de Produção de Vegetal Geneticamente Modificado por meio de biobalística.

Fonte: CHARANEK, 2006.

No desenvolvimento do organismo transgênico, a inserção de um gene proveniente de outra espécie, o qual altera assim as informações presentes no núcleo celular pode ser promovida de forma diferenciada:

- por meio de infecção bacteriana: quando a inserção do gene de interesse é realizado pela bactéria na célula hospedeira (Figura 2);
- por biobalística, quando são bombardeadas em direção ao interior da célula partículas de tungstênio recobertas com o fragmento de DNA de interesse (Figura 3);
- ou por eletroporação de protoplastos: quando protoplastos são expostos a pulsos eletromagnéticos curtos e de alta voltagem (eletroporação), na presença do DNA exógeno desejado, técnica que não tem tido boa difusão pela dificuldade de posterior regeneração celular.

Uma planta transgênica seria portanto, aquela a qual por processo de DNA recombinante ou engenharia genética teve um novo gene ou fragmento de DNA inserido entre seus genes (LAJOLO e NUTTI, 2011). Para Simões (2008), o “evento” é um gene que se insere em uma determinada variedade de cultivar agrícola. Destaca-se, portanto, que a transgenia em si não cria necessariamente uma nova variedade, de modo que uma mesma variedade de um determinado produto pode apresentar mais de um evento. Tal definição

facilita o entendimento não somente dos OGMs disponíveis no mercado como também da nova geração de alimentos transgênicos que vem sendo desenvolvida, onde mais de um evento são transferidos a um mesmo organismo (empilhamento), demonstrado esquematicamente pela Figura 4.

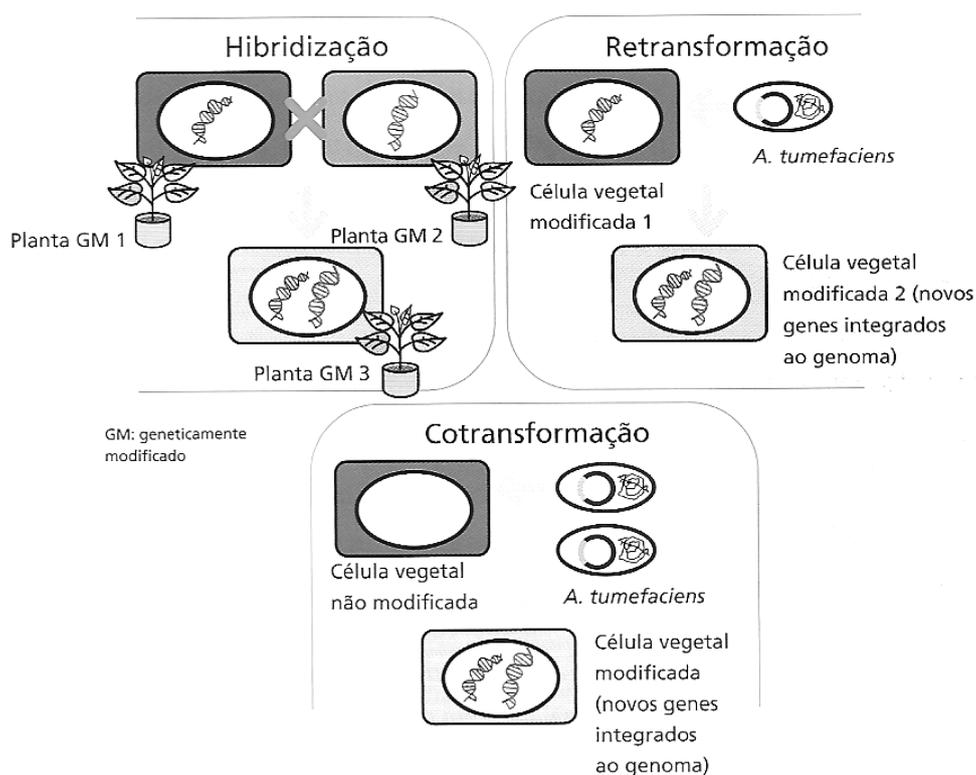


Figura 4: Introdução múltipla de transgene em célula vegetal demonstrando as etapas de hibridação, retransformação e cotransformação.

Fonte: LAJOLO e NUTTI, 2011.

2.1.2 Importância econômica e ambiental

No ano de 2011, a soja geneticamente modificada (GM) continuou a ser a principal lavoura GM, ocupando 75,4 milhões de hectares ou 47% da área GM global, seguida pelo milho (51,00 milhões de hectares a 32%), o algodão (24,7 milhões de hectares a 15%) e a canola (8,2 milhões de hectares a 5%). Em

conjunto as quatro culturas ocupam aproximadamente 99% da área global de lavouras GM. Na Tabela 4 pode ser observado de forma resumida a adoção e suas estimativa em culturas GM e soja GM global e nacional. O valor global de sementes transgênicas só nos EUA foi \$ 13,2 bilhões em 2011, com o produto final de grão comercial de milho transgênico, grão de soja e algodão no valor para EUA de aproximadamente 160 bilhões de dólares ou mais por ano. Um estudo de 2011, estimou que o custo de descoberta, desenvolvimento e autorização de uma nova cultura/característica biotecnológica nos EUA seria em torno de 135 milhões de dólares (JAMES, 2011).

Tabela 4: Adoção de OGM – Mundial e Nacional

	Culturas OGM		Soja OGM		Fonte
	Mundo	Brasil	Mundo	Brasil	
2011	160 milhões ha	30,3 milhões ha.	75,4 milhões há	ND	JAMES, 2011
2010/11	ND	23,2 milhões ha.*	ND	17,2 milhões ha.*	CÉLERES, 2010
2011/12	ND	31,8 milhões ha.*	ND	21,4 milhões ha.*	CÉLERES, 2011
2012/13	ND	36,6 milhões ha.*	ND	23,9 milhões ha.*	CÉLERES, 2012

* Estimativa de adoção do plantio de soja geneticamente modificada. ND = Não disponível

No que tange aos aspectos ambientais, dados fornecidos por empresa de consultoria ambiental privada atuante no setor agrícola evidenciam resultados sociais e ambientais benéficos obtidos em decorrência da adoção do algodão e

milho geneticamente modificados, bem como da soja tolerante a herbicida. O estudo divulgado em 2012 considerou dados da campanha agrícola 2010/11 e demonstrou nível de benefícios crescente simultaneamente a aceleração da adoção da biotecnologia por parte dos produtores. Esse estudo analisou fatores tais como: uso de água, uso de óleo diesel, emissões de gás carbônico e uso de ingrediente ativo para as culturas milho, algodão e soja (CÉLERES AMBIENTAL, 2011). Enfocando os benefícios socioambientais acerca da adoção da soja OGM no Brasil no período de 1996/97 a 2010/11, o que se observou foi a redução do consumo de 21,2 bilhões de litros de água no período de 1996/97 a 2010/11. Deste total, a redução relacionada às lavouras de soja que adotaram a biotecnologia representa 76%, tal percentual sendo justificado pela extensão da área plantada e pelo fato desta tecnologia estar disponível no mercado para comercialização há mais tempo. No que tange a redução do consumo de óleo diesel nas lavouras biotecnológicas para o mesmo período, o benefício alcançou 176,6 milhões de litros economizados. E analisando ainda a redução da emissão de CO₂ decorrente da queima do óleo diesel utilizado no maquinário agrícola, o período possibilitou a redução de 468,4 mil toneladas de CO₂. Para estes parâmetros, a soja manteve sua representatividade enquanto *commodity*. A redução no uso de ingrediente ativo observado foi também expressiva em cerca de 14,5 mil toneladas, com a respectiva redução de energia elétrica para produzir estes defensivos agrícolas. Para este parâmetro, entretanto, a participação dos cultivos de soja esteve reduzida a 54,3%. Diante da atual preocupação mundial acerca dos níveis de poluição de solos e recursos hídricos, da distribuição e qualidade da água, existem indícios da importância da biotecnologia como instrumento capaz de proporcionar benefícios na proteção dos recursos naturais e na qualidade de vida da população (CÉLERES AMBIENTAL, 2011).

2.2 Modificação gênica na soja

O Organismo Geneticamente Modificado foi definido pela Instrução Normativa nº 1, de 01 de abril de 2004, enquanto aquele organismo cujo material genético tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (BRASIL, 2004).

A soja transgênica, ou seja, que sofreu modificação genética vem sendo discutida assim como outros alimentos desta categoria quanto ao risco/benefício dessa manipulação. Todavia, para aprovação de uma determinada modificação gênica são necessários diversos testes tanto com relação aos riscos como para equivalência de composição química. Lajolo e Nutti (2011) enfatizam que quanto mais se sabe acerca de um alimento, mais abrangente são os testes efetuados para confirmar esta equivalência sobre o organismo GM e o não GM. Para a soja, os autores citam estudo de Kuiper e colaboradores do ano de 2001, onde foi testada a equivalência entre cultivares geneticamente modificados e se avaliou para a soja resistente à herbicida desde aminoácidos, ácido fítico, ácidos graxos, estaquiase e rafinose dentre outros componentes até mesmo compostos bioativos como as isoflavonas (KUIPER et al, 2001; LAJOLO e NUTTI, 2011).

Atualmente, a maioria dos OGM disponíveis em todo o mundo contém um dos três elementos genéticos: o promotor 35S oriundo do vírus mosaico couve-flor (CaMV), o terminador nopalina sintase (*nos*) ou o gene marcador de resistência à canamicina (*nptII*) (CARDARELLI, et al., 2005). Um dos eventos mais amplamente difundidos é o evento GTS-40 (RR), o qual confere às culturas resistência ao herbicida glifosfato por meio da expressão da proteína CP4-EPSPS, tendo este evento recebido aprovação regulatória na maioria dos países, tanto para a soja quanto para outras culturas, como por exemplo o milho (JAMES, 2011; LAJOLO e NUTTI, 2011).

Todavia, outras alterações genéticas para a soja vem sendo propostas e realizadas visando diferentes objetivos tais como produtividade; estabilidade, porte e ciclo adequado, resistência às doenças, resistência às nematóides, resistência ao acamamento, boa qualidade de semente e teor de óleo e proteína. No que tange às qualidades específicas objetiva-se: resistência a insetos, pragas, tolerância a herbicidas, porte em plantio antecipado, qualidade fisiológica de sementes e, ainda, melhoramento sensorial e nutricional (MOREIRA, 2011).

Cultivar é a variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas por margem mínima de

descritores, por sua denominação própria que seja homogênea e estável, quanto aos descritores através de gerações sucessivas e seja de espécie passível de uso pelo complexo agroflorestal, descrita em publicação especializada disponível e acessível ao público, bem como a linhagem componente de híbridos (BRASIL, 1997). As variabilidades regionais e por cultivar interferem não só no conteúdo, mas também nas perdas de isoflavonas durante o processamento da soja para alimentos tradicionais e produtos protéicos. O aumento da concentração destas substâncias e a redução da variedade de concentração nos diferentes cultivares pode auxiliar no alcance de níveis eficazes deste flavonóide (NEWELL-MCGLOUGHLIN, 2010; LAJOLO e NUTTI, 2011).

As isoflavonas são sintetizadas como parte da via dos fenilpropanóis que produz diversos metabólitos secundários (ligananas, flavonóis, antocianinas) (NEWELL-MCGLOUGHLIN, 2010; LAJOLO e NUTTI, 2011). Entretanto uma isoflavona sintetase (IFS) específica de leguminosas é a enzima-chave na iniciação da produção de isoflavonóides. Portanto, modificações no gene IFS podem permitir manipulação da via do fenilpropanol, visando objetivos agrônômicos e nutricionais. Ambiciona-se que a soja derivada dessa biotecnologia deva conter até quatro vezes mais isoflavona que a original. Abaixo, na Tabela 5 demonstramos diferentes modificações gênicas visando melhoramento do perfil nutricional da soja e suas características (AKASHI, AOKI e AYABE, 1999; NEWELL-MCGLOUGHLIN, 2010).

Tabela 5: Exemplo de culturas de soja geneticamente modificadas com características nutricionais modificadas, com o propósito de fornecerem benefícios à saúde dos humanos e animais domésticos

Cultura	Característica	Transgene
Soja	Melhoramento da composição de aminoácidos	Proteínas sintéticas
Soja	Aumento de aminoácidos sulfurados	Super expressão da proteína de milho
Soja	Aumento de Ácido oleico	Δ -12 desaturase (soja, supressão)
Soja	Aumento de Ácido oleico	Terminação de transcritos de RNA por ribozina down-regulate ácidos graxos da semente
Soja	Redução de alérgeno imunodominante	Silenciamento genético da cisteína proteinase P34 (34kDa)
Soja	Aumento de isoflavonas	Isoflavona sintase

Fonte: Adaptado de NEWELL-MCGLOUGHLIN, 2010.

2.3 Métodos de Quantificação

A utilização do método de PCR para detecção de modificação gênica é baseada na amplificação e detecção de um gene espécie-específico da matriz a ser analisada (gene endógeno) e da sequência de DNA referente à modificação gênica em diversas matrizes vegetais. A reação em cadeia da polimerase (PCR) amplifica a sonda marcada que indica a presença de soja geneticamente modificada conjuntamente com a sonda que indica a presença de DNA endógeno específico, no caso da soja a lecitina. Enquanto o primeiro identifica a presença de modificação gênica, gene alvo, o marcador endógeno serve como referência quantitativa para detectar geneticamente e não-geneticamente modificados (BRANQUINHO, 2010; AB, 2011).

O promotor 35S oriundo de vírus mosaico da couve-flor (CaMV) vem sendo utilizado como indicativo de modificação gênica. Este promotor integra a maioria das construções utilizadas em transformação genética de plantas e sua detecção indica a ocorrência de organismos geneticamente modificados (OGM)

no produto analisado, sendo este método, portanto, uma importante ferramenta para “*screening*” (BRANQUINHO, 2010).

Após a desnaturação do DNA ocorre anelamento e extensão e no momento da substituição da sonda ocorre clivagem desta com liberação do reagente fluoróforo (Figura 5). O monitoramento do aumento da fluorescência gerado por estas duas sondas marcadas é então plotado em curva de amplificação, na qual podem se identificar as CTs. As CTs (*Cycle Threshold*) podem se definidas enquanto o ciclo no qual a reação atinge seu limiar da fase exponencial (NOVAIS e ALVES, 2004). A quantidade de material GM é normalizada com base na quantidade de material endógeno detectado em cada amostra produzindo assim um valor Δ CT a partir do qual é feita a média para as amostras replicadas. Estes valores são então comparados com uma curva de calibração produzida a partir dos valores Δ CT dos padrões de concentração conhecidos OGM o que permite um resultado em percentual de OGM para cada amostra desconhecida a ser produzido. Para CTs acima de 40 não é necessário se calcular o Δ CT ficando definida a ausência de amplificação do gene de interesse (AB, 2011).

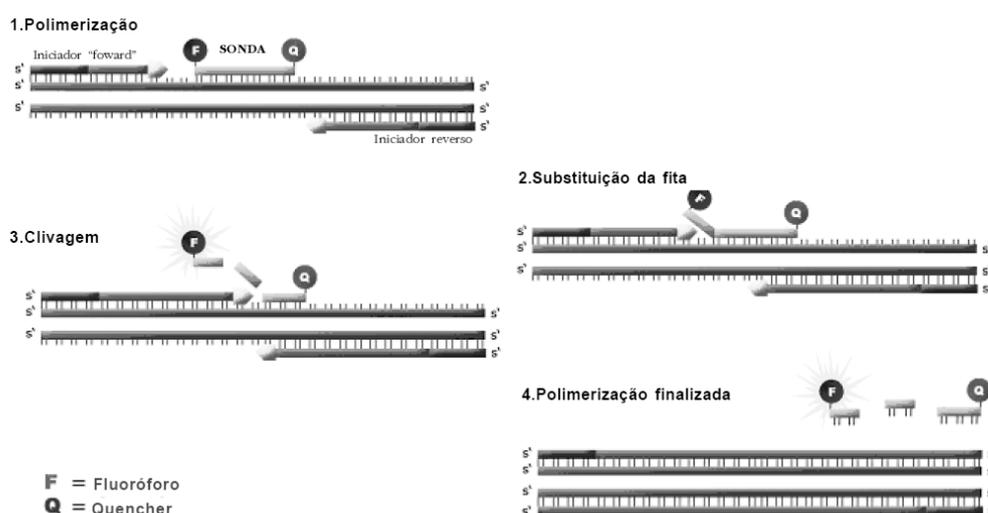


Figura 5: Reação em cadeia da polimerase. F: fluoróforo, molécula que é reconhecida pelo equipamento e visualmente demonstrada na plotagem das curvas CTs.

Fonte: Adaptada de NOVAIS e ALVES, 2004.

2.4 Rotulagem

A rotulagem, sobretudo no contexto dos alimentos transgênicos, está profundamente ligada ao consumo consciente e à liberdade do cidadão em decidir baseado em informações seguras e precisas consumir ou não determinado produto. Estudo atual destaca a relevância do Estado como promotor, pelo uso da lei da defesa do consumidor, salienta a importância da rotulagem e ressalta ainda o fato de que qualquer publicidade omissa pode ser considerada enganosa (MYSZCZUK, WANDSCHEER e GLITZ, 2010). Na avaliação de rótulos, alguns parâmetros são verificados conforme a legislação e a declaração quanto aos organismos geneticamente modificados estão legisladas por: Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003, pela Portaria nº 2.658, de 22 de dezembro de 2003, do Ministério da Justiça, e pela Instrução Normativa Interministerial nº 1, de 1º de abril de 2004 (BRASIL, 2003a,b; BRASIL, 2004).

De acordo com o Decreto Lei nº 4680 de 24 de abril de 2003, na comercialização de alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, com presença acima do limite de um por cento do produto, o consumidor deverá ser informado da natureza transgênica desse produto (BRASIL, 2003a).

Produtos embalados, vendidos a granel ou *in natura* devem conter no rótulo da embalagem ou do recipiente em que estão contidos, em destaque, no painel principal e em conjunto com o símbolo, definido pela Portaria nº 2658, de 22 de dezembro de 2003, e uma das seguintes expressões, dependendo do caso: "(nome do produto) transgênico", "contém (nome do ingrediente ou ingredientes) transgênico(s)" ou "produto produzido a partir de (nome do produto) transgênico". Segue abaixo a simbologia aprovada pelo Ministério da Justiça (Figura 6) (BRASIL, 2003a,b).

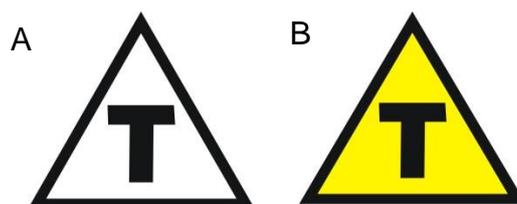


Figura 6: Símbolo indicativo de modificação genética.

Os símbolos devem ser apresentados nos rótulos conforme figura A. para rótulos impressos em preto e branco, e B. para impressão em rótulos impressos em policromia. Fonte: Brasil, 2003b

Lenzi (2010) apresenta em seu trabalho uma visão panorâmica da toda polêmica acerca da rotulagem de transgênicos, levanta a justificativa de alguns países como EUA para não rotular os alimentos OGM por sua equivalência substancial julgam discriminatória a colocação do rótulo específico e de órgãos brasileiros que defendem a importância da rotulagem não apenas como parâmetro decisório da população, mas também como instrumento de rastreabilidade destes produtos. Entre os países com legislação específica para a rotulagem, o aspecto comum seria a alegação de que os produtos GM não seriam substancialmente equivalentes às suas convencionais. Sobre este panorama é interessante notar que a Monsanto sustenta pontos de vista totalmente opostos quanto às características da soja “*Round up Ready*”. Quando se fala em segurança alimentar, para efeito de rotulagem da soja transgênica, o produto é considerado substancialmente igual a soja natural. Todavia, no momento que se fala em propriedade intelectual, o mesmo produto passa a ser considerado substancialmente diferente, justificando os pedidos de registro de patentes por ela feitos junto ao INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial (VALLE, 2000).

3 MINERAIS

3.1 Importância

Considerados macrominerais por estarem presentes no corpo em uma proporção superior a 0,05% o cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (K) e

magnésio (Mg) serão abordados aqui por sua relevância (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998). Como todo micromineral, a exemplo do ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu) e zinco (Zn) embora presentes em pequenas quantidades, possuem importância reconhecida para o funcionamento adequado do organismo vivo (CUNHA e CUNHA, 1998).

3.1.1 Saúde Humana

O cálcio é reconhecidamente importante por sua participação na formação da matriz óssea. Além do papel de formação e mesmo de manutenção de ossos e dentes, este elemento atua como regulador de inúmeros processos bioquímicos corpóreo como coagulação sanguínea, secreção de hormônios e neurotransmissão (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998; MILLER, 2010). Todavia, apenas a presença no alimento não é sinônimo de utilização sendo, portanto, necessário observar a biodisponibilidade ao se ofertar este elemento. Entre os fatores que favorecem a absorção estão a presença de vitamina D, acidez gástrica, presença de lactose e alimentação pobre em Ca. Já a presença de ácido oxálico, ácido fítico e fibras interferem negativamente na absorção do Ca. As recomendações diárias de Ca variam de 600-800 mg para adultos e crianças chegando a 1200 mg em períodos de crescimento intenso, gravidez e lactação. Em dietas convencionais, cerca de 75% desse elemento é fornecido por leite e derivados, tornando ainda mais preocupante o atendimento às necessidades desse nutriente quando os lácteos são retirados da dieta (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998). Embora a farinha de soja contenha duas vezes Ca e cinco vezes mais P que o leite de vaca ou trigo integral, a biodisponibilidade destes é questionável. Estes elementos são mais disponíveis, por exemplo, nos brotos de soja (PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

O fósforo, por sua vez, constitui aproximadamente 1% do peso corpóreo humano, estando 90% deste incorporado ao tecido ósseo e o restante atuando em funções metabólicas, sendo metade disposta no tecido muscular. Além da participação na mineralização de ossos e dentes, o P participa do metabolismo energético (ATP), absorção e metabolismo de nutrientes, regulação da atividade protéica e balanço ácido básico, síntese de DNA e RNA, síntese de fosfolípidos e sinalização celular (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998;

MILLER, 2010). A absorção deste mineral é influenciada, positivamente, pela presença de vitamina D e seu metabolismo intimamente relacionado ao do cálcio (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998). Cálcio e fósforo podem formar fosfato de cálcio que é relativamente insolúvel, o que limita a absorção intestinal (PEDROSO, 1998).

O papel dos eletrólitos é fundamental para a manutenção da vida. Sódio, cálcio, potássio e magnésio são os cátions mais importantes no líquido extracelular. Estes elementos não se encontram em mesma concentração nos compartimentos intra e extracelular, estando o sódio predominantemente extra e o potássio intracelular. Sódio e potássio são íons contrários e atuam estimulando impulsos nervosos (PEDROSO, 1998; MILLER, 2010).

O sódio possui responsabilidade especial pela manutenção do volume circulante. Participa ativamente do equilíbrio ácido básico do organismo, é fundamental para a absorção de glicose e o transporte de várias substâncias pelo intestino (PEDROSO, 1998; MILLER, 2010). O potássio por sua vez atua em funções metabólicas distintas, entre elas o transporte de oxigênio e auxílio no deslocamento de gás carbônico, redução da viscosidade plasmática e favorecimento da oxirredução da glicose, facilita a conversão de glicose em glicogênio no fígado e ainda atua efetivamente no equilíbrio ácido-básico do organismo (PEDROSO, 1998). Na soja o conteúdo por 100g destes eletrólitos é, em média, 740mg de K e 260mg de Na, o que faz com que a leguminosa seja recomendada a pacientes com hipertensão arterial por seu poder alcalinizante (PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

O magnésio (Mg) ocorre em grandes quantidades nos ossos. Este elemento atua na ativação do sistema enzimático celular promovendo a produção de energia pela conversão de ATP em ADP (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998; PEDROSO, 1998; MILLER, 2010). Participa ainda das reações bioquímicas e ósseas pela ativação da fosfatase alcalina (enzima catalisadora). Compostos de magnésio exercem ainda um efetivo efeito laxativo. Por ser inicialmente difícil de serem absorvidos, estes compostos exercem efeito osmótico trazendo água ao lúmen, amolecendo as fezes e favorecendo o peristaltismo. Importante no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídeos e

ácidos nucleicos, atua de maneira antagonista ao cálcio. Sua absorção é reduzida na presença de cálcio, álcool, fosfato, fitatos e gorduras, e é estimulada pela presença de vitamina D (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998; PEDROSO, 1998).

O Ferro (Fe) é um elemento químico metálico. O organismo sabiamente dificulta a sua absorção, uma vez que este mineral existe em abundância na crosta terrestre. Evita-se, assim, uma intoxicação celular. Todavia, o Fe é de relevante importância orgânica por exercer função estrutural como elemento do grupo heme da hemoglobina, auxiliando, portanto, no transporte de oxigênio (CUNHA e CUNHA, 1998; MILLER, 2010). Este mineral está ainda envolvido no metabolismo, destruição de peróxido de hidrogênio e síntese de DNA (MILLER, 2010). Os principais compartimentos de ferro no homem sadio são a hemoglobina 67%, seguido das reservas 27% de ferro tecidual (mioglobina e enzimas 3,5 e 0,2% respectivamente). O Fe encontra-se ligado a mioglobina ou ainda armazenado na forma inativa no fígado, baço, medula óssea ou circulação sanguínea. Geralmente está disponível no alimento ligado a moléculas orgânicas e inorgânicas. Este mineral quando ingerido na forma metálica é reduzido, pela acidez gástrica e enzimas hidrolíticas do intestino, à forma ferrosa (Fe^{2+}) que é prontamente absorvida no duodeno. Embora possa ser absorvido em qualquer nível do intestino delgado esta é mais eficiente no duodeno. A absorção do ferro não heme pode ser favorecida, por exemplo, pela presença de ácido ascórbico (FAIRBANKS, 2003). Entre os vegetarianos, a soja é comumente utilizada como substituto da carne, a qual seria a principal fonte de ferro na dieta de onívoros, portanto faz-se relevante seu conteúdo. Na soja, como em todo vegetal, esse elemento não ocorre na forma heme o que torna sua biodisponibilidade vulnerável à composição da refeição (PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

O cobre (Cu) é um elemento essencial para um bom funcionamento da defesa imunológica devido as suas ações bioquímicas participando ainda da maturação de leucócitos e hemácias, transporte de ferro, metabolismo da glicose e do colesterol, contração miocárdica e desenvolvimento cerebral além da formação e resistência óssea, e crescimento e desenvolvimento das crianças. O controle da absorção intestinal é responsável pela eficiente

regulação da homeostase corporal do cobre evitando, assim, um acúmulo prejudicial (CUNHA e CUNHA, 1998).

Presente no corpo humano concentrado principalmente na musculatura esquelética, ossos, pele e fígado, o zinco (Zn) é essencial para as células vivas atuando em funções estruturais, enzimáticas e regulatórias (CUNHA e CUNHA, 1998). É considerado importante cofator de metaloenzimas e atua também na regulação da expressão gênica (MILLER, 2010). O fitato pode diminuir consideravelmente a absorção do zinco proveniente da soja quando esta é a principal fonte de proteína da dieta tanto animal quanto humana (PEREIRA e OLIVEIRA, 2004).

3.1.2 Cultivo

Existem vários elementos essenciais ao crescimento e metabolismo das plantas. Esses podem ser divididos entre os compostos orgânicos: carbono, nitrogênio e oxigênio; os macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre, e os micronutrientes, boro, cobre, ferro, manganês, zinco, molibdênio e cloro. O monóxido de carbono (CO_2) e o oxigênio (O_2), necessários aos processos de fotossíntese e respiração, são obtidos do ar. O hidrogênio, assim como parte do oxigênio, é retirado da água e os outros elementos são encontrados no solo sob diversas formas (FAQUIN, 2005; ALBUQUERQUE, 2011).

Os nutrientes minerais são aqui também classificados em macro e micro, de acordo com a concentração encontrada em seus tecidos. Os nutrientes minerais, tais como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre, que são exigidos em grandes quantidades pelas plantas, são denominados macronutrientes; e os que são exigidos em pequenas quantidades: boro, cloro, molibdênio, cobre, ferro, manganês e zinco, são chamados de micronutrientes (ALBUQUERQUE, 2011). Os macronutrientes têm, em geral, seus teores expressos em porcentagem (%) e os micronutrientes em partes por milhão (ppm), todos na forma elementar. Os macronutrientes ocorrem em concentrações de 10 a 5.000 vezes superior à dos micronutrientes (FAQUIN, 2005).

A soja é uma cultura muito exigente em todos os macronutrientes essenciais. Destes, o N (nitrogênio) é constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas, além de ter como função ativar enzimas. Na deficiência de N ocorrem baixos teores de proteínas nos grãos (SFREDO, 2008). O P na forma de íon fosfato possui uma estrutura trivalente que confere a capacidade de realizar duas ligações estáveis e ainda ser ionizado, sendo insubstituível nas mais diversas funções celulares, nos componentes genéticos (DNA e RNA) e dos fosfolípidos que compõem as membranas celulares (DEON, 2007). O K mantém o potencial osmótico e participa do processo de abertura e fechamento dos estômatos, regulando a transpiração e a entrada de CO₂, regulando a fotossíntese (SFREDO, 2008), é ativador de um grande número de enzimas e atua no transporte transmembrana (DEON, 2007). O Ca é o responsável por manter a integridade funcional da membrana celular, além de estar envolvido com mecanismos enzimáticos (SFREDO, 2008). O Mg é o elemento central na molécula de clorofila e age como ativador enzimático (EKER, et al. 2006). E o S é componente de enzimas e proteínas e participa do metabolismo dos carboidratos e dos lipídios, através da formação de tioésteres. A deficiência de enxofre no cultivo da soja provoca diminuição na fotossíntese e na atividade respiratória, queda na síntese de proteínas, com o aparecimento de altas relações N solúvel/N protéico e redução no teor de gorduras (SFREDO, 2008).

No que tange a microminerais, o Cl é transportador de elétrons, reduzindo oxidantes durante a fase luminosa da fotossíntese; o Mn atua como ativador de muitas enzimas, como descarboxilases, hidrolases e transferidoras de grupos (fosfoquinases e fosfotransferase); o B desempenha papel importante no transporte e no metabolismo de carboidratos no interior da planta, sendo necessário para a elongação e para a divisão da célula e na síntese do RNA; o Cu atua como ativador de enzimas que participam do transporte eletrônico terminal da respiração e da fotossíntese; o Zn é cofator de várias enzimas como triptofano, desidrogenase (alcoólica, glutâmica e láctica), aldolases e anidrase carbônica; o Fe também atua como cofator de várias enzimas como a catalase, a peroxidase, a aconitase, a nitrogenase, os citocromos a, b e c, a leghemoglobina, a ferredoxinase, as redutases do nitrito e do sulfito; e o Mo faz parte da nitrogenase, enzima necessária para a fixação simbiótica do N₂, além

de atuar como cofator em outras enzimas relacionadas com o transporte de elétrons durante as reações bioquímicas (SFREDO, 2008).

Com o desenvolvimento da soja geneticamente modificada, resistente ao glifosato (N-(fosfometil) glicina), tem-se observado aumento considerável na utilização desse herbicida aplicado, aplicando-se de três a quatro vezes durante o ciclo da soja. Essas sucessivas aplicações de um único produto interferem negativamente na nutrição da planta (SERRA et al., 2011). Depois da absorção de glifosato na planta, a absorção e transporte de micronutrientes catiônicos pode ser limitada devido à formação de complexos metálicos pouco solúveis dentro dos tecidos vegetais (EKER et al., 2006). A aplicação de até 12,5% da quantidade recomendada de glifosato adversamente afeta a assimilação de nitrato e fixação do nitrogênio na soja (BELLALLOUI et al., 2006). A aplicação de glifosato decresce as quantidades de micronutrientes absorvidas pela planta, especialmente de Mn e Fe (BOTT et al., 2008).

Charanek (2006) realizou uma investigação da composição total dos nutrientes presentes em duas amostras de soja transgênicas e uma convencional provenientes de diferentes regiões do Brasil, sendo que as amostras transgênicas apresentaram maiores teores de Na (1328 ± 115 e $1213 \pm 80 \mu\text{g/g}$ versus $334 \pm 70 \mu\text{g/g}$) e menor teor de Al ($5,43 \pm 0,49$ e $2,23 \pm 0,18$ versus $7,30 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$) em comparação com a amostra convencional.

Cakmak et al. (2009) estudaram o efeito da aplicação de glifosato no crescimento da planta e na concentração de nutrientes minerais nas folhas e sementes de soja transgênica e convencional. Nas folhas, o glifosato aumentou as concentrações de P e Cu e reduziu as concentrações de Ca, Mn e Mg. Já nas sementes, o herbicida reduziu as concentrações de Mg, Ca, Fe e Mn.

Serra et al. (2011) avaliaram a influência do glifosato na eficiência nutricional de N, Mn, Cu, Zn e Fe pela soja transgênica cultivar 'P98R31 RR'. A aplicação de glifosato interferiu de forma negativa na eficiência nutricional da planta e nos teores totais de N, Mn, Cu, Zn e Fe. A utilização de glifosato causou redução ao número de nódulos e redução na produção de massa seca numa relação dose dependente.

Zobiolo et al. (2010) realizaram um estudo sobre a influência do glifosato com seis cultivares de soja transgênica em diferentes tempos de maturação e tipos de solos. Todos os macronutrientes com exceção do nitrogênio tiveram suas concentrações reduzidas no cultivar jovem (BRS 242 GR) com a aplicação do herbicida. Foram encontradas concentrações de macronutrientes maiores na soja isogênica que na soja transgênica, mesmo com a aplicação do glifosato. Nas amostras de maturidade média, houve redução dos teores de N, Zn e Mn e nos cultivares maduros houve decréscimo dos teores de Mn e K com a aplicação do glifosato.

3.2 Minerais na soja

Toda planta para seu adequado desenvolvimento necessita captar água e nutrientes minerais essenciais do solo. Esses elementos são então capturados pelas raízes da planta e transportados para os distintos tecidos do vegetal. A genética bem como a fertilidade do solo e o ambiente em que a planta se desenvolve irão definir a distribuição destes nutrientes nas partes comestíveis da planta (MILLER, 2010).

O conteúdo mineral da soja, determinado como cinzas, representa cerca de cinco por cento da massa total do grão. Todavia, quando a soja é processada poucos minerais são extraídos com o óleo indicando a proteína da soja remanescente da extração se mantém como boa fonte destes elementos. Os principais minerais constituintes são o cálcio, potássio e magnésio, entretanto, oligoelementos de importância nutricional, tais como ferro, zinco, cobre também são constituintes embora em menores proporções (FAO, 2011).

Em estudo com nove cultivares Rani e colaboradores obtiveram em teores (mg/100 g com base na matéria seca) de cálcio ($247,6 \pm 7,30$); fósforo ($7,61 \pm 0,31$); ferro ($9,55 \pm 0,92$) e zinco ($505,7 \pm 6,67$) (média/desvio-padrão). Para estas análises as amostras foram digeridas em mistura diácido ($\text{HNO}_3/\text{HCl}_4$, 5/1, v/v). Cálcio, ferro e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, enquanto que o fósforo foi determinado colorimetricamente. Quando comparamos os conteúdos de minerais em derivados de soja disponíveis na tabela TACO (TACO, 2006) com os resultados obtidos por Rani

(2008) podemos observar o quão variável podem ser estes conteúdos (RANI et al, 2008) (Tabela 6).

Tabela 6: Conteúdo de minerais em soja em grão e produtos a base de soja

Produto	Minerais (mg/100g)								
	Ca	Fe	Mg	Mn	P	Na	K	Cu	Zn
Soja em grão*	248	9,6	ND	ND	506	ND	ND	ND	7,6
Soja em grão**	232	16,5	232	2,41	473	11	1717	ND	ND
Farinha de soja	206	13,1	242	2,87	539	6	1922	1,29	4,5
Extrato de soja, fluído.	17	0,4	15	0,15	53	57	121	0,08	0,3
Extrato de soja em pó solúvel	359	7,0	216	2,68	647	83	1607	1,19	5,8
Queijo de soja (tofu)	81	1,4	38	0,33	130	1	182	0,18	0,9

Ca: cálcio; Fe: ferro; Mg: magnésio; P:fósforo; Na: sódio; K:potássio; Cu: cobre e Zn: zinco.
Fonte: Adaptada de: VIEIRA, CABRAL E PAULA**, 1999; TACO, 2006; RANI et al., 2008*

3.3 Método de quantificação

Os métodos usados nas análise de minerais, em sua grande maioria, são adaptados daqueles descritos na literatura nacional e internacional. Ao longo dos anos, vários métodos são implementados visando à melhor adaptação às nossas condições de rotina, sem, no entanto, alterar-lhes os princípios. Nesta revisão, apenas abordaremos a Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente.

Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente - ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) também é conhecida como ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy). Embora existam outros procedimentos para a quantificação de minerais, esta metodologia analítica obteve destaque por possibilitar a determinação multielementares em diversos tipos de amostras, o que garantiu a sua utilização em laboratórios de química analítica de rotina para as mais diversas aplicações. A distinção se faz pela leitura de cada elemento em comprimentos de onda específicos e característicos dos elementos

investigados. O método é capaz de determinar elementos em baixas concentrações, por exemplo na análise de extrato vegetal, conhecendo-se que são maiores os teores de Ca, Mg, P, S e K do que de Cu, Zn, Mn, Fe as condições experimentais são otimizadas para detectar os elementos que se encontram em menores concentrações (GINÉ-ROSIAS, 1998).

Na Espectrometria de Emissão Óptica, a amostra é submetida a temperaturas muito altas para causar, não somente a dissociação dos átomos, mas também significativa quantidade de excitação por colisão (e ionização) dos átomos presentes na amostra. Uma vez que os átomos ou íons estão em seus estados excitados, eles podem decair para estados de menor energia através da transição de energia térmica ou radioativa (emissão). A intensidade de luz emitida em comprimentos de onda específicos é medida e usada para determinar a concentração dos elementos de interesse, possibilitando adequação a baixos limites de detecção para os elementos-traços (GINÉ-ROSIAS, 1998).

4 ISOFLAVONAS

4.1 Histórico

As isoflavonas são metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos bioflavonóides, sintetizados quase que exclusivamente por plantas da família *Leguminaceae*. Essas substâncias estão presentes em grandes quantidades na soja, grão de bico, feijão e outros legumes (DEVI et al., 2008) e são conhecidas por suas inúmeras ações químicas bem como atividade antioxidante e anticancerígena (KIM et al., 2005). Já, nas plantas, funcionam como fitoalexinas conferindo-lhes resistência a patógenos (KOGAN, 1986).

A estrutura química das isoflavonas (Figura 7) apresenta um núcleo flavona, composto por dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel heterocíclico (C). A posição do anel benzênico B é a base para a categorização da classe flavonóide (posição 2) e a classe isoflavonóide (posição 3) (ROSTAGNO et al., 2009).

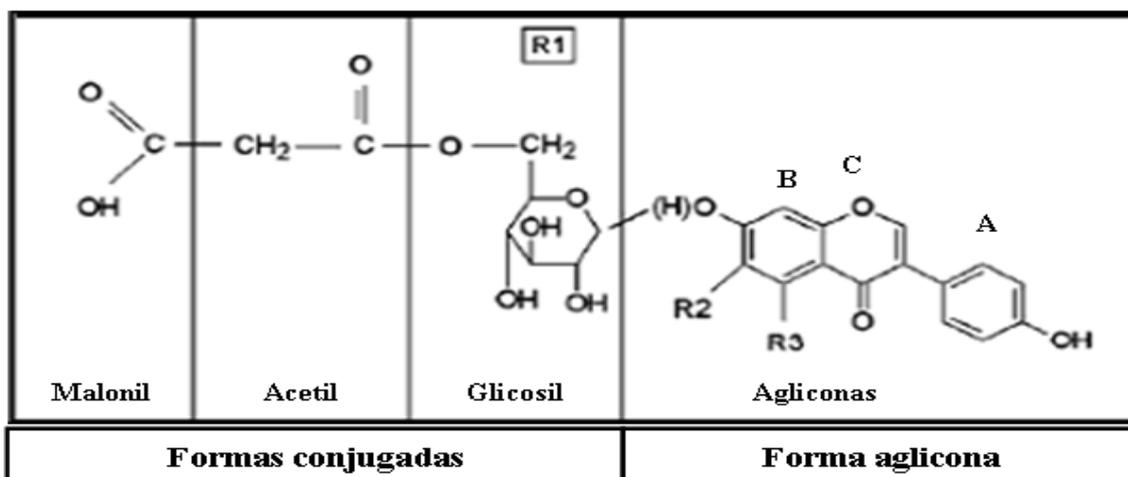


Figura 7: Estrutura química das isoflavonas.

A e B: anéis benzênicos, C: anel heterocíclico. Fonte: ROSTAGNO et al., 2009.

Isoflavonas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides onde os diferentes radicais ligados a esses anéis dão origem às 12 diferentes formas de isoflavonas, divididas em quatro grupos: os glicosídeos, as formas malonil, as formas acetil, e as agliconas (MANDARINO et al., 2006). Portanto, estão presentes na soja em quatro formas químicas, sendo que cada uma apresenta-se em três classes: genisteína, daidzeína, e gliciteína (Figura 8). É ainda relevante observar que as diferenças na estrutura química das isoflavonas podem influenciar na sua atividade biológica, na sua biodisponibilidade e nos seus efeitos fisiológicos (BENEDETTI, 2010).

As isoflavonas estão presentes em algumas leguminosas, entretanto a soja se destaca enquanto principal fonte deste composto. Existem diferentes estudos que quantificaram isoflavonas em diferentes fontes alimentares, estes estão especificados na Tabela 7.

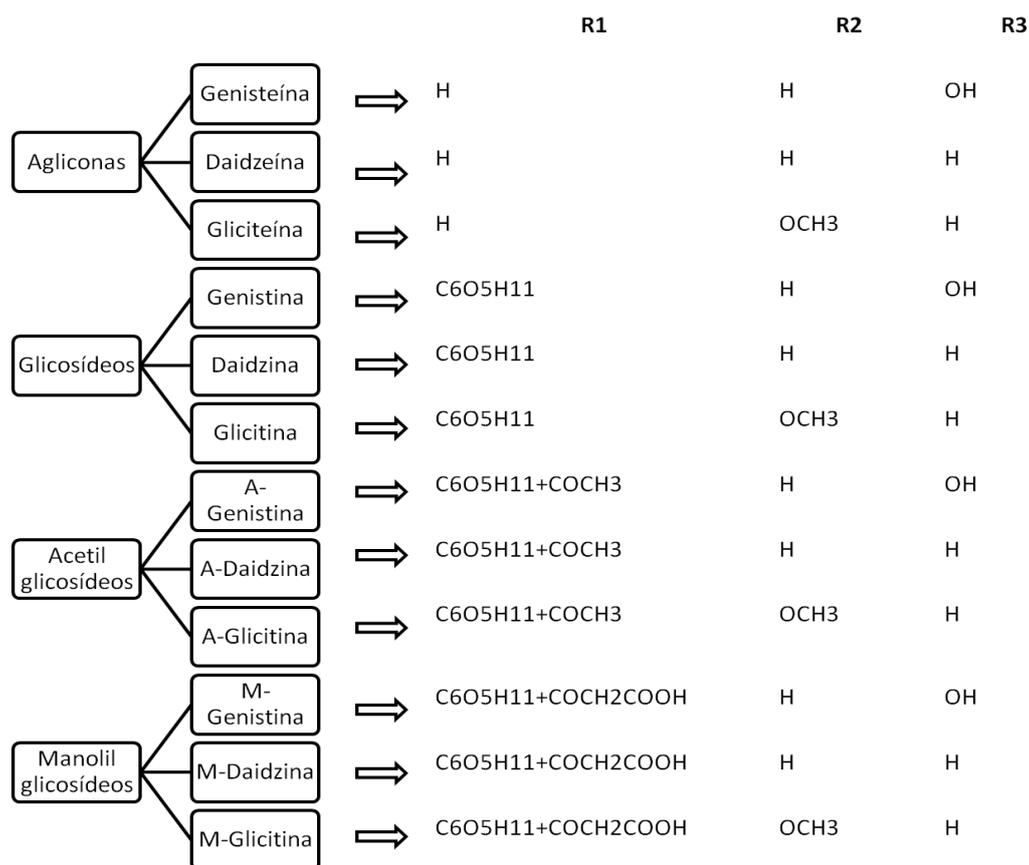


Figura 8: Classificação e estrutura química das isoflavonas.

Adaptado de: KAO, CHIEN e CHEN, 2008.

Tabela 7: Valores comparativos de isoflavonas em diversos alimentos

Fontes	Daidzeína	Genisteína	Iso Totais	Referências
			(µg/g)	
Soja	560,0	841,0	1401,0	MAZUR et al., 1998
Feijão	0,9	5,2	6,1	MAZUR et al., 1998
Milho	0,95	1,42	2,37	LIGGINS et al., 2002
Groselhas	0,4	1,7	2,1	LIGGINS et al., 2000a
Passas	0,5	1,2	1,7	LIGGINS et al., 2000a
Cevada	0,0	0,86	0,86	LIGGINS et al., 2002
Trigo	0,0	0,38	0,38	LIGGINS et al., 2002
Castanha	0,1	-	0,1	LIGGINS et al., 2002

*IsoTotais: Isoflavonas totais

Os benefícios da soja e de seus derivados têm sido reconhecidos nos últimos anos. E sugere-se que a genisteína seja a principal substância nutracêutica da soja. Reconhecida como fitoestrogênio este biocomposto inibe a atividade estrogênica exibindo uma função anti-estrogênica. Com estruturas semelhantes ao estrogênio, os fitoestrógenos se ligam por competição aos receptores do hormônio, provocando modificação na produção de proteínas específicas no interior das células. Ao se ligarem aos sítios regulatórios do DNA, estas proteínas alteram a produção de outras proteínas aumentando ou diminuindo a expressão dos genes (HO, RAFI e GHAI, 2010).

Quando pensamos em soja, é interessante observar que a semente varia a forma de quase esférico para alongado e achatado e as variedades industrial cultivadas para extração de óleo são quase esféricas, enquanto as variedades alongados são aqueles usados como vegetal. A cor seria outro aspecto visual da semente que pode variar consideravelmente podendo ser amarela, verde, marrom ou preto. As variedades industriais, de forma geral, são a marelada e a presença de sementes de outras cores em um lote é considerada um defeito. O tamanho da semente é expresso enquanto número de sementes por unidade de volume ou peso. Sojas industriais pesam 18-20 gramas por 100 grãos (FAO, 2011).

Estruturalmente, por se tratar de uma dicotiledônea, a semente se divide em tegumento (casca) e dois cotilédones, além de duas estruturas adicionais de menor peso como o hipocótilo e plúmula. Os cotilédones representam 90% do peso de sementes e contém praticamente todo o óleo e proteína. O exame microscópico dessas células revela a presença de corpos de proteína e corpos lipídicos que constituem corpos de armazenamento de proteínas e óleo, respectivamente. Corpos de proteína medem em média 10 microns, enquanto os corpos lipídicos têm, tipicamente, 0,2 a 0,5 microns em diâmetro (FAO, 2011).

A casca, que responde por cerca de 8% do peso da semente, mantém os dois cotilédones juntos e fornece uma camada de proteção efetiva. Ela pode ser removida da semente por abrasão seguido por aspiração, como no processo de descascamento mecânico antes da extração com solvente (FAO, 2011).

Eldridge e Kwolek (1983) analisaram isoflavonas na casca, hipocótilo, e cotilédones de soja, previamente descascada e separados manualmente em suas peças anatômicas. A concentração de isoflavonas foi maior no hipocótilo (1400-1750 mg/100 g) e menor na casca (10-20 mg/100 g). Os dados mostram que o hipocótilo contém aproximadamente 1,5% de isoflavona. A presença tão elevada no hipocótilo é intrigante. Os cotilédones, por outro lado, tem cerca de 20% da quantidade de isoflavonas totais e aglicona encontrados no hipocótilo. As distribuições de isoflavonas individuais também são diferentes no hipocótilo e cotilédones. No hipocótilo, basicamente dois glicosídeos são encontrados, daidzeína e glicitina 7- β -glucosídeo, enquanto nos cotilédones, há cerca de 20 vezes mais genistina que no hipocótilo.

4.2 Atividades

4.2.1 Absorção, Metabolismo e Excreção

Os fitoestrogênios comuns na dieta, isoflavonas e lignanas, mostram padrões similares do metabolismo em animais e humanos. Absorvidas facilmente no intestino delgado superior por difusão passiva, as isoflavonas agliconas (Figura 9a) atingem seu pico no sangue dentro de uma hora após serem ingeridas. Em contraste, os β -glicosídeos (Figura 9b) não são absorvidos passivamente, no entanto, eles são facilmente hidrolisado por β -glicosidases, a partir de bactérias intestinais ou uma enzima da mucosa intestinal. Portanto, no intestino grosso, onde as concentrações de micro-organismos são muito mais elevados e o ambiente mais anaeróbio, não só a hidrólise ocorre, mas também modificações redutivas ao anel heterocíclico produzindo dihidrodaidzeína, O-desmetilangolensina (O-DMA) e equol (7,4'-dihidroxiisoflavona). Ao contrário de daidzeína e genisteína, os metabólitos reduzidos por bactérias contêm um átomo de carbono quiral. No caso de equol, é o S-isômero. O que é relevante uma vez que o R-isômero é 30 vezes mais fraco em sua afinidade para receptor de β -estrogênio. As agliconas, uma vez que entram na célula intestinal são convertidos para seus β -glucoronídeos. Estes metabólitos são excretados na bile e são desconjugados na parte inferior do intestino o que lhes permitem ser reabsorvido, criando uma entero-circulação (HURST, 2002; BARNES, 2010).



Figura 9: Isoflavona aglicona e β -glicosídeos

A figura a. representa a isoflavona aglicona genisteína e b. a isoflavona genistina (β -glicosídeos da isoflavona genisteína)

4.2.2 Mecanismos de Ação

A ligação das isoflavonas a receptores de estrógeno dos mamíferos é conhecida há mais de 40 anos. No entanto, em comparação com estrógenos fisiológicos, tais como 17-beta-estradiol, as isoflavonas têm afinidade de aproximadamente 100 vezes mais fraca o que justificaria sua ação controversa estrógeno / anti-estrógeno (estruturalmente similar competem com 17 β -estradiol por seus sítios de ligação). Isto é em parte compensada pela maior concentração de isoflavonas disponível. A principal diferença entre os estrogênios endógenos e da dieta é que, os hormônios são disponibilizados diretamente na forma não conjugada, ou seja, biologicamente ativa, enquanto os estrógenos alimentares são quase inteiramente conjugados, mesmo no sangue portal, logo após a sua absorção pelo intestino. As concentrações de isoflavonas não conjugada são apenas 1-5% do total de isoflavonas no sangue. Um problema semelhante ocorre para o estradiol administrado por via oral, ele tem pouco ou nenhum efeito biológico, exceto em doses elevadas. Foi feita a substituição do hidrogênio da posição 17 por um resíduo acetilênico (formando etinilestradiol) buscando assim evitar seu metabolismo. e este esteróide modificado é o componente estrogênico de muitos contraceptivos orais (BARNES, 2010). Os fitoestrogênios são compostos naturais mais fracos do que os estrogênios endógenos, e embora estudos indiquem que essas substâncias possam se acoplar aos receptores de estrógenos, eles podem

funcionar como agonistas ou antagonistas no sistema endócrinos devido à essa funcionalidade reduzida (BIRKETT e LESTER, 2003).

Particularmente, a genisteína foi descoberta em meados da década de 1980. Os investigadores estavam à procura de inibidores de tirosina quinases de proteína (PTK). Foi quando um grupo japonês cresceu micro-organismos em cultura de células e testaram os meios de comunicação para a atividade PTK. Atividade inibitória foi detectada e no ano seguinte a substância responsável foi identificada como genisteína (BARNES, 2010).

Genisteína, enquanto polifenol, possui também propriedades antioxidantes e pode diminuir a taxa de peroxidação lipídica reagindo com radicais lipídicos (DORNAS, et al., 2007; TAVARES et al., 2007; BARNES, 2010). Além do receptor de estrogênio, a genisteína e outras isoflavonas também podem interagir com os PPARs (receptores ativados de proliferação de peroxissomos). Estes, por sua vez, são receptores nucleares que são ativados por ácidos graxos e prostaglandinas (PPAR γ) e servem como fatores de transcrição. Genisteína inibe ainda o fator de necrose tumoral (TNF), uma estimulação da adesão de monócitos na parede vascular, por regulação de PPAR γ . A daidzeína é menos ativa do que a genisteína (TAVARES et al., 2007; BARNES, 2010).

4.2.3 Principais Funções Fisiológicas

As isoflavonas são compostos bioativos que têm sido associados a benefícios à saúde humana. Consideradas fitoestrogênio, produto natural das plantas que tem destaque por possuir estrutura semelhante a estrógenos e por isso efeitos estrogênicos, as isoflavonas são muito utilizadas e tem despertado grande interesse devido à sua capacidade potencial para reduzir os sintomas associados a menopausa. Estes compostos são considerados como eficazes no auxílio a prevenção de patologias crônicas, como osteoporose, doenças cardiovasculares, danos oxidativos e cânceres relacionados a hormônios, e, embora ainda não esteja completamente elucidada, a pequena atividade estrogênica pode ser responsável por propiciar estes benefícios à saúde (CÉSAR et al., 2008; NEWELL-MCGLOUGHLIN, 2010; KUROSU, 2011).

Balk e colaboradores (2005) em estudos envolvendo mulheres pós-menopausa e peri-menopausa observaram a redução das ondas de calor relacionadas ao consumo de soja. Todavia, o autor ressalta que a necessidade de comprovação dos benefícios a longo prazo permanecem, uma vez que a duração dos ensaios variaram entre 3 e 4 meses. Outro fator é que embora visados como uma alternativa para a terapia no tratamento de sintomas pós-menopausa, os fitoestrógenos de soja têm sido condenados por seu efeito estrogênico. O motivo aparente é o risco potencial de promoção a recorrência do tumor quando utilizado por sobreviventes do câncer de mama.

Wood e colaboradores (2006) em estudo com modelos primatas pós-menopausa buscaram avaliar os efeitos a curto prazo da alta dose de suplementos contendo isoflavonoídes de soja em tecidos reprodutivos. Foram administrados bioativos nas formas aglicona isolada, excluindo assim os potenciais efeitos dos outros componentes da soja. Os efeitos estrogênicos notados foram: ligeiro aumento na proliferação do estroma e aumento em dois genes estrogênio-driven nos úteros do grupo isoflavona; a histologia uterina e da glândula mamária, morfometria e proliferação epitelial permaneceram inalterados para ambos os tratamentos (isoflavonas e equol - metabólito da daidzeína). Estes resultados sugerem que a exposição a níveis semelhantes de isoflavonas de soja teria o mínimo de efeitos estrogênicos em tecidos reprodutivos humanos e provavelmente não contribui para o aumento do risco de câncer de útero ou de mama.

Dados publicados por BU e colaboradores (2005) demonstram, por estudo in vivo com fêmeas de roedores OVX (ovarectomizados), que o consumo de isoflavonas de soja aumenta o metabolismo, reconhecido pela diminuição significativa do peso corporal, redução da deposição de tecido adiposo e os níveis de leptina. A exposição à dieta contendo isoflavonas da soja reduziu significativamente o peso de tecido adiposo branco e marrom em ratas OVX.

Newell-McGloughlin (2010) cita ainda enquanto eminente benefício do consumo de isoflavonas a assistência na prevenção de oxidação aterogênica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Balk e colaboradores (2005), avaliando um conjunto de estudos, observaram que maioria destes analisou os

efeitos da soja em pressão arterial, LDL, e densidade mineral óssea, e têm descoberto correlações significativas entre estas alterações e desfechos clínicos. De forma global, achados demonstram um pequeno efeito da soja sobre os lipídios quando correlacionados os parâmetros cardiovasculares. No entanto, a duração desses estudos foram, em sua maioria curta, não sendo certo que estes resultados sejam sustentados. Ainda estudos de metanálise, controlados sobre o efeito das dietas à base de soja, usando como controle dietas a base de proteínas animais, demonstraram a diminuição significativa dos lipídios sanguíneos, sobretudo nos casos com níveis sanguíneos do colesterol elevados (ANDERSON e WOLF.,1995).

A estrogenicidade não é o único mecanismo pelo qual as isoflavonas podem apresentar bioatividade, elas atuam ainda inibindo tirosina quinases, possuem atividade antioxidante, se ligam e ativam reguladores proliferadores de peroxissomo alfa e gama (PPAR), inibem enzimas na biossíntese de esteróides, influenciam fortemente a função das células natural killer e ativação de células T, além de inibir a metástase. Estas várias propriedades podem explicar a incidência muito menor de câncer de mama hormônios-dependentes em populações asiáticas comparadas com as americanas e européias (BARNES, 2010).

Vantighem e colaboradores (2005) utilizaram camundongos atímicos (portadores de deficiências imunológicas adquiridas geneticamente) ovariectomizados, com a finalidade de abordar a questão de como as isoflavonas influenciam no crescimento celular do câncer de mama, questão de grande interesse. Neste modelo, ao adicionar genisteína à dieta provocou-se o crescimento de receptores positivo a estrogênio em células humanas, enquanto para a daidzeína e seu metabólito S-equol não se observou esse efeito. Todavia, na tentativa de compreender o papel da genisteína na fase clínica do câncer de mama, é importante considerar a metástase. Clinicamente é a metástase que ameaça a vida e não a presença do tumor primário na mama. Embora a genisteína não tenha tido efeito sobre o tamanho do tumor, ela reduziu o número de células de tumor no pulmão em 95%. O que poderia explicar por que a incidência de câncer de mama em mulheres asiáticas dificilmente se altera, uma vez que alcançam a menopausa, ao contrário do

que ocorre em mulheres americanas ou europeias. Isso pode ser explicado pelo consumo de soja associado à dieta.

Li e seus colaboradores (2011) evidenciaram a possibilidade da utilização de isoflavonas sozinhas ou em conjunto com as terapêuticas convencionais na prevenção da progressão de tumor em tratamento em humanos. Essa sugestão é baseada em evidências de que as isoflavonas exercem efeitos pleiotrópicos sobre células cancerígenas por meio da segmentação de múltiplas vias de sinalização celular.

4.3 Isoflavonas na soja

O USDA (2008) publicou material contendo tabelas comparativas do conteúdo de daidzeína, genisteína, gliciteína e isoflavonas totais. Os dados foram coletados de diversos trabalhos e os resultados convertidos em agliconas, já que somente estas são absorvidas pelo intestino. Diversos produtos alimentícios são citados, dentre eles os com maiores conteúdos destas isoflavonas foram atribuídos à soja ou seus derivados.

Penha e colaboradores (2007) em levantamento comparativo coletaram 69 amostras de grãos de soja não orgânica, e 25 amostras de soja orgânica, todas oriundas da cultivar BR-36. A identificação e quantificação das isoflavonas nas amostras foram conduzidas em CLAE, e o trabalho visava comparar o perfil destes compostos nos sistemas de produção comercial orgânico e não orgânico. Os autores observaram diferenças em várias formas de isoflavonas, apesar do conteúdo total destas ser equivalente. Os grãos não orgânicos apresentaram significativamente maiores teores de isoflavona genistina (369,0 e 235,0 mg/100g) que os grãos orgânicos. Os grãos orgânicos apresentaram maiores teores de genisteína (7,0 e 4,3 mg/100g), malonil-genistina (281,0 e 177,0 mg/100g), e daidzina (55,2 e 43,0 mg/100g). As isoflavonas daidzeína e malonil daidzeína não apresentaram concentrações diferentes na soja produzida nos sistemas orgânico e não orgânico.

Mandarino e colaboradores (2006) vislumbraram a interferência da época de plantio e temperatura ambiente no conteúdo de isoflavonas. Os resultados das análises mostraram diferenças no teor de isoflavonas nas três diferentes

épocas de semeadura. Demonstraram que, com exceção de um cultivar, maiores teores de isoflavonas nas sementes da 1ª época (outubro), sendo que, nesta época, o clima foi mais ameno no período de enchimento de grãos, o que provavelmente favoreceu o aumento no teor das isoflavonas. Estes autores conseguiram observar ainda que fatores genéticos podem estar diretamente relacionados aos conteúdos destes compostos.

Teores de isoflavonas são altamente afetados por fatores ambientais, como já foi observado para distintos cultivares de soja cultivados em diferentes localizações e condições climáticas. No Brasil, sendo a soja cultivada em locais dentre latitudes 32°S e 5°N, esta gama ambiental reforça a necessidade de novas pesquisas com o objetivo de determinar os efeitos da localização sobre o conteúdo de isoflavona na sementes da soja (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009).

A influência da variabilidade genética na concentração de isoflavona são observadas quando diferentes cultivares de soja são semeados sob as mesmas condições ambientais. Em estudo recente, Carrão-Panizzi e colaboradores (2009) encontraram concentrações de isoflavona agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) pequena ou não detectáveis, como esperado para sementes de soja antes do processamento. Todavia, quando amostras destas sementes foram secas, por três dias a 50° C antes de triturar, não foram encontrados isoflavonas com radical malonil e algumas com radical acetil neste estudo, sugerindo que estas foram transformadas em formas glicosídeo durante o tratamento térmico, indicando que o tratamento térmico influencia de forma significativa o perfil de isoflavonas do alimento. No mesmo estudo todos os cultivares, exceto BRS 262, produziram maiores concentrações de isoflavonas quando semeadas em outubro, com média de temperaturas mais baixas e maior precipitação durante janeiro (período de preenchimento da semente). Abastecimento adequado de água e temperaturas menores faz aumentar as concentrações de isoflavona nos grãos maduros.

O estado de maturação é um fator que também pode interferir nesse perfil de isoflavonas. Estudos abordando mudanças pós-colheita, demonstram a influência destas no total de isoflavonas e carotenóides em soja, principalmente

pelos métodos de processamento, embora o genótipo tenha efeito nos perfis de carotenóides e isoflavonas durante o desenvolvimento da semente (SIMONNE et al., 2000). Adicionalmente, Martinez e colaboradores (2011) observaram que a germinação do grão de soja reduz a quantidade de fatores anti-nutricionais, assim como de taninos e eleva a quantidade de proteína e flavonóides disponíveis, bem como de outros micronutrientes caracterizando uma importante melhora no perfil nutricional da leguminosa.

O perfil e teores de isoflavonas na soja são conhecidamente influenciados por fatores genéticos e ambientais, com destaque para os seguintes fatores ambientais: temperatura, umidade e tipo de solo. Já o perfil e os teores de isoflavonas encontrados nos alimentos prontos, depende principalmente das condições de processamento utilizados, como tratamentos térmicos, hidrólise enzimática e processos fermentativos (LI-JUN et al., 2011), sendo todos estes controlados visando à obtenção de um produto final com propriedades nutricionais e funcionais adequadas. Sendo as isoflavonas compostos voláteis, tem-se que a temperatura do tratamento térmico e o processamento são fatores relevantes (CARRÃO-PANIZZI et al., 2003).

A escolha de cultivares, que geneticamente apresenta teores elevados de isoflavonas, de locais de cultivo, onde a temperatura média é mais baixa durante o período de enchimento de grãos, e de tratamentos hidrotérmicos dos grãos, com temperaturas e períodos de tempo adequados, proporciona maior desenvolvimento de isoflavonas agliconas (compostos biodisponíveis responsáveis por efeitos benéficos à saúde humana), garantindo a obtenção de matéria-prima mais adequada para processamentos de alimentos funcionais à base de soja (CARRÃO-PANIZZI et al., 2003).

O processamento, transformação da soja em grão em seus derivados (grão cozido, farinha, proteína, leite, óleo, pasta, tofu) pode interferir diretamente no teor e no perfil de isoflavonas encontrada nos alimentos. Baixo percentual de recuperação (47,1%) de compostos fenólicos em tofu foi devido ao aquecimento (lixiviação pela água, filtragem, coagulação e exclusão do soro durante o processamento do tofu. Chung e colaboradores (2011) compararam

os teores em tofu, na semente de soja e na pasta de soja e observaram apenas o primeiro diferindo dos outros dois.

As tabelas 8, 9 e 10 apresentam resultados de quantificação dos teores de isoflavonas em diferentes estudos. Como pode ser observado, as tabelas contém dados de forma diferenciada dos teores de isoflavonas. A Tabela 8, apresenta a quantificação individual das 12 isoflavonas, na Tabela 9 as isoflavonas foram agrupadas de acordo com os radicais e, na Tabela 10 dados são apresentados em isoflavonas agliconas.

Tabela 8: Quantificação de isoflavonas por diferentes estudos em grãos de soja e derivados, expressa em suas doze formas:

Autores	Amostra	M-DAI	M-GLI	M-GEN	A-DAI	A-GLI	A-GEN
AMATO, 2008 (mg/100 g de fração metanólica)	Semente de Soja	276,54	105,73	466,54	ND	ND	ND
	Tegumento ^e	152,29	89,11	161,80	ND	ND	ND
	Hipocótilo						
BENEDITTI, 2010 (mg/100g b.s.)	FDS	69,56	3,59	97,53	ND	ND	ND
	Extrato aquoso	36,39	16,87	18,90	ND	ND	ND
	Concentrado	75,77	35,03	38,52	ND	ND	ND
CARRÃO-PANIZZI et al., 2003 (mg/100g)	RS-10 Palmas	78,5	ND	120,7	ND	ND	ND
	BR-36 Palmas	45,5	ND	84,4	ND	ND	ND
	BRS-155 Palmas	96,1	ND	143,8	ND	ND	ND
GALÃO et al., 2010 (mg/100g) (Região: Londrina / Ponta Grossa)	SC. Londrina	26,16 - 142,36	26,00 - 87,86	65,3 - 216,94	ND	ND	ND
	ST. Londrina	69,76 - 121,21	0 - 43,75	77,94 - 115,81	ND	ND	ND
	SC.Ponta Grossa	57,82 - 141,54	21,2 - 57,82	114,99 - 223,28	ND	ND	ND
	ST. Ponta Grossa	80,8 - 171,51	0 - 48,01	109,87 - 194,99	ND	ND	ND

Continuação da tabela 8

Autores	G-DAI	G-GLI	G-GEN	DAI	GLI	GEN	Total
AMATO, 2008	145,67	47,69	147,54	57,73	22,61	75,04	1345,1
(mg/100g) (fração metanólica)	393,78	149,41	296,14	86,64	33,92	55,84	1418,9
BENEDITTI, 2010	48,35	3,07	67,92	2	ND	3,13	295,15
(mg/100g b.s)	7,69	4,74	5,94	19,59	9,54	10,35	130,00
	16,56	9,73	10,89	17,76	8,91	12,04	225,20
CARRÃO-PANIZZI et al., 2003 (mg/100 g)	20,6	ND	28,7	0,8	ND	1,2	250,5
	11,0	ND	19,2	1,6	ND	2,6	164,5
	23,4	ND	35,3	1,6	ND	2,3	302,5
GALÃO et al., 2010	9,46 - 33,43	2,74 - 17,08	14,59 - 41,20	0 - 2,42	ND	1,29 - 3,43	180,21 - 536,90
(mg/100g)	15,84 - 28,05	0 - 8,44	12,97 - 20,57	0 - 1,57	ND	0 - 1,89	233,37 - 333,2
	12,02 - 38,61	0 - 11,66	21,11 - 46,36	0 - 2,05	ND	1,77 - 4,72	228,9 - 521,9
	15,81 - 37,66	0 - 7,96	14,43 - 32,25	0 - 2,04	ND	1,79 - 3,70	295,06 - 475,44

SC: Soja convencional; ST: Soja transgênica; M-DAI: manolildaidzina; M-GLI: manoilglicitina; M-GEN: manoilgenistina; A-DAI: acetildaidzina; A-GLI: acetilglicitina; A-GEN: acetilgenistina; G-DAI: glicosildaidzina; G-GLI: glicosilglicitina; G-GEN: glicosilgenistina; DAI: daidzeína; GLI: gliciteína; GEN: genisteína e Total: isoflavonas totais; ND: não detectado.

Tabela 9: Quantificação de isoflavonas por diferentes estudos em grãos de soja e derivados, agrupadas por radical

Autores	Amostra	Malonilglicosídeos	β -Glicosídeos	Acetilglicosídeos	Agliconas	Iso.Totais	
BAVIA et al., 2012	BRS 216	91,85 / 48,32	72,50 / 30,01	ND / ND	26,74 / 45,58	191,09 / 123,91	
	BRS 232	38,64 / 36,91	35,98 / 22,27	ND / ND	15,01 / 27,22	89,63 / 86,41	
	Aglicona equivalente (mg/100g) (Grão/Tempeh)	BRS 257	81,76 / 38,51	95,70 / 55,50	ND / ND	22,77 / 82,72	200,24 / 176,72
		BRS 267	86,56 / 26,51	73,96 / 52,93	ND / ND	21,44 / 40,49	181,96 / 119,93
BARBOSA, et al., 2006 (mg/100g)	FDS com	76,40	96,26	7,64	11,08	191	
	FI	105,00	76,60	4,60	13,40	200	
	FDS	192,79	148,97	11,05	27,43	381	
	IPS	45,88	27,28	5,08	45,63	124	
	PTS	33,73	40,76	15,77	4,85	95	
	Grão	57,75	47,08	1,10	4,40	110	
	Suplemento	61,15	558,85	49,77	42,66	711	
CARRÃO- PANIZZI et al., 2003 (mg/100 g) (Tratamento a 50°C / 60°C)	BR-36 Palmas	NQ	NQ	NQ	37,6 / 25,1	105,90 / 90,60	
	RS-10 Palmas	NQ	NQ	NQ	41,8 / 20,0	153,10 / 125,80	
	BRS – 155 Palmas	NQ	NQ	NQ	75,7 / 34,6	195,70 / 180,60	
	BR-36 Londrina	NQ	NQ	NQ	19,4 / 7,1	70,20 / 54,10	
	RS-10 Londrina	NQ	NQ	NQ	28,8 / 9,0	93,90 / 93,90	
	BRS-155 Londrina	NQ	NQ	NQ	36,7 / 12,8	88,70 / 77,50	
	BR-36 Capanema	NQ	NQ	NQ	17,5 / 7,2	53,60 / 46,00	
	RS-10 Capanema	NQ	NQ	NQ	24,5 / 10,9	81,80 / 78,70	
BRS-155 Capanema	NQ	NQ	NQ	32,3 / 17,9	108,00 / 102,70		

Farinha desengordurada de soja comercial (FDS com); Farinha integral (FI); Farinha desengordurada de soja (FDS), Isolado proteico de soja (IS), Proteína Texturizada de soja (PTS), Grãos de soja (Grão); Iso.Totais: isoflavonas totais; ND: não detectado; NQ: não quantificado.

Tabela 10: Quantificação de isoflavonas por diferentes estudos em grãos de soja e derivados, expressa em agliconas

Autores	Amostra	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Isoflavonas Totais
ALEZANDRO, et al. 2008 (µg/g)	Soja BRS 243RR	44,1	ND	37,4	NQ
	Literatura* Soja Convencional	35,7-47,0	ND	32,0-60,4	NQ
BARBOSA, 2002 (mg/100g) (Farinha: Int./Des.)	Farinha de soja Doko RC.	48,0 / 60,0	5,7 / 5,7	74,0 / 94,3	127,7 / 160
	Farinha de soja Doko RC TN	187,7 / 248,6	0,0 / Tr	203,1 / 257,1	391,8 / 506,2
BARBOSA et al., 2006. (mg/100g b.s.)	Farinha desengordurada de soja comercial	72,58	9,55	108,87	191
	Farinha integral	74,00	12,00	114,00	200
	Farinha desengordurada de soja	133,35	30,48	220,98	381
	Isolado protéico de soja	42,16	4,96	76,88	124
	Proteína Texturizada de soja	36,10	8,55	50,35	95
	Grãos de soja (Grão)	42,90	7,70	59,40	110
	Suplemento	426,60	142,20	142,20	711
BERMAN et al, 2010 (mg/100g b.s.) Controles: Monsoy8329 norte e A5547 sul (variedades pariental não transformadas)	MON 87701 (Norte / Sul)	23,52 / 103,67	9,89 / 18,86	33,42 / 91,48	NQ
	MON 89788 (Norte / Sul)	23,59 / 116,53	9,95 / 19,83	34,36 / 94,22	NQ
	Controle (Norte / Sul)	23,43 / 101,38	9,02 / 17,75	35,28 / 88,94	NQ
	Comercial	18,10-209,98	3,29-26,05	17,65-164,93	NQ
	Literatura	6,00-245,35	1,53-31,04	14,43-283,72	NQ

Continuação da tabela 10

BERMAN et al., 2009 mg/100g b.s. Controle pariental não transformada A5547. (USA, 2007 / ARG, 2007-2008)	MON 87701 (USA/ARG)	66,75 / 96,03	65,56 / 88,68	16,49 / 20,00	
	Controle (USA/ARG)	60,49 / 93,47	59,46 / 85,87	15,69 / 18,48	
	Comercial (USA/ARG)	21,40-127,39 / 36,15-145,82	14,81-102,45 / 50,59-109,56	32,42-208,45 / 49,40-255,94	
	Literatura	6,0-245,35	14,43-283,72	1,53-31,04	
USDA, 2008 (mg/100g)	Farinha de soja desengordurada	64,55 22,60-149,60	15,08 2,70- 59,30	87,31 40,96 - 174,90	150,94 73,72 324,40
	Grão de Soja, madura, crua, origem mundial	62,07 2,64 - 191,43	14,99 0,00 - 121,69	80,99 5,56 - 276,21	154,53 10,04 - 440,72
	Grão de Soja, madura, crua, origem Brasil	29,09 9,89 - 87,42	13,10 4,56 - 20,49	67,57 25,88 - 110,98	99,82 42,54 - 188,00)

ARG: Sojas cultivadas na Argentina; Doko RC TN: Linhagem de soja isenta de lipoxigenase; Doko RC: variedade comercial contendo lipoxigenase; Farinha Des.: desengordurada; Farinha Int.: integral;. ND: não detectado; NQ: não quantificado; USA: Sojas cultivadas nos Estados Unidos da América.

4.4 Método de quantificação

Diferentes métodos têm sido utilizados para a quantificação das isoflavonas na soja, dentre eles, o mais relevante é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Visível (Tabela 11). Outros métodos como espectrofotométricos, com a reação com cloreto de alumínio seguido por leitura em UV-Visível, vem sendo estudados por se tratar de uma técnica simples e adequada para a quantificação da genisteína e genistina em amostras de extrato de soja seca (CÉSAR et al., 2008).

O processo cromatográfico consiste na separação dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. Na cromatografia líquida, o fluido é um solvente (fase móvel) e a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel. As forças físicas e químicas atuam entre os solutos e as duas fases, e são as responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças é o que determina a resolução e, portanto, a separação dos solutos individuais (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006).

Diferente da cromatografia líquida clássica (CLC), onde o recheio da coluna é utilizado geralmente uma só vez, na CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) emprega-se um coluna fechada, reaproveitável, o que possibilita que até centenas de separações individuais possam ser realizadas com a mesma coluna. Essas colunas são muito eficazes, todavia oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, o que torna necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão (até 400 bars) com o intuito de possibilitar a migração da fase móvel em uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada facilmente, resultando em operações mais reproduzíveis tornando as análises por CLAE mais precisas. Diferentes tipos de detectores podem ser colocados na saída da coluna e proporcionam uma identificação e quantificação continua dos componentes da amostra. A análise quantitativa pela CLAE, também conhecida pela sigla em inglês HPLC - "*High Performance Liquid Chromatography*", pode atingir uma precisão superior possibilitando, de forma relativamente fácil, separações em escala preparativa de miligramas de amostras (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006).

Tabela 11: Comparação entre estudos no período de 2001-2012 para avaliar diferentes métodos de análise utilizados para quantificar isoflavonas

Análise de Isoflavonas				
Autores	Extração	Quantificação	Padrões	Amostras
AMATO, 2008	Solução hidro-etanólica a 70% (v/v) contendo 0,1% de ácido acético	Análise em CLAE por gradiente binário (metanol/água acidificados). Leitura conduzida em 260 nm. Detector: Arranjo de Diodos (DAD)	Formas glicosídicas e aglicanas. Para manolil e acetil foi utilizado coeficiente de extinção molar	Semente de soja e casca da semente de soja com fragmentos hipocótilo (resíduo industrial da extração de óleo)
ALEZANDRO, 2009	Metanol 80%	Análise em CLAE. Detector: DAD (SONG et al., 1998)	Padrão das doze isoflavonas	Quinze produtos industrializados à base de soja e quatro refeições (duas variedades, com ou sem adição de compostos bioativo)
ALEZANDRO, 2008	Etanol 70% acrescido de 0,1% de ácido acético e Metanol a 80%	Análise em CLAE. Com relação à fase móvel testaram-se duas composições: metanol: AAc 5% (1:1 v/v) e outra AAc 5%: metanol/acetonitrila (100/85) (1:1 v/v). As leituras dos analitos foram realizada em 254 e 262nm. Detector: DAD.	Padrões daidzeína e genisteína	Soja transgênica BRS 243 RR

Continua ...

Autores	Extração	Análise	Padrões	Amostras
BARBOSA, 2002	HCl, Etanol, Metanol, Metanol:amônia	BHT, Análise em CLAE. Leitura: 262 nm. Detector: Espectrofotométrico (SPD-10A).	Daidzeína, gliciteína, genisteína.	Amostra do Macarrão (Com substituição de farinha de soja Doko RC e Doko RC TN)
BARBOSA et al., 2006.	Metanol 80% (GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M., 2001)	Análise em CLAE (SONG et al., 1998). Detetor: DAD.	Os padrões de daidzeína e genisteína, daidzina e genistina, glicitina e gliciteína, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina.	Soja em grão e seis derivados (3 lotes): farinha desengordurada de soja comercial, farinha integral e respectiva farinha desengordurada (n-hexano como solvente), isolado protéico de soja, proteína de soja texturizada e um suplemento de isoflavonas (à base de gérmen).
BAVIA et al, 2012	Extração (70 % de etanol e 0,1 % de ácido acético) conforme Carrão-Panizzi, Favoni e Kikuchi (2002).	Análise em CLAE conforme Berhow (2002), com modificações. Detector: DAD. Leitura a 254 nm.	Daidzeína, genisteína, genistina, daidzina, glicitina, gliciteína, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilglicitina e malonilgenistina (Sigma Chemicals Co)	Tempeh e soja em grão

Continua ...

Autores	Extração	Análise	Padrões	Amostras
BENEDITTI, 2010	Extração (70 % de etanol e 0,1 % de ácido acético) conforme Carrão-Panizzi, Góes-Favoni e Kikuchi (2002)	Análise em CLAE (BERHOW, 2002). Detector: DAD.	Padrões externos de daidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glicitina, gliciteína, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetildaidzina, acetil genistina e acetil glicitina todos em metanol	Grãos da linhagem BRS 216, safra 2007, colhidos na região de Mauá da Serra - PR (Latitude sul 23°54', a 1020 m de altitude).
BHOM et al, 2008	Metanol 80%	Análise em CLAE (SONG et al.1998). Detector: DAD. Leitura 200-350nm.	12 isoflavonas	Soja em grão
DUKE et al, 2003	Em metanol e água 8:20 (v/v).	Quantificação de daidzina, genisteína, genistina e glicitina por CLAE utilizando fase móvel: ácido acético 0,05% em água(A) e ácido acético 0,05% em acetoneitrila. Detector: DAD. Monitorado a 260 nm. A quantificação de daidzeína e gliciteína foi realizada por CG-MS.	Daidzina, genisteína, genistina, glicitina, daidzeína e gliciteína	Soja em grão

Continua ...

Autores	Extração	Análise	Padrões	Amostras
CARRÃO-PANIZZI et al., 2003	Etanol aquoso a 70%, contendo 0,1% de ácido acético	CLAE. Efluente monitorado a 260 nm.	Soluções padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína	Três cultivares de soja, três locais de cultivo no Paraná (safra 1999/2000) e dois tratamentos hidrotérmicos temperaturas de 50 e 60°C. No segundo experimento, três locais de cultivo, três temperaturas, e dois períodos de imersão dos grãos do cultivar de soja BRS 155.
CARRÃO-PANIZZI et al., 2009	Desengordurada com hexano e extraído com 4x DMSO:MeOH (1:1)	Análise em CLAE . Detector: DAD. BERHOW, 2002 e BARNES et al.,1994.	Daidzina, genistina e glicitina Extinção de coeficiente molar foi utilizado para determinar os níveis de todas as formas de isoflavonas mensuradas	233 cultivares de soja brasileira
CÉSAR et al, 2008	Metanol, AlCl ₃ 2% (p/v) em metanol.	Análise por Espectrofotometria UV-Visível e por CLAE (CÉSAR et al.,2006). Detector: DAD Leitura: 254 nm.	Genisteína	7 amostras de extrato seco de soja padronizados para conter 40% (w/w) de isoflavonas totais.

Continua ...

Autores	Extração	Análise	Padrões	Amostras
GALÃO et al., 2010	Etanol a 70%	A quantificação foi feita usando coluna de fase reversa. Detecção por ultravioleta a 260 nm.	Padrão 12 tipos. As formas acetiladas não foram encontradas em nenhuma das cultivares nos dois locais, e tampouco a glicitina. Tendo ao final quantificadas 8 isoflavonas.	20 cultivares de soja semeadas em Londrina e Ponta Grossa
MANDARINO et al, 2006	CARRÃO-PANIZZI et al., 2002	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) BERHOW, 2002. Detector: DAD. Leitura: 260 nm.	Padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína. Para a quantificação das 12 formas de isoflavonas, (padronização externa - área dos picos), foram utilizados como referência os padrões, bem como o coeficiente de extinção molar de cada uma para o cálculo das outras formas (malonil e acetil) .	17 cultivares de soja (programa de melhoramento genético da Embrapa) safra de 2004/2005, em Londrina, PR, e semeadas em três diferentes épocas.
PENHA et al., 2007	---	CLAE. Detector: DAD Leitura: varredura na faixa de 210 a 300 nm.	---	69 amostras orgânicas e 25 não orgânicas todas do cultivar BR-36 (19 municípios do Paraná)
SANTANA et al, 2012	De acordo com Carrão-Panizzi, Favoni e Kikuchi (2002).	Análise em CLAE (BERHOW, 2002). Detector: DAD Leitura: 254 nm	Daidzina, Genistina, Daidzeína, malonil-daidzina, malonil-glicitina, genistina, daidzeína, genisteína e gliciteína (Sigma Chemicals Co)	Soja tipo hortaliça

Continua ...

Autores	Extração	Análise	Padrões	Amostras
SILVA et al, 2012	De acordo com Carrão-Panizzi, Favoni e Kikuchi (2002).	Análise em CLAE conforme Berhow(2002), com modificações. Detector: DAD Leitura: 254nm.	12 isoflavonas	Soja em grão
ZHOU et al, 2011	Ácido hidrocloreídrico e álcool até converção a agliconas (Pettersson, H.; Kiessling, K.H., 1984 e Seo, A.; Morr, C. V. 1984)	Análise em CLAE (SEO, A.; MORR, C. V.. 1984 e PETTERSSON, H.; KIESSLING, K. H.;1984)	Daidzeína, Genisteína e Gliciteína agliconas	Grãos de soja 22 cultivares GM e 18 Convencionais, de diferentes regiões e safra brasileirasl.

BHT: di-terc-butil metil fenol;CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência; DAD: Detector de Arranjo de Diodos; DMSO: Dimetilsulfóxido; MeOH: metanol.

CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÃO GÊNICA EM SOJA

1 INTRODUÇÃO

A expansão continuada da adesão ao plantio de OGM tem vindo se consolidando desde sua implantação. Nesse contexto a soja representa a principal cultura submetida à biotecnologia, com intuito primordial de melhoria de produtividade. A clara ampliação do plantio de soja geneticamente modificada levanta questões acerca da comercialização desta no mercado tanto para o consumo humano quanto animal. Diversos estudos vêm avaliando a presença de modificação gênica em produtos industrializados à base de soja e alguns avaliam também a soja em grão. No presente trabalho esta avaliação é conjugada com a análise dos rótulos alimentícios quanto à presença ou não de declaração de modificação gênica.

2 OBJETIVOS

- Averiguar a presença de modificação gênica em amostras de soja em grão comercializadas no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, possibilitando a comparação entre sojas transgênicas e convencionais.
- Avaliar a adequação de rotulagem das amostras adquiridas no comércio, quanto à legislação que regulamenta o direito a informação sobre presença de organismos geneticamente modificados em alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Laboratório

As análises de quantificação de modificações gênicas foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico Vegetal e OGM, Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LANAGRO-MG), Localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

3.2 Materiais

3.2.1 Amostras

As amostras de matérias-primas (soja em grão) comerciais segundo fornecedor e lote foram listadas na Tabela 12. As amostras foram adquiridas aleatoriamente, no total de um quilo por amostra.

Tabela 12: Matérias-primas de grãos de soja comercial

Amostra	Lote	Validade
Comercial 1	FEL-E1FJ	06/06/2012
Comercial 2	3440101	10/12/2011
Comercial 3	389	04/10/2012
Comercial 4	220811	22/08/2012
Comercial 5	Não possui	09/2012
Comercial 6	110211	25/03/2012

3.3 Métodos

3.3.1 Levantamento de dados de rotulagem

Foram analisados os rótulos das embalagens das amostras de grão de sojas adquiridas no comércio de Belo Horizonte. Esta avaliação foi conduzida considerando a adequação dos rótulos com a legislação vigente para alimentos e ingredientes alimentares, destinados ao consumo humano ou animal, que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. Foram observadas a adequação da declaração escrita, bem como a presença do símbolo pré-definido como indicativo da presença OGM (BRASIL, 2003a,b ; BRASIL, 2004).

3.3.2 Preparo da Amostra

No preparo de amostras para análise de OGM, estas foram homogeneizadas manualmente em sacos plásticos limpos e descartáveis e inspeccionadas visualmente ao fim do processo para garantir a completa homogeneização. Foram realizadas pesagens de quantidade (10 grãos) conhecida de grãos da amostra para a determinação do peso de 10.000 grãos.

Em moinho (Retsch GM 200) exclusivo para moagem de grãos, uma fração da amostra homogeneizada foi moída e descartada, para ambientar o moinho, a fim de prevenir contaminação cruzada entre amostras diferentes. A amostra, de massa mínima equivalente a 10.000 grãos, foi completamente pulverizada. A pulverização foi realizada pela moagem de porções que não ultrapassaram a metade do volume do copo. Essas sucessivas moagens foram realizadas em 2 intervalos de 30 segundos, a 10.000 rpm, e as porções pulverizadas acrescentadas ao saco plástico, repetindo-se o processo de homogeneização. Cada vez que nova porção de grãos pulverizados foi acrescentada, realizou-se nova homogeneização. Depois da última homogeneização, quando todas as frações foram acrescentadas coletou-se uma fração e nova homogeneização foi realizada. Esta fração equivalente a menos da metade do copo foi moída novamente por mais 2 intervalos de 30 segundos, a 10.000 rpm. Foi usado um copo limpo para esse procedimento. Desta fração coletou-se 200 mg do moído em dois microtubos de 2 mL, classificadas como subamostras da preparação “a”. Repetiu-se o mesmo procedimento e coletou-se as subamostras da preparação “b”. Os acessórios do moinho, bancadas, pincéis e espátulas foram limpos e desinfetados com hipoclorito de sódio 1%. O restante da amostra foi embalada e armazenada para possível re-análise.

3.3.3 Análise de modificação gênica em soja por PCR-Tempo Real

3.3.3.1 Extração do DNA

Para extração de DNA pelo método CTAB básico (CTAB detergente catiônico - brometo de cetil-trimetilamônio) foi utilizado o procedimento descrito pela ISO 21571 de 2005 (ISO, 2005). Pesou-se 200 mg de amostras de grãos moídos em tubos Tipo-Eppendorf de 2 mL. Foi separado um tubo para o controle branco da extração,

no qual foi realizado todo o procedimento abaixo na ausência da amostra em questão. Foi adicionado 1,5 mL de tampão extração CTAB pré-aquecido em banho maria a 65°C e agitou-se. Adicionou-se 10 µL da solução de RNase e misturou-se gentilmente. Os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos no “*Speed Vacuum*” sem centrifugação nem vácuo ativados, sob agitação a cada 10 minutos. Foram adicionados 10 µL de solução de Proteinase K e misturou-se cuidadosamente invertendo o tubo que novamente foram incubados a 65°C por 30 minutos no *Speed Vacuum* sem centrifugação nem vácuo ativados, sob agitação a cada 10 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos a 12000 x g, à temperatura de 20-25°C, para separar o sedimento do sobrenadante. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se clorofórmio na proporção 0,7:1 volume do sobrenadante e homogeneizou-se levemente. Centrifugou-se por 15 minutos a 12000 x g. Transferiu-se a fase aquosa (superior) para um novo tubo. Adicionou-se tampão de precipitação do CTAB, dois volumes da fase aquosa; incubou-se por 60 minutos à temperatura ambiente sem agitação. Centrifugou-se por 15 minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA dissolvido em 300 µL de solução de NaCl. Adicionou-se 300 µL de clorofórmio e misturou-se invertendo o tubo cuidadosamente. Foi centrifugado por 10 minutos a 12000 x g; transferida a fase aquosa (superior) para um novo tubo. Adicionou-se isopropanol, 0,6 volumes da fase aquosa recolhida, misturou-se cuidadosamente e reservou-se à temperatura ambiente por 20 minutos. Foi novamente centrifugado por 15 minutos a 12000 x g e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 500 µL de solução de etanol ao tubo que foi invertido suavemente várias vezes. Centrifugou-se por 10 minutos a 12000 x g e novamente descartou-se o sobrenadante. O precipitado de DNA foi seco em *Speed Vacuum* pré aquecido a 70°C, com centrífuga e vácuo ligados e aquecimento à 70°C por 10 minutos. Inspeccionou-se visualmente, repetiu-se o processo para amostra ainda úmidas. Ressuspendeu-se o DNA em 100 µL de tampão TE.

3.3.3.2 Quantificação do DNA

Terminado o processo de extração, o DNA das amostras foi quantificada em espectrofotômetro, sendo procedidas as leituras a 230 nm, 260 nm, 280 nm e 320 nm, e a quantificação em ng/µL de DNA. A quantificação do DNA em espectrofotômetro (Nanovue, GE) foi conduzida a partir das relações de

absorbância a 260 nm pela 280 nm, 260 nm pela 230 nm e o valor absoluto da absorbância a 320 nm, bem como a concentração de DNA em ng/ μ L. As concentrações não variaram mais que 10% de uma leitura pra outra. Caso o controle branco de extração apresentasse um valor de concentração maior que 2 ng/ μ L, isso significaria que ocorreu contaminação cruzada entre os tubos, e a extração deveria ser realizada novamente.

Para a diluição da solução estoque de DNA para a concentração de uso, foram feitos cálculos de diluição baseados na concentração da solução estoque, concentração final desejada e volume final desejado. Os volumes de solução estoque e de TE (tampão) utilizados foram calculados. A diluição foi realizada em cabine de fluxo laminar específica para pipetagem de DNA.

3.3.3.3 Análise de modificação gênica por PRC em tempo-real

No preparo de reações de PCR tempo-real (Termociclador Applied Biosystems – SteponePlus, Real-time PCR System) para a amplificação do promotor 35S foi calculado o volume final de Mastermix a ser preparado, levando em consideração o número de amostras e controles. As quantidades e concentrações de cada reagente para 1 (uma) reação constam na Tabela 13.

Tabela 13: Mastermix para reação de amplificação do evento OGM (Promotor 35S)

Reagentes	Concentração Final	Mix para 1 reação (μ L)
PCR Master Mix (2x)	1x	12,5
Iniciador-F (20 μ M)	100 nM	0,125
Iniciador-R (20 μ M)	100 nM	0,125
Sonda (10 μ M)	100 nM	0,25
Água (<i>nuclease free</i>)*	-	7
DNA alvo (max 200 ng)*	4ng/ μ L	5
TOTAL		25

As sequências de nucleotídeos dos iniciadores e sonda utilizada para o ensaio de detecção constam na Tabela 14.

Tabela 14: Iniciadores e sonda para ensaio de detecção do promotor 35S

Oligonucleotídeos	Sequência
Iniciador-F 35S (20 μ M)	GCC TCT GCC GAC AGT GGT
Iniciador-R 35S (20 μ M)	AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C
Sonda 35S(10 μ M)	(FAM) CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G (TAMRA)

Fonte: AB, 2011

No preparo da reação de PCR tempo real para a amplificação do gene endógeno da soja (Lecitina) foi novamente calculado o volume final de Mastermix a ser preparado, levando em consideração o número de amostras e controles. Ressalta-se que a mesma planilha utilizada para o preenchimento do transgene foi utilizada para o preenchimento do gene endógeno. As quantidades e concentrações de cada reagente para 1 (uma) reação constam na Tabela 15.

Tabela 15: Mastermix para reação de amplificação do controle endógeno (Lecitina)

Reagentes	Concentração Final	Mix para 1 reação (μL)
PCR Master Mix (2x)	1x	12,5
Iniciador-F (20 μ M)	900 nM	1,125
Iniciador-R (20 μ M)	900 nM	1,125
Sonda (10 μ M)	100 nM	0,25
Água (<i>nuclease free</i>)*	-	5
DNA alvo (max 200 ng)*	4ng/ μ L	5
TOTAL		25

Fonte: AB, 2011

As sequências de nucleotídeos dos iniciadores e sonda utilizados para o ensaio de detecção constam na Tabela 16.

Tabela 16: Iniciadores e sonda para ensaio de detecção do controle endógeno (Lecitina)

Oligonucleotídeos	Sequência
Iniciador-F Lec (20µM)	TCC ACC CCC ATC CAC ATT T
Iniciador-R Lec (20µM)	GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA
Sonda Lec (10µM)	(VIC) AAC CGG TAG CGT CAG CTT CG (TAMRA)

Fonte: AB, 2011

A reação de PCR tempo-real para detecção do promotor 35S foi realizada no Fluxo Laminar Vertical para pipetagem de Mastermix, foram distribuídos os mastermixes para amplificação do transgene (promotor 35) e do gene endógeno nas placas óticas de 96 poços, conforme demonstrado no Apêndice I. Nesta etapa, somente DNA das amostras e padrões não foram pipetados. Após esta distribuição, a placa foi levada ao Fluxo Laminar Vertical para pipetagem de DNA, onde os DNAs das amostras e padrões foram acrescentados aos mastermixes. Foram realizadas duas extrações de DNA por amostra, e cada uma destas extrações tiveram duas reações de PCR tempo-real, gerando quatro poços por amostra. Além das amostras, foram acrescentados em triplicata o DNA dos padrões, sendo um padrão convencional (não OGM) e outro com concentração de OGM no limite de detecção (LOD) estabelecido na validação. Foi deixado um poço somente com mastermix (sem DNA) para que fosse verificada a pureza dos reagentes utilizados. Quando as amostras foram utilizadas pela primeira vez, utilizou-se um Branco de extração em um poço. Este esquema de distribuição de DNA na placa foi realizado tanto para o endógeno quanto para o transgene.

Foi aplicado cuidadosamente o selante adesivo ótico sobre a microplaca e realizada uma centrifugação rápida na microplaca (Centífuga Sigma/ 3-16pK), para que todos os reagentes precipitem. A microplaca foi então inserida no termociclador e configurada a reação de amplificação no software, de acordo com o programa de ciclos da Tabela 17.

Tabela 17: Programa de amplificação para promotor 35S e controle endógeno

Etapas	Estágio	Temperatura (°C)	Duração (seg)	N° de ciclos
1	UNG	50	120	1
2	Desnaturação inicial	95	600	1
3	Desnaturação	95	15	
	Anelamento	60(OGM)/60(Endógeno)		45
	Extensão	60	60	

Seg: segundos; UNG: Uracil N-glicosilase.

Ao final do programa de amplificação, dados gerados pelo termociclador foram exportados no formato de planilha Excel®. A diferença entre os Cts (cycle threshold) médios do transgene e do endógeno (ΔCt) para o material de referência no limite de detecção (LOD) foi o valor de referência utilizado para avaliar se a amostra era positiva ou negativa. Podemos definir CT como o número de ciclos necessários para o sinal de fluorescência para cruzar o limiar (ou seja, superior ao nível basal). O limite de detecção foi de 0,1%.

Para os cálculos dos valores de Ct endógeno e Ct transgene, obteve-se a média das replicatas de PCR. Para conclusão de amostra positiva, ambas replicatas de amostra cumpriram este requisito. Para garantir a qualidade do ensaio, a amostra negativa (padrão convencional) não deveria ter amplificação de transgene antes do ciclo 40, em caso de presença de uma amplificação, o ΔCt deveria ser maior que o

ΔCt_{LOD} . Os controles negativos (branco de mastermix e de extração) não deveriam ter amplificação de endógeno ou transgene.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

De acordo com a Instrução Normativa Interministerial nº 1 de 1º de Abril de 2004, alimentos ou ingredientes alimentares pré-embalados, destinados ao consumo humano ou animal, que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM, com presença superior ao limite de um por cento do produto, deverão constar no rótulo em destaque, no painel principal e em conjunto com o símbolo definido pela Portaria nº 2.658, de 22 de dezembro de 2003, do Ministro de Estado da Justiça, uma das seguintes expressões: “(nome do produto) transgênico”, “contém (nome(s) do(s) ingrediente(s)) transgênico(s)”, ou ainda “produto produzido a partir de (nome do produto) transgênico”. Deverá ainda ser informado, no rótulo, o nome científico da espécie doadora do gene responsável pela modificação expressa do OGM, sendo facultativo o acréscimo do nome comum quando inequívoco. Em 2008, Greiner e Konietzny publicaram dados de 100 produtos processados contendo soja comercializados no Brasil. Estes foram analisados anualmente de 2000 a 2005 e encontraram uma progressão de 11 - 36%, de 2000 para 2005, no percentual de produtos alimentares contendo mais de 1% de soja RR. De forma semelhante ao ocorrido no presente estudo, nenhuma destas amostras continham em suas embalagens a declaração da presença de OGM. A contraposição está no fato de que aqui as seis amostras comerciais avaliadas foram negativas para a presença de modificação gênica estando portanto com seus rótulos em conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2004; GREINER e KONIETZKY, 2008).

Diversos estudos ao longo da última década vem avaliando a presença de OGM em alimentos disponíveis para o mercado consumidor. Cardarelli e colaboradores, analisaram 89 alimentos incluindo uma variedade de processamentos, desde passos relativamente suaves como soja tratada e milho triturado a produtos altamente processados que contivessem soja e/ou ingredientes de milho. Estas amostras foram recolhidas aleatoriamente dos mercados em algumas cidades do Brasil e verificou-se a presença de soja RR em 16 amostras, dentre elas leite de

soja, pasta, molhos, sopas desidratadas, soja crua e ração animal. Do total de amostras analisadas por Cardarelli e colaboradores, 15 eram de soja crua e destas apenas uma apresentou-se positiva para a presença do promotor 35S. Posteriormente, esta amostra foi avaliada quanto à presença de RR e confirmada a inserção deste gene. No presente estudo, as análises foram conduzidas de forma semelhante onde amostrou-se soja em grão crua comercializadas no mercado local, todavia nestas realizou-se inicialmente avaliação da presença do promotor 35S. Todas as amostras analisadas apresentaram resultado negativo para a presença deste promotor sendo pela metodologia proposta dispensada a análise da presença do gene RR e confirmando, então, a adequação das mesmas às declarações em seus rótulos (CARDARELLI et al., 2005).

Brod e colaboradores analisaram 37 amostras de produtos de soja (seis farinhas, seis fórmulas infantis e vinte e cinco leites de soja em pó) adquiridos no mercado de Florianópolis. Encontraram quatro amostras de farinhas de soja desengordurada e quinze de leite de soja em pó positivas para a presença de soja RR. Em 2007, Brod e Arisi analisaram trinta e dois aditivos de carne que continham proteína de soja em sua composição e vinte e cinco apresentam sinal positivo para lecitina confirmando a presença de soja no DNA amplificado. Destas, quinze foram positivas para RR confirmando a presença de soja geneticamente modificada. Em 2008, Brod e Arisi analisaram sessenta amostras de derivados de soja, sendo trinta e sete de proteína texturizada de soja (PTS) e vinte e cinco de leite de soja em pó comercializados em Florianópolis. Encontraram presença de RR em quarenta amostras, mas somente duas amostras continham mais de 1% de soja RR. É interessante observar que estes estudos foram conduzidos principalmente com derivados de soja e nestes foram conduzidos inicialmente as análises de presença de soja, pela detecção de lecitina e de RR, e não do promotor 35S. Esse direcionamento pode ter ocorrido pela relevância do fato desta RR, ter sido a primeira alteração gênica para soja autorizada no Brasil.

Branquinho, Ferreira e Cardarelli-Leite (2010) analisaram alimentos derivados de soja e diferentemente do nosso estudo iniciou sua triagem por análise do gene RR com posterior análise do 35S, dos itens positivos para RR, para quantificação do transgene. Do total de amostras analisadas 28,3% (n=240) continha o gene RR e a

análise do evento 35S confirmou-se pela presença entre 0,05 e 1% em 63,2% das amostras (n=43) e superior a 1% em 36,8% (n=25). A divergência destes resultados pode ter sido acarretada pelo perfil da matéria-prima analisada, produtos derivados de soja em contraposição à própria soja em grão do nosso presente estudo.

5 CONCLUSÕES

Embora seja conhecida a grande amplitude de soja transgênica plantada no Brasil, as seis amostras comerciais de soja em grão coletadas no município de Belo Horizonte, em novembro de 2011, não apresentaram declaração de modificações gênicas nas embalagens. Após análise por PCR-tempo real destas amostras foi confirmada a ausência do gene promotor 35S, ratificando a conformidade do rótulo do produto para com a legislação vigente, no que tange o direito do consumidor de conhecimento da presença de OGM em produtos alimentícios.

CAPÍTULO 2 ANÁLISE DE MINERAIS EM SOJA POR ICP-OES

1 INTRODUÇÃO

A confirmação de ausência da transgenia nas sojas comercializadas no município de Belo Horizonte no Capítulo 1 conferiu a possibilidade de comparação entre os dois grupos, geneticamente modificadas e convencionais. A discussão quanto à necessidade de rotulagem dos alimentos geneticamente modificados circunda o fator equivalência substancial, na alegação de que ambos, geneticamente modificados e convencionais, apresentariam valores nutricionais semelhantes. Para liberação de um alimento geneticamente modificado é necessária a comprovação desta equivalência para macronutrientes, entretanto, este capítulo aborda a equivalência de forma diferenciada avaliando os teores de minerais das sojas convencionais e transgênicas.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o teor de minerais em amostras de soja em grão comercializadas no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais; e geneticamente modificadas colhidas na região de Minas Gerais;
- Comparar os resultados obtidos para amostras transgênicas e comerciais;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Laboratório

As análises de determinação do perfil de minerais foram realizadas no Laboratório de Contaminantes Metálicos – Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Localizada em Belo Horizonte.

3.2 Materiais

3.2.1 Amostras

Foram obtidos dois grupos de amostras de matérias-prima (soja em grão). O primeiro, conhecidamente transgênico foi fornecido pela Cooperativa Agrícola Mista Iraí Ltda (COPAMIL) e era composto por seis diferentes cultivares, os quais eram os de maior demanda para Minas Gerais e Região. O segundo grupo foi obtido no comércio local do município de Belo Horizonte/MG, no período de novembro de 2011. O grupo comercial foi composto por seis amostras de diferentes empresas fornecedoras adquiridas aleatoriamente no comércio local em um total de um quilo por amostra.

As amostras de matérias-primas (soja em grão) transgênicas utilizadas no preparo da farinha desengordurada foram listadas segundo o cultivar, evento e safra na Tabela 18. A presença de transgene não foi verificada para estas amostras, uma vez que a alteração foi declarada pelo próprio fornecedor. As amostras de matérias-primas (soja em grão) comerciais, segundo fornecedor e lote, foram listadas na Tabela 12.

Tabela 18: Matérias-primas de grãos de soja transgênico

Amostra	Evento	Safra
BRSMG 750S	RR	2010/2011
BRS Valiosa	RR	2010/2011
BRS Favorita	RR	2010/2011
BRSMG 850G	RR	2010/2011
BRSMG 811C	RR	2010/2011
BRSMG 740S	RR	2010/2011

3.3 Métodos

3.3.1 Preparo das Amostras

A metodologia utilizada foi adaptada do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). As amostras foram homogeneizadas, retirou-se uma alíquota que foi triturada blender laboratorial (model8 SIBL30 – 7010 – Waring/Comercial ®), por 2 pulsos de 60 segundos e posteriormente armazenada em recipientes plásticos com tampa até o início dos processos de preparo da amostra. Pesou-se precisamente aproximadamente 5g da amostra, em triplicata, em cadinho de porcelana grande e alto. As amostras foram queimadas em chapa elétrica até cessar o desprendimento de fumaça. As etapas seguintes foram realizadas tanto para as amostras quanto para o branco. Amostras e brancos foram colocados na mufla programável (modelo Ney Vulcan3 – 1750 – WF tecnologia) utilizando-se uma rampa de temperatura, como descrito na Tabela 19.

Tabela 19: Parâmetros da mufla para abertura das amostras e posterior análise de minerais

Tempo	Temperatura	Rampa de Aquecimento
1h	100°C	5°C/min
1h	250°C	5°C/min
5h	530°C	10°C/min

Algumas amostras necessitaram de um tempo maior para a completa queima em mufla. Portanto, ficaram mais 2 horas até completar a queima.

Os cadinhos foram retirados da mufla e aguardou-se esfriar. Colocou-se 2mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado e foram levados à chapa. Deixou-se secar e foram levados à mufla a 375°C por uma hora, em casos onde não se obteve cinzas brancas, repetiu-se as etapas anteriores. Adicionou-se às cinzas 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado, aqueceu-se ligeiramente para facilitar a dissolução e transferiu-se para o balão volumétrico de 25mL e completado o volume com água milli-Q (Millipore/ Milli-Q Plus). Transferiu-se as amostras para tubos de Falcon 15

mL. Nos casos onde a amostra possuía teor do elemento estimado, determinou-se a necessidade de diluição diferente, realizou-se os cálculos pertinentes para determinar o balão volumétrico da diluição final, mantendo a proporção de HCl final de 2%. Quando as concentrações dos metais estiveram fora da faixa linear da curva de calibração, realizou-se as diluições necessárias adicionando HCl na proporção de 2%.

A curva analítica foi construída a partir das soluções padrões de 1000mg/L (Merck) e foram preparadas em concentrações de 1,00; 2,00; 5,00; 7,50 e 10,00 mg/L em solução aquosa, acidificadas a 2% (v/v).

Curva Analítica de macrominerais: K, Ca, P, Mg e Na em concentração de 1 a 25 mg. PI preparado à partir de 5 mL de cada padrão em balão de 50 mL (Tabela 20).

Tabela 20: Pontos da curva analítica de macrominerais utilizados para análise no ICP-OES

Pontos	Concentração	PI (mL)	HCl (mL)	Volume final (mL)
A	1	0,5	1,0	50
B	5	2,5	1,0	50
C	10	5,0	1,0	50
D	15	7,5	1,0	50
E	20	10,0	1,0	50
F	25	12,5	1,0	50
Branco	0	-	1,0	50

PI: Padrão Interno

Curva Analítica de microminerais: Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, Pb (chumbo), Ni (níquel), Ba (bário) e Cr (cromo) em concentração de 0,05 a 0,50 mg/L. PI preparado à partir de 0,125 mL de cada padrão em balão de 50 mL (Tabela 21).

Tabela 21: Pontos da curva analítica de microminerais utilizados para análise no ICP-OES

Pontos	Concentração	PI	HCl (mL)	Volume final (mL)
A	0,05	1	1,0	50
B	0,10	2	1,0	50
C	0,20	4	1,0	50
D	0,30	6	1,0	50
E	0,40	8	1,0	50
F	0,50	10	1,0	50
Branco	0	-	1,0	50

PI: Padrão Interno

As diluições foram preparadas em tubos de falcon de 15 mL com o auxílio de micro pipetas automáticas e pisseta (Tabela 22).

Tabela 22: Esquema de diluição das amostras de soja

Diluição	Amostra (mL)	Água Mili-Q (mL)
1:100	0,1	9,9
1:50	0,2	9,8
1:20	0,4	9,6

3.3.2 Análise de macro e micro minerais em soja por ICP-OES

Procederam-se as leituras dos brancos, padrões e amostras no ICP-OES utilizando o método metais em alimentos cadastrado no software do equipamento. O limite de detecção foi de 0,5 mg/L para macrominerais e 0,05 para microminerais.

Todas as amostras foram analisadas diretamente no ICP-OES (Perkin Elmer, mod. Optima2000DV – amostrador, mod. As90plus). Os parâmetros utilizados estão descritos abaixo na Tabela 23.

Tabela 23: Parâmetros do ICP-OES para análise de minerais nas amostras de soja

Parâmetro	Configuração
Configuração	Axial
Potência	1400 kw
Vazão de gás	0,60 L min. ⁻¹
Gás	Argônio

As curvas analíticas para cada elemento foram construídas e verificou-se a linearidade da resposta. O resultado foi gerado pelo software do equipamento, Programa: Win Lab 32 – ICP. Realizou-se posteriormente a conversão dos dados obtidos utilizando-se o peso real inicial de cada amostra.

Para efeito de análises estatísticas, as amostras comerciais assim como as transgênicas foram agrupadas entre si. Para execução dos testes estatísticos (teste de Tukey e anova) foi utilizado o Software STATISTICA 7.0.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Quando comparados os resultados das análises de macro e microminerais agrupando as amostras em transgênicas e convencionais foi possível observar diferença significativa entre os grupos para potássio ($p < 0,003$), cromo ($p < 0,007$) e ferro ($p < 0,013$). Observando os gráficos tipo Whiskers apresentados nos apêndices IV e V para macro e microminerais, facilita visualizar que, embora tenhamos uma importante dispersão nos teores de minerais nos grupos (transgênicos e não transgênicos), ainda assim foi possível observar variação significativa para os

minerais supracitados. Os demais microminerais analisados (cádmio, chumbo e níquel) ausentes nas tabelas não foram detectados ou foram classificados como elementos traço.

Andrade e Rosolem (2011), ao avaliar a influência do glifosfato e da transgenia na absorção de manganês não observou diferença significativa para os grupos. Zobiolo (2010), por sua vez, encontrou valores mais baixos para macro e micronutrientes analisados em sojas que sofreram modificação gênica comparada com suas quase isogênicas sem modificação independentemente da aplicação do glifosfato, entretanto estes estudos avaliaram a planta (broto e raiz) e não as sementes. Todavia, o artigo levanta a possibilidade da menor biomassa disponível observada nesses cultivares representar efeito secundário à diminuição de parâmetros fotossintéticos bem como da menor disponibilidade de nutrientes para os tecidos (ZOBIOLO, 2010).

Charanek (2006) avaliou a soja convencional e transgênicas e observou menores teores de Al e Fe para as últimas embora seu trabalho tenha sido desenvolvido a fim de buscar o melhor método de avaliação de minerais nesse tipo de matriz, mesmo assim, houve o desvio padrão de $\pm 10\%$ dentro da mesma amostra (CHARANEK, 2006). Estes resultados contradizem os do presente estudo onde se obteve valores significativamente maiores de ferro para os cultivares transgênicos.

Vieira, Cabral e Paula (1999) avaliaram seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana e observaram o K, enquanto mineral mais abundante entre todos os cultivares, com um teor máximo de 1824,02 mg/100g para a cultivar Iguaçu, e mínimo de 1567,05 mg/100g para a cultivar EMBRAPA-4. Os teores de P, Ca e Mg variaram de 454,71 a 503,84 mg/100g, de 170,19 a 313,93 mg/100g e de 214,36 a 259,97 mg/100g, respectivamente. As concentrações de Fe, Mn e Na apresentaram variações entre 13,39 e 19,12 mg/100g, 1,75 e 2,79 mg/100g, e 11,73 e 12,08 mg/100g, respectivamente. Neste trabalho, a elevada variação nos teores de minerais entre os cultivares estudados pode estar relacionada com as condições de cultivo, clima, solo e adubação. Foi possível observar ainda, que para ambos os minerais, os valores observados nesse estudo foram inferiores aos encontrados por Vieira, Cabral e Paula (1999) em suas amostras. Todavia, não foi possível

determinar os mecanismos envolvidos nesta diferenciação. Os resultados obtidos na análise de macro e micro minerais estão dispostos nas Tabela 24 e Tabela 25, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Considerada importante fonte de minerais, como K, Fe e Ca, foi relevante observar nos cultivares de soja estudados, diferença significativa para K e Fe entre os grupos (transgênicos e não transgênicos), sendo que os cultivares os quais foram submetidos à modificação gênica apresentaram menores teores de K e, em contrapartida, maiores teores de Fe. O potássio foi o elemento mineral presente em maior quantidade nas amostras, confirmando a soja como fonte importante deste elemento. Entretanto K e Fe, diferiram da bibliografia citada sendo que ambos minerais foram quantificados nas amostras do presente estudo em teores inferiores aos previamente relatados.

Embora tenhamos vislumbrado diferença entre os grupos para alguns minerais esta também fortemente observada dentro do grupo o que pode ser justificado por diversidades de cultivar, forma e local de cultivo.

Tabela 24: Perfil de macrominerais em sojas transgênicas e convencionais, cultivadas e comercializadas em MG, em 2011

Mineral Amostras	Cálcio	Magnésio	Fósforo mg/Kg	Sódio	Potássio
Favorita-S2 (T)	1606,12±87,38 ^{b,c}	1789,75±127,48 ^b	4728,30±153,29 ^{c,d}	100,12±7,74 ^{a,b}	14281,81±1917,94 ^a
Valiosa-S2 (T)	1419,50±43,96 ^{b,c}	2049,40±20,84 ^{a,b}	5698,98±31,23 ^{a,b}	131,53±13,65 ^{a,b}	12119,69±756,75 ^a
850-S2 (T)	1655,84±591,21 ^{b,c}	1689,52±571,29 ^b	3736,44±60,59 ^e	113,54±15,95 ^{a,b}	12280,15±65,39 ^a
811-S2 (T)	1101,81±446,06 ^c	1730,69±610,22 ^b	5718,49±273,91 ^{a,b}	121,72±27,63 ^{a,b}	13544,75±1144,75 ^a
750-C1 (T)	2167,74±259,42 ^{a,b}	2854,71±326,47 ^a	5252,64±105,52 ^{b,c}	121,06±7,02 ^{a,b}	12307,43±1127,58 ^a
740-C1 (T)	2908,53±52,14 ^a	2464,76±67,56 ^{a,b}	4980,12±15,43 ^{b,c,d}	145,51±5,91 ^a	12851,25±286,19 ^a
Comercial 1 (C)	1240,22±37,37 ^c	2349,18±39,77 ^{a,b}	5372,40±489,95 ^b	123,65±3,23 ^{a,b}	15158,29±3040,44 ^a
Comercial 2 (C)	2971,15±124,07 ^a	2625,78±99,17 ^{a,b}	4620,21±87,41 ^d	148,18±13,36 ^a	13605,48±706,93 ^a
Comercial 3 (C)	1560,34±459,13 ^{b,c}	1900,22±510,69 ^b	5978,96±125,24 ^a	107,94±12,42 ^{a,b}	12797,47±352,74 ^a
Comercial 4 (C)	1796,07±249,56 ^{b,c}	2201,59±296,17 ^{a,b}	5694,39±267,23 ^{a,b}	85,39±35,62 ^b	15302,11±610,67 ^a
Comercial 5 (C)	1928,78±192,67 ^{b,c}	2288,56±166,66 ^{a,b}	6151,77±139,01 ^a	133,06±4,99 ^{a,b}	15536,83±140,98 ^a
Comercial 6 (C)	1618,48±49,27 ^{b,c}	2279,14±36,10 ^{a,b}	4935,65±174,28 ^{b,c,d}	117,89±15,93 ^{a,b}	13825,31±160,56 ^a
Média ST	1809,92±660,59 ^A	2096,47±540,80 ^A	5019,16±704,64 ^A	123,29±16,43 ^A	12897,52±1209,12 ^B
Média SC	1852,50±593,35 ^A	2274,08±306,96 ^A	5458,90±601,02 ^A	118,31±26,89 ^A	14370,91±1518,34 ^A
Média Total	1831,21±619,21	2185,28±442,64	5239,03±682,89	120,80±22,11	13634,22±1545,34

T=Transgênicas; C=Convencionais; ST= Sojas Transgênicas agrupadas; SC=Sojas Convencionais agrupadas. Valores médios (± desvio padrão) com uma mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas, comparação entre as amostras por mineral. Letras maiúsculas, comparação entre sojas transgênicas e comerciais por mineral.

Tabela 25: Perfil de microminerais em sojas transgênicas e convencionais, cultivadas e comercializadas em MG, em 2011

Mineral	Bário	Cobre	Cromo	Ferro	Manganês	Zinco
Amostras	mg/Kg					
Favorita-S2 (T)	5,93±0,36 ^c	91,19±4,56 ^a	0,42±0,10 ^b	101,73±6,48 ^b	21,15±1,32 ^{a,b,c,d}	98,49±0,24 ^a
Valiosa-S2 (T)	4,93±0,17 ^c	13,77±0,31 ^{b,c}	0,43±0,15 ^b	74,33±0,75 ^{f,g}	21,10±0,03 ^{a,b,c,d}	56,54±0,49 ^{b,c}
850-S2 (T)	24,57±7,86 ^a	11,89±1,91 ^{b,c}	0,61±0,27 ^b	127,38±8,79 ^a	22,53±7,09 ^{a,b,c}	44,96±6,09 ^{d,e}
811-S2 (T)	5,44±0,38 ^c	12,75±0,53 ^{b,c}	0,53±0,14 ^b	94,16±3,34 ^{b,c,d}	12,93±4,06 ^d	50,74±3,37 ^{b,c,d}
750-C1 (T)	12,04±2,51 ^{b,c}	11,59±1,48 ^{b,c}	0,61±0,16 ^b	78,6±1,75 ^{e,f,g}	15,64±2,01 ^{c,d}	47,13±7,64 ^{c,d,e}
740-C1 (T)	5,51±0,27 ^c	12,18±0,3 ^{b,c}	0,19±0,07 ^b	93,52±1,06 ^{b,c,d,e}	16,72±0,07 ^{b,c,d}	41,93±3,23 ^{d,e}
Comercial 1 (C)	5,98±0,23 ^c	15,92±0,54 ^b	0,50±0,17 ^b	82,53±11,35 ^{d,e,f,g}	23,16±0,63 ^{a,b,c}	45,76±5,33 ^{c,d,e}
Comercial 2 (C)	11,98±0,38 ^{b,c}	12,63±0,16 ^{b,c}	0,98±0,63 ^b	86,19±1,43 ^{c,d,e,f}	29,25±1,1 ^a	46,92±1,82 ^{c,d,e}
Comercial 3 (C)	11,78±3,66 ^{b,c}	9,48±2,57 ^c	0,73±0,39 ^b	75,19±2,76 ^{f,g}	15,07±3,91 ^{c,d}	56,22±1,14 ^{b,c}
Comercial 4 (C)	12,57±2,22 ^{b,c}	10,87±1,74 ^{b,c}	0,55±0,11 ^b	70,82±3,95 ^g	17,71±2,56 ^{b,c,d}	51,37±3,07 ^{b,c,d}
Comercial 5 (C)	15,72±2,08 ^b	11,97±1,20 ^{b,c}	0,64±0,23 ^b	77,66±1,27 ^{f,g}	17,91±1,92 ^{b,c,d}	60,20±1,02 ^b
Comercial 6 (C)	6,3±0,95 ^c	14,96±0,29 ^b	1,18±0,43 ^a	99,22±4,73 ^{b,c}	24,53±0,15 ^{a,b}	38,72±2,38 ^e
Média ST	9,74±7,80 ^A	25,56±30,26 ^A	0,46±0,20 ^B	94,95±18,23 ^A	18,34±4,61 ^A	56,63±20,18 ^A
Média SC	10,72±3,96 ^A	12,64±2,57 ^A	0,76±0,40 ^A	81,94±10,49 ^B	21,27±5,29 ^A	49,87±7,65 ^A
Média Total	10,23±6,12	19,10±22,16	0,61±0,35	88,44±16,08	19,81±5,11	53,25±15,43

T=Transgênicas; C=Convencionais; ST= Sojas Transgênicas agrupadas; SC=Sojas Convencionais agrupadas. Valores médios (± desvio padrão) com uma mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas, comparação entre as amostras por mineral. Letras maiúsculas, comparação entre sojas transgênicas e comerciais por mineral.

CAPÍTULO 3 ANÁLISE DE ISOFLAVONAS EM SOJA POR CLAE

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse por compostos bioativos trouxe à tona a soja enquanto fonte de isoflavonas. Estes compostos têm sido amplamente estudados tendo efeitos comprovados em sintomas da menopausa e ainda em doenças crônicas, a exemplo o câncer. Conhecidamente os teores de isoflavonas variam por influência de diversos fatores, entre eles os fatores genéticos. E embora a modificação gênica realizada nos cultivares estudados neste trabalho não tenha sido visando alteração destes teores, buscamos verificar se houve influência da transgenia nos teores de isoflavonas comparando os dois grupos , sojas convencionais e geneticamente modificadas.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o teor de isoflavonas em amostras de soja em grão comercializadas no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais; e geneticamente modificadas colhidas na região de Minas Gerais;
- Comparar os resultados obtidos para amostras transgênicas e comerciais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Laboratório

As análises de determinação do perfil de isoflavonas foram realizadas no Núcleo temático de Utilização, Pós Colheita e Segurança Alimentar, Embrapa Soja - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Londrina do Paraná

3.1.1 Amostras

Foram obtidos dois grupos amostrais de matérias-prima (soja em grão). O primeiro, conhecidamente transgênico foi fornecido pela COPAMIL (Cooperativa Agrícola Mista Iraí Ltda) sendo composto por seis cultivares diferentes. O segundo, obtido no

comércio local, foi composto por seis amostras de diferentes empresas fornecedoras aleatoriamente em um total de um quilo por amostra.

As amostras de matérias-prima (soja em grão) comerciais utilizadas no preparo da farinha desengordurada de soja, segundo fornecedor e lote, foram listadas na Tabela 12.

As amostras de grãos de soja transgênicas utilizadas no preparo da farinha desengordurada foram listadas segundo denominação no experimento, cultivar, evento e safra na Tabela 18.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo das Amostras

As amostras foram trituradas em micro-moinho analítico (TEO20, Tecnal, São Paulo). Posteriormente, desengorduradas com n-hexano padrão analítico “*overnight*” sob agitação e à temperatura ambiente. Em cadinhos filtrantes, com papel de filtro, dispostas em sistema de filtração à vácuo para fibras adaptado a um kitasato, as suspensões das amostras moídas e do solvente extrator foram filtradas à vácuo. Procedeu-se a evaporação do solvente restante levando os papéis de filtro contendo as amostras filtradas em placas de Petri para a capela de exaustão. As amostras desengorduradas e secas foram armazenadas em frascos para posterior extração.

A extração das isoflavonas foi realizada em tubos de ensaio com tampa rosqueável, adicionados 100 mg da amostra desengordurada, 4,0 mL do solvente extrator (solução de etanol a 70% contendo 0,1% de ácido acético), e procedeu-se a extração por uma hora, com agitação de 15 em 15 minutos, por alguns segundos em agitador de tubos do tipo "Vortex" (Marconi, Modelo PA 162). Os tubos contendo as amostras e solução extratora foram sonicados por 30 minutos à temperatura ambiente, foi pipetado 1,5 mL do sobrenadante e transferido para tubos do tipo "Eppendorff" de 2,0 mL, centrifugou-se em microcentrífuga Eppendorff (BR41, Joule) a 18407 g por 15 minutos numa temperatura de 5°C. Foram filtrados cerca de 500µL do sobrenadante através de membrana do tipo "Millipore", com poros de 45 µm de diâmetro, pipetou-se 500 µL que foram transferidos para os micro-tubos ("incerts") do autoinjeter de amostras do cromatógrafo líquido. Utilizou-se 20 µL do extrato

(volume de injeção) para a análise de quantificação das isoflavonas (CARRÃO PANIZZI et al., 2002).

3.2.2 Análise de isoflavonas em soja por CLAE

A separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas de acordo com as modificações na metodologia preconizada por Berhow (2002), em um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, equipado com bombas modelo W 600, injetor automático de amostras modelo W 717 plus. Para a separação das isoflavonas, adotou-se o sistema de gradiente linear binário, tendo como fases móveis: 1) metanol contendo 0,025% ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e 2) água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, que aos 40 minutos atingiu a concentração de 100% para, em seguida, retornar a 20% aos 41 minutos e permaneceu nestas condições até os 60 minutos. A Tabela 26 resume as condições de análise.

Tabela 26: Condições de análise de isoflavonas por CLAE em grão de soja

Condições	Valores
Coluna de fase reversa	ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column) (250mm de comprimento x 0,4mm de diâmetro interno e partículas de 5 µm)
Tempo de análise	60 minutos
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min
Temperatura	25°C
Padrão	Doze isoflavonas (daidzeína, gliciteína, genisteína, manolildaidzina, manoilglicitina, manoilgenistina, acetildaidzina, acetilglicitina, acetilgenistina, glicosildaidzina, glicosilglicitina e glicosilgenistina)
Detector	Arranjo de fotodiodos marca Waters, modelo W 996
Ajuste do detector	Comprimento de onda de 260 nm

Para a identificação dos picos correspondentes a cada uma das 12 formas diferentes de isoflavonas foram utilizados padrões de: daidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glicitina, gliciteína e, também, padrões das formas acetil e malonil, das marcas Sigma e Fuji Company, solubilizados em metanol (grau CLAE), nas seguintes concentrações: 0,00625; 0,0125; 0,0250; 0,0500 e 0,1000 mg/mL. Para a quantificação das 12 formas de isoflavonas, por padronização externa (área dos picos), foram utilizados os padrões como referência. A identificação dos picos correspondentes a cada uma das 12 formas de isoflavonas nas amostras analisadas foi feita por meio da comparação dos tempos de retenção de cada um dos 12 padrões, bem como pelos espectros de cada um deles (BERHOW, 2002). Com limite de detecção de 1,5 ppm e de quantificação e de 4,5 ppm.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os teores de isoflavonas foram obtidos por comparação das áreas dos picos de cada isoflavona na amostra com os picos dos seus respectivos padrões. Nas figuras 10A e 10B estão exemplificados cromatogramas dos padrões de isoflavonas e de uma amostra de soja respectivamente.

As isoflavonas daidzeína tanto na conformação aglicona quanto glicosídica não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparamos entre si os grupos amostrais de sojas transgênicas e convencionais, o que está de acordo com o observado por Zhou e colaboradores (2011). Os autores não encontraram diferença significativa entre sojas transgênicas ou não para essas isoflavonas e puderam atribuir a variação observada à região de plantio e diferenças entre os cultivares. Estes achados são consistentes com a alegação de que a inserção do novo gene não deve levar a efeito além daquele a que se propõe, no caso da soja RR, resistência ao glifosfato.

Em contrapartida, quando comparamos as demais isoflavonas nas variedades transgênicas e não transgênicas observamos diferença significativa ($p < 0,05$), apesar da grande variabilidade intragrupo observada (Tabela 27). Malonil glicosídeos glicitina apresentaram valores de $21,91 \pm 2,68$ mg/100g e $15,95 \pm 8,91$ mg/100g e malonil glicosídeos genistina $206,16 \pm 25,43$ mg/100g e $113,32 \pm 46,22$

mg/100g para ST e SC, respectivamente. No presente estudo não foram detectadas e, portanto, quantificadas as isoflavonas de radical acetil e a gliciteína aglicona.

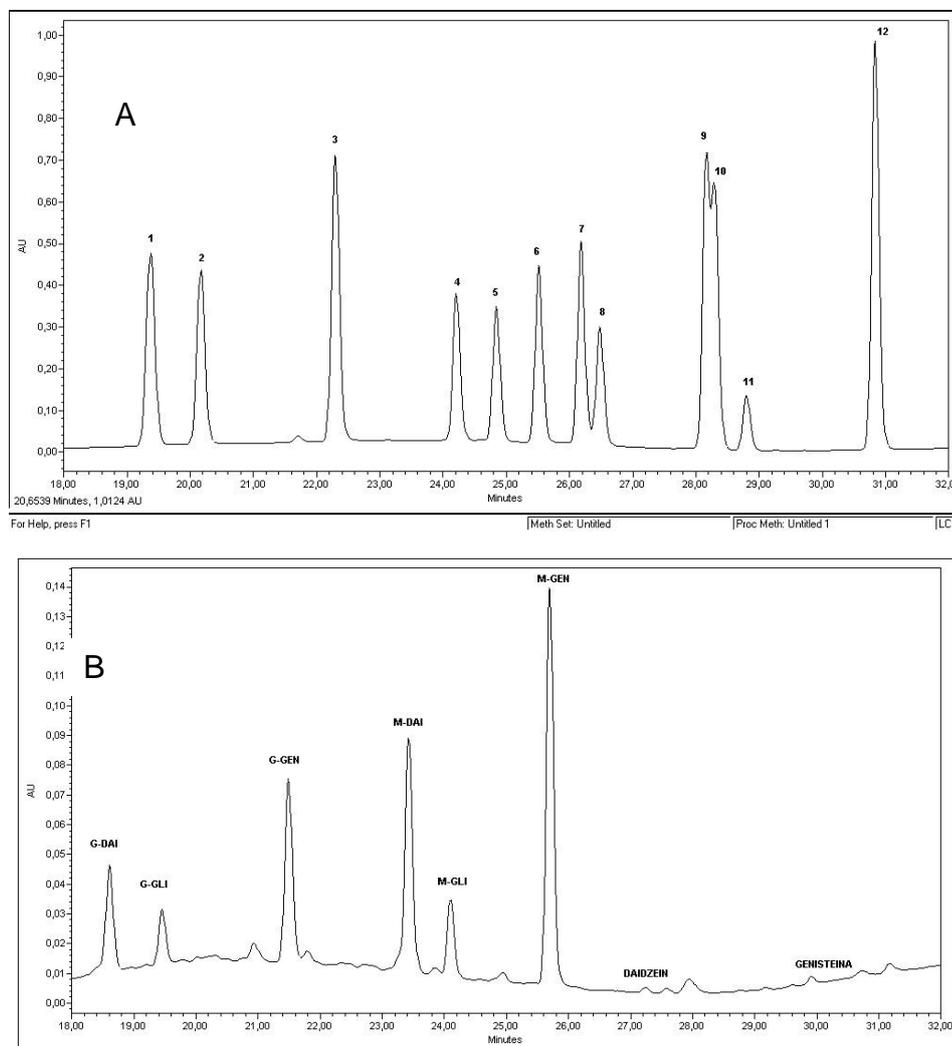


Figura 10: Perfil cromatográfico de isoflavonas em padrões e amostra de soja

Na Figura 10A os picos representam: glicosil-daidzeína (1), glicosil-gliciteína (2), glicosil-genisteína, malonil-daidzeína (4), malonil-gliciteína (5), acetil-daidzeína (6), acetil-gliciteína (7), malonil-genisteína (8), acetil-genisteína (9), daidzeína(10), gliciteína (11) e genisteína (12). As formas acetil não aparecem nos cromatogramas de grãos de soja sem tratamento térmico. Na Figura 10B as três primeiras áreas são do padrão interno de isoflavonas glicosiladas, as três seguintes com radical manoil e as duas últimas agliconas. (CLAE - Injeção automática, temperatura 25°C. Separação por sistema de gradiente linear binário, tendo como fases móveis: 1) metanol contendo 0,025% ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e 2) água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, que aos 40 minutos atingiu a concentração de 100% para, em seguida, retornar a 20% aos 41 minutos e permanecer nestas condições até os 60 min. Coluna de fase reversa ODS C18 (250 mm de comprimento x 0,4mm de diâmetro interno e partículas de 5µm). Tempo de análise 60 minutos. Vazão da fase móvel, 1,0 mL/min. Monitorado por arranjo de fotodiodos a 260 nm.

Tabela 27: Perfil de Isoflavonas em grão de soja cru, convencional e transgênicos, comercializados e cultivados em MG, em 2011

Amostras	GDAI	GGLI	GGEN	MDAI	MGLI	MGEN	DAI	GEN
Favorita-S2	69,72±4,36 ^c	8,91±0,59 ^d	47,60±3,12 ^c	189,87±1,07 ^b	24,36±1,20 ^b	239,95±6,10 ^a	6,53±0,27 ^c	4,34±0,14 ^d
Valiosa-S2	49,35±0,85 ^e	5,71±0,14 ^e	29,29±0,75 ^g	200,31±5,63 ^a	22,56±0,96 ^{b,c}	223,06±3,38 ^b	2,32±0,00 ^g	1,13±0,02 ^h
850-S2	65,29±0,40 ^{c,d}	5,61±0,20 ^e	41,99±0,03 ^d	185,79±0,10 ^{b,c}	17,10±0,18 ^d	224,50±5,53 ^b	5,58±0,19 ^d	3,22±0,01 ^e
811-S2	33,72±0,87 ^f	5,68±0,31 ^e	25,80±0,16 ^g	135,89±3,55 ^e	21,45±0,38 ^c	187,51±2,25 ^c	2,17±0,02 ^g	1,64±0,01 ^g
750-C1	62,31±0,11 ^d	9,32±0,07 ^{c,d}	38,81±0,13 ^{d,e}	160,54±0,08 ^d	21,27±0,00 ^c	189,10±0,24 ^c	6,51±0,01 ^c	4,08±0,08 ^d
740-C1	52,00±0,25 ^e	9,98±0,00 ^c	38,35±0,26 ^{d,e,f}	129,97±0,24 ^e	24,75±0,38 ^b	172,82±0,43 ^d	4,58±0,01 ^e	3,28±0,05 ^e
Comercial 1	51,13±0,20 ^e	9,96±0,03 ^c	34,16±0,03 ^f	181,31±2,40 ^c	33,21±1,16 ^a	192,89±1,15 ^c	3,36±0,06 ^f	2,07±0,04 ^f
Comercial 2	23,37±0,33 ^g	5,68±0,23 ^e	27,07±0,03 ^g	26,61±0,12 ⁱ	7,07±0,05 ^e	50,63±0,13 ^h	1,52±0,07 ^h	1,83±0,09 ^{f,g}
Comercial 3	98,50±0,67 ^a	15,28±0,30 ^b	87,92±1,49 ^a	82,59±0,53 ^f	15,59±0,29 ^d	128,67±0,74 ^e	11,16±0,18 ^a	7,93±0,02 ^a
Comercial 4	92,11±1,43 ^b	16,42±0,16 ^a	77,98±1,18 ^b	68,80±0,57 ^g	15,71±0,01 ^d	105,08±1,26 ^f	9,74±0,01 ^b	6,80±0,08 ^b
Comercial 5	99,11±0,15 ^a	15,47±0,01 ^{a,b}	85,73±0,46 ^a	79,80±0,73 ^f	15,87±0,24 ^d	122,53±0,45 ^e	9,47±0,01 ^b	6,05±0,13 ^c
Comercial 6	38,62±0,08 ^f	5,76±0,12 ^e	35,59±0,04 ^{e,f}	49,25±0,32 ^h	8,26±0,19 ^e	80,15±0,22 ^g	5,30±0,07 ^d	4,28±0,04 ^d
Média ST	55,40±12,64 ^A	7,53±1,99 ^B	36,97±7,77 ^B	167,06±28,25 ^A	21,91±2,68 ^A	206,16±25,43 ^A	4,61±1,88 ^A	2,95±1,24 ^B
Média SC	67,14±31,95 ^A	11,43±4,74 ^A	58,08±27,28 ^A	81,40±50,78 ^B	15,95±8,91 ^B	113,32±46,22 ^B	6,76±3,74 ^A	4,83±2,41 ^A
Média Total	61,27±24,51	9,48±4,07	47,53±22,38	124,23±59,41	18,93±7,12	159,74±59,83	5,69±3,09	3,89±2,10

T=Transgênicas; C=Convencionais; ST= Sojas Transgênicas agrupadas; SC=Sojas Convencionais agrupadas. GDAI=Glicosil-daidzeína; GGLI=Glicosil-gliciteína; GGEN=Glicosil-genisteína; MDAI=Manoil-daidzeína; MGLI= Manoil-gliciteína; MGEN= Manoil-genisteína; DAI= daidzeína e GEN= genisteína. Valores médios (± desvio padrão) com uma mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas, comparação entre as amostras por isoflavona. Letras maiúsculas, comparação entre sojas transgênicas e comerciais por isoflavona. As demais isoflavonas não apresentaram quantidades detectáveis nas amostras. Dados apresentados em mg/100g de amostra desengordurada.

Os teores observados de genisteína aglicona foram $2,95 \pm 1,24$ mg/100g para transgênicas e $4,83 \pm 2,41$ mg/100g para convencionais. A grande amplitude de conteúdos de isoflavonas nas sojas transgênicas e especialmente nas comerciais, demonstrada nos gráficos de dispersão Apêndice I, pode ter interferido nessa significância. Essa variação de teores de isoflavonas nas sojas comerciais pode ser explicada pelo potencial de heterogeneidade, tanto no que diz respeito a genótipo quanto a local de plantio, época, condições de cultivo e mesmo de armazenamento.

Quando as isoflavonas foram agrupadas segundo seu radical, e as amostras, segundo alteração gênica, pode se observar diferença significativa apenas para as formas manolil onde as sojas transgênicas apresentaram, em média, maiores teores de isoflavonas com este radical, como podemos visualizar na Tabela 28.

Os resultados observados no presente estudo para os diferentes cultivares estudados não estavam de acordo com o observado por Barbosa e colaboradores (2006), onde os autores encontraram proporções de isoflavonas totais iguais a: 42,8 e 39,1% β -glicosídeos, 52,5 e 50,6% malonilglicosídeos, 4,0 e 7,2% agliconas e 1,0 e 2,9% acetilglicosídeos; para grãos de soja e farinha desengordurada respectivamente, enquanto os nossos resultados demonstraram médias de 19,82 e 38,61% β -glicosídeos, 78,68 e 58,11% malonilglicosídeos, 1,49 e 3,28% agliconas e ausência de acetilglicosídeos para grão de soja transgênicos e comerciais respectivamente. Os dados obtidos por Carrão-Panizzi, Simão e Kikuchi (2003), entretanto, se assemelham com os nossos resultados para soja transgênicas quando os resultados para grãos cru foram convertidos em porcentagem de isoflavonas totais (19,15; 79,26 e 1,55%). Bavia e colaboradores (2012) utilizando a mesma metodologia encontraram valores variados para diferentes cultivares e a proporção nos grãos cru variando: β -glicosídeos de 37,9 a 47,8 %; Malonilglicosídeos: 40,8 a 48,1% e Agliconas: de 11,4 a 16,7% Isoflavonas totais de 89,63 a 200,24 mg/110g base seca. Santana e colaboradores (2012) avaliaram o cultivar BRS 267 colhido em 2 estágios de maturação diferenciados 17,35 - 36,07/ 82,17 - 61,79 e 0,47 - 2,14 do total de isoflavonas 186,94-270,27 mg/100g que também aumentou com o estágio de maturação das vagens.

No que tange especificamente os compostos agliconas, os quais possuem melhor absorção, os valores encontrados em nosso estudo assemelham-se aos obtidos por Benedetti (2010) para farinha desengordurada de soja, onde representam 1,8 % do teor de isoflavonas totais (BENEDETTI, 2010). Todavia, a média total de agliconas 9,6 mg/100g é semelhante à global encontrada por Silva e colaboradores (2012) (9,19mg/100g) e está além do relatado por Carrão-Panizzi, Simão e Kikuchi (2003) em seu experimento (4,0 mg/100 g).

Tabela 28: Perfil de Isoflavonas agrupadas por radical em Grãos de soja cru, transgênicas e convencionais

Amostras	Manoilil	β -Glicosídeos	Agliconas	Totais
Favorita-S2	454,19 \pm 5,97 ^a	126,23 \pm 8,07 ^c	10,87 \pm 0,40 ^d	591,29 \pm 14,44 ^a
Valiosa-S2	445,92 \pm 12,12 ^a	84,35 \pm 1,45 ^g	3,45 \pm 0,02 ⁱ	533,73 \pm 13,56 ^{b,c}
850-S2	427,39 \pm 3,10 ^b	112,89 \pm 0,63 ^d	8,80 \pm 0,18 ^f	549,08 \pm 3,55 ^b
811-S2	344,85 \pm 6,18 ^e	65,20 \pm 1,34 ^h	3,81 \pm 0,03 ⁱ	413,86 \pm 7,55 ^{f,g}
750-C1	370,91 \pm 0,32 ^d	110,44 \pm 0,17 ^{d,e}	10,59 \pm 0,09 ^d	491,94 \pm 0,58 ^d
740-C1	327,53 \pm 1,06 ^e	100,33 \pm 0,50 ^{e,f}	7,86 \pm 0,04 ^g	435,72 \pm 1,59 ^{e,f}
Comercial 1	407,41 \pm 4,71 ^c	95,25 \pm 0,25 ^f	5,43 \pm 0,03 ^h	508,09 \pm 4,43 ^{c,d}
Comercial 2	84,30 \pm 0,20 ⁱ	56,13 \pm 0,58 ^h	3,36 \pm 0,02 ⁱ	143,78 \pm 0,77 ⁱ
Comercial 3	226,84 \pm 1,57 ^f	201,69 \pm 0,53 ^a	19,09 \pm 0,15 ^a	447,63 \pm 1,19 ^e
Comercial 4	189,59 \pm 0,70 ^g	186,51 \pm 2,77 ^b	16,54 \pm 0,08 ^b	392,64 \pm 3,40 ^g
Comercial 5	218,21 \pm 1,42 ^f	200,32 \pm 0,62 ^a	15,52 \pm 0,15 ^c	434,05 \pm 1,90 ^{e,f}
Comercial 6	137,67 \pm 0,74 ^h	79,97 \pm 0,24 ^g	9,58 \pm 0,11 ^e	227,22 \pm 0,39 ^h
Média T	395,13 \pm 52,06 ^A	99,91 \pm 21,12 ^A	7,56 \pm 3,10 ^A	502,60 \pm 65,63 ^A
Média C	210,67 \pm 105,12 ^B	136,65 \pm 63,51 ^A	11,59 \pm 6,12 ^A	358,90 \pm 135,21 ^B
Média Total	302,90 \pm 124,33	118,28 \pm 49,95	9,58 \pm 5,17	430,75 \pm 127,24

T=Transgênicas; C=Convencionais; ST= Sojas Transgênicas agrupadas; SC=Sojas Convencionais agrupadas. Valores médios (\pm desvio padrão) com uma mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas, comparação entre as amostras por isoflavona. Letras maiúsculas, comparação entre sojas transgênicas e comerciais por isoflavona. As demais isoflavonas não apresentaram quantidades detectáveis nas amostras. Dados apresentados em mg/100g de amostra desengordurada.

Todavia, alguns autores afirmam que as variações encontradas nos teores de isoflavonas estão mais relacionadas com o genótipo, tipo de solo, temperatura ou

outras condições adversas no cultivo do que ao fato de ter-se alterado a resistência do herbicida glifosato (PADGETTE et al., 1996; DUKE et al., 2003; McCANN et al., 2005 e BHOM, 2008).

5 CONCLUSÕES

No que tange aos aspectos relacionados ao perfil de isoflavonas, embora tenha sido observado um amplo espectro de variação, houve diferença significativa para genisteína, composto mais biologicamente ativo, os quais foram estatisticamente inferiores para as sojas transgênicas. Todavia, foi observado também diferença estatística para isoflavonas totais onde as variedades GM apresentaram maior teor. Cabe, então, ponderar a avaliação desta resposta isolada, uma vez que, no organismo, isoflavonas com radical podem ser convertidas em aglicona.

Considerando a subdivisão de isoflavonas por radical, a diferença significativa observada para isoflavonas manolil, para a qual as sojas geneticamente modificadas apresentaram teores mais elevados, se considerarmos que as isoflavonas foram quantificadas no grão cru e que o tratamento térmico auxilia na conversão destas na forma aglicona, pode-se inferir que ao final do processamento, as sojas GM poderão apresentar também maiores teores de isoflavonas agliconas.

Sendo ainda que a variação intra-grupo tenha sido elevada, sobretudo para as sojas adquiridas no comércio, o presente estudo trouxe mais uma vez a tona a discussão acerca da equivalência substancial entre cultivares convencionais e transgênicos. Uma vez que pode ser observada diferença entre os grupos.

Com relação aos resultados gerais os teores das isoflavonas glicosil daidzeína e glicosil genisteína foram maiores, para ambos os grupos, do que observado na literatura, o mesmo ocorreu para a daidzeína aglicona. Manolil daidzenína e manolil genisteína estavam acima dos resultados relatados na literatura, apenas no grupo transgênico, enquanto que a genisteína aglicona esteve acima apenas para a soja comercial. Ao agruparmos as isoflavonas por radical, encontrou-se valores acima do descrito na literatura para os grupos no radical manolil e isoflavonas totais.

Finalmente, agrupando-se por isoflavona (daidzeína, gliciteína e genisteína), todos os resultados obtidos estiveram acima dos trabalhos revisados, encontrados na Tabela 10 para grãos de soja.

CONCLUSÕES INTEGRADAS E SUGESTÕES

Ao avaliar a composição química de variedades transgênicas tem se discutido a importância da comparação da variedade geneticamente modificada com seu análogo convencional, preferencialmente de linhagem parental direta, o que nem sempre é possível. Destaca-se, ainda, a importância da submissão às mesmas condições ambientais para a análise de equivalência substancial, e que ainda seria necessário submeter estes cultivares a condições adversas, pareadas, para verificar se realmente não houve modificação das rotas metabólicas.

A relevância do presente estudo não encontra-se apenas em avaliar a equivalência de cultivares de soja convencionais e transgênicas quase isogênicas, mas, sim, comparar os cultivares mais comercializados na região para os dois tipos de culturas (convencional e geneticamente modificada), avaliando, assim, a condição do produto ao qual o consumidor tem acesso rotineiramente.

Os resultados deste trabalho demonstraram que as amostras de grão disponíveis no mercado estavam sim de acordo com seus rótulos, os quais declaravam ausência de transgenia. E que, embora não fosse observada para todos elementos avaliados, ao agruparmos as amostras em convencionais e transgênicas foi verificada diferença significativa para alguns fatores estudados, indicando, portanto, a necessidade de mais estudos no intento de determinar qual a real influência desta modificação gênica nessas rotas.

Podemos assim reiterar a necessidade de novos estudos com grupos formados de forma pareada, onde as sojas convencionais seriam submetidas às mesmas condições de cultivo que seu par quase isogênico. Assim se tornaria possível uma comparação mais direta da influência da inserção do novo gene e não derivada de outras influências.

Embora não seja a intenção debater a favor ou contra de cultivares transgênicos e convencionais, o presente ressalta a relevância de mais estudos que verifiquem a equivalência substancial entre estas variedades não apenas para macro e micro

nutrientes, mas também envolvendo substâncias biologicamente ativas de interesse, como no caso da soja as isoflavonas.

REFERÊNCIAS

- AB - Applied Biosystems. **TaqMan® Genetically Modified Organism (GMO) Detection Kits: User Guide.** Disponível em: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_041223.pdf Acesso em: 20 nov. 2011.
- AKASHI, T.; AOKI, T.; AYABE, S. Cloning and Functional Expression of a Cytochrome P450 cDNA Encoding 2-Hydroxyisoflavanone Synthase Involved in Biosynthesis of the Isoflavonoid Skeleton in Licorice. **Plant Physiology**, v. 121, p. 821-828, nov. 1999.
- ALBUQUERQUE, T.C.S. **Adubação mineral da videira.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2011.
- ALEZANDRO, Marcela Roquim. **Determinação de isoflavonas e capacidade antioxidante de alimentos industrializados à base de soja e/ou produtos derivados consumidos no Brasil.** 2009. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos - Área Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ALEZANDRO, M.R.; ALMEIDA, S.A.; MAIA, P.P.; CARVALHO, H.A.; AZEVEDO, L.; VIEIRA, E.P. Soja transgênica BRS 243 RR: determinação de macronutrientes e das isoflavonas daidzeína e genisteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.28, n.3, p.520-526, 2008.
- AMATO, Angélica Amorim. **Investigação da Atividade Farmacológica de Benzilideno-E-Acridinilideno e de Isoflavonas nos Receptores Alfa, Beta/Delta e Gama Ativados por Proliferadores Peroxissomais.** Orientador: Francisco de Assis Rocha Neves. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Ciência da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- ANDERSON, R.L. e WOLF, W. J. Compositional Changes in Trypsin Inhibitors, Phytic Acid, Saponins and Isoflavones Related to Soybean Processing. **The Journal of Nutrition.** Suplemento: p.581S-588S, 1995.
- ANDRADE, G.J.M. e ROSOLEM, C.A. Absorção de manganês em soja RR sob efeito do glifosate. **R. Bras. Ci. Solo**, v.35, p.961-968, 2011.
- BALK, E; CHUNG, M; CHEW, P; IP, S; RAMAN, G; KUPELNICK, B; TATSIONI, A; SUN, Y; WOLK, B; DEVINE, D; LAU, J. **Effects of Soy on Health Outcomes.** AHRQ (Agency for Healthcare Research and Quality) Publication, n. 05-E024-1. Rockville, Jul. 2005.
- BARBOSA, Maria Cristina de Albuquerque. **Avaliação tecnológica de massas alimentícias de Farinha mista de trigo e soja em lipoxigenases.** 2002. 100f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

BARBOSA, A.C.L.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.4, p.921-926, Campinas, 2006

BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. **J Nutr.** v.125, p. 777S–783S, 1995.

BARNES, S. The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones. In: Soybeans and their Food Products. **Lymphatic Research and Biology.** v.8, n.1, p. 89-98, 2010.

BAVIA, A.C.F.; SILVA, C.E.; FERREIRA, M.P.; SANTOS-LEITE, R.; MANDARINO, J.M.G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. Chemical composition of tempeh from soybean cultivars specially developed for human consumption. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, V. 32, n.3, p.613-620, jul.-set., Campinas, 2012.

BELLALOU, N; REDDY, K.N; ZABLOTOWICZ, R.M; MENGISTU, A. **Simulated Glyphosate Drift Influences Nitrate Assimilation and Nitrogen Fixation in Non-Glyphosate-Resistant Soybean.** **J. Agric. Food Chem.** v. 54, 3357-3364, 2006.

BENEDETTI, Silvia. **Efeito do tratamento térmico em isoflavonas concentradas por nanofiltração.** 2010.103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos - área de concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

BERHOW, M. A. **Modern analytical techniques for flavonoid determination.** In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (ed.). *Flavonoids in the living cell.* New York: Kluser Academic, 2002. p.61-76.

BERMAN, K.H.; HARRIGAN, G.G.; RIORDAN, S.G.; NEMETH, M.A.; HANSON, C.; SMITH, M.; SORBET, R.; ZHU, E.; RIDLEY, W.P. Compositions of Forage and Seed from Second-Generation Glyphosate-Tolerant Soybean MON 89788 and Insect-Protected Soybean MON 87701 from Brazil Are Equivalent to Those of Conventional Soybean (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.*, v.58, p. 6270–6276, 2010.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**, 1° ed., Lewis Publishers/CRC Press, 295p. Flórida, 2003.

BOTT, S.; TEFAMARIAM, T.; CANDAN, H.; CAKMAK, I.; ROMHELD, V.; NEUMANN, G. Glyphosate-induced impairment of plant growth and micronutrient status in Glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). **Plant Soil** v.312, 185–194, 2008.

BRANQUINHO, Maria Regina. **Estudo da quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos pela técnica da reação em cadeia pela polimerase em tempo real: desenvolvimento de método evento específico.** 2010. 121p. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

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

BRASIL. Ministério da Justiça. Lei nº 9.456, de 25 de Abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Publicação: D.O.U. - Diário Oficial da União; 28 de abril de 1997, p.25162.

BRASIL_a. Ministério da Justiça. Decreto nº 4.680, de 24 de Abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990. Publicação: D.O.U. - Diário Oficial da União; 25 de abril de 2003.

BRASIL_b. Ministério da Justiça. Portaria nº 2658, de 22 de dezembro de 2003. Regulamenta o Emprego do Símbolo Transgênico. Publicação: D.O.U. - Diário Oficial da União; 26 de dezembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Justiça. Instrução Normativa nº 1, de 01 de abril de 2004. Define os procedimentos complementares para aplicação do Decreto n o 4.680, de 24 de abril de 2003, que dispõe sobre o direito à informação, assegurado pela Lei n o 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares, destinados ao consumo humano ou animal, que contenham ou sejam produzidos a partir de Organismos Geneticamente Modificados. Publicação: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de abril de 2004.

BROD, F.C.A.; FERRARI, C.S.; VALENTE, L.L.; ARISI, A.C.M. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. **LWT-Food Science and Technology**. v.40, 748-751. 2007.

BROD, F.C.A.; ARISI, A.C.M. Recombinant DNA in meat additives: Specific detection of Roundup Ready™ soybean by nested PCR. **J Sci Food Agric**. v.87, 1980-1984. 2007.

BROD, F.C.A., ARISI, A.C.M., 2008. Quantification of Roundup Ready soybean in Brazilian soy-derived foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science and Technology**. v.43, 1027–1032. 2008.

BU, L.; SETCHELL, K.D.R.; LEPHART, E.D. Influences of dietary soy isoflavones on metabolism but not nociception and stress hormone responses in ovariectomized female rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, n.58. 2005.

CARDARELLI, P.; BRANQUINHO, M.R.; FERREIRA, R.T.B.; DA CRUZ, F.P.; GEMAL, A.L. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**. v.16, 859– 866. 2005.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; FAVONI, S.P.G.; KIKUCHI, A. Extraction time for isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.45, n.4, p.515-518, Dec. 2002.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; SIMÃO, A.S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Pesq. agropec. bras.**, v.38, n.8, p. 897-902, 2003.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BERHOW, M.; MANDARINO, J.M.G.; OLIVEIRA, M.C.N. Environmental and genetic variation of isoflavone content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesq. agropec. bras.**, v.44, n.11, p.1444-1451, 2009.

CÉLERES AMBIENTAL, 2011. **Os benefícios socioambientais da biotecnologia agrícola no Brasil: 1996/97 – 2010/11.**

CÉLERES. **Relatório de Biotecnologia.** 9 de agosto de 2010. Disponível em: http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2012/12/RelBiotecBrasil_1001.pdf. Acesso em: dez. 2012.

CÉLERES. **Relatório de Biotecnologia.** 5 de dezembro de 2011. Disponível em: http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2012/12/RelBiotecBrasil_1103.pdf. Acesso em: dez. 2012.

CÉLERES. **Relatório de Biotecnologia.** 6 de agosto de 2012. Disponível em: http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2012/12/RelBiotecBrasil_1201_vf.pdf . Acesso em: dez. 2012.

CÉSAR, I.C.; BRAGA, F.C.; VIANNA-SOARES, C.D.; NUNAN, E.A.; PIANETTI, G.A.; MOREIRA-CAMPOS, L.M. Quantitation of genistein and genistin in soy dry extracts by UV-Visible spectrophotometric method. **Quim. Nova**, v.31, n.8, p.1933-1936, 2008.

CHUNG, I.; SEO, S.; AHN, J.; KIM, S. Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. **J. Food Chem.**, v.127, issue 3. Food Chemistry, p. 960-996, 7 August 2011.

CHARANEK, Kalil Hussein. **Determinação de alguns nutrientes e contaminantes e avaliação da distribuição de alguns elementos em amostras de soja transgênica e convencional, através do acoplamento HPLC-ICP OES.** Orientadora: Elisabeth de Oliveira. 2006. 117f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química / Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, décimo segundo levantamento, setembro 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2012. Publicação mensal. 1. Safra. 2. Grão. I. Título

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/> Acesso em: 25 nov. 2011.

CUNHA, D.F.; CUNHA, S.F.C. Microminerais. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. **Ciências Nutricionais.** São Paulo: SAVIER, 1998. p.141-166.

DALL'AGNOL, A.; HIRAKURI, M. H. Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase na soja. **Circular técnica 59**. Embrapa Soja, Londrina - PR. 2008.

DEON, M.D. Crescimento e nutrição mineral da soja submetida a excesso de P, S, K, Ca e Mg em solução nutritiva [dissertação]. Piracicaba, 2007.

DEVI, M.K.A.; GONDI, M.; SAKTHIVELU, G.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISSHANKAR, G.A. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.114, p.771-776, 2008.

DUKE, S.O.; RIMANDO, A.M.; PACE, P.F.; REDDY, K.N.; SMEDA, R.J. Isoflavone, Glyphosate, and Aminomethylphosphonic Acid Levels in Seeds of Glyphosate-Treated, Glyphosate-Resistant Soybean. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.340-344, 2003.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. Macrominerais. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: SAVIER, 1998. p.133-140.

EKER,S; OZTURK,L; YAZICI,A; ERENOGLU,B; ROMHELD,V; CAKMAK,I. Foliar-Applied Glyphosate Substantially Reduced Uptake and Transport of Iron and Manganese in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plants. **J. Agric. Food Chem.** 2006, 54, 10019-10025.

ELDRIDGE, A.C.; KWOLEK, W.F. Soybean Isoflavones: Effect of Environment and Variety on Composition. **J. Agric. Food Chem.** 1983, v.31, 394-396.

EL-SHEMY, H.A. (ed.). **Soybean and Health**. 2011, v.1, 502p.

FAIRBANKS, V.F. **O ferro em medicina e nutrição**. In: Shils M E, Osion JA, Shike M.; ROSS, A.C. – Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença, São Paulo: Manole, 9ª edição, 2003. p.207-238

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Chapter 1: The Soybean. In: Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e02.htm>> Acesso em: 24/11/2011.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA / FAEPE, 2005.

GALÃO, O.F.; CARRÃO-PANIZZI, M.C., MANDARINO, J.M.G., LEITE, R.L. Teor de isoflavonas em vinte cultivares de soja semeadas em Londrina e Ponta Grossa. In: Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, 5, Londrina. Resumos [da] ... Londrina: Embrapa Soja, 2010. p.127-129. Documentos 323. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br/download/Jornada2010.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2011.

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

GINÉ-ROSIAS, M.F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente: (ICP-AES)**. Série didática, v.3. Piracicaba: CPG/CENA, 1998, 148p.

HIRAKURI, M.H.; LAZZAROTTO, J.J. Evolução e perspectiva de desempenho econômico associados com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro [recurso eletrônico]: 3. ed. – Londrina: Embrapa Soja, 2011. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n. 319)

HO, C.; RAFI, M.M.; GHAI, G. Substâncias Bioativas: nutracêuticas e tóxicas. In: DAMODARAN,S.; PARKIN,K.L.; FENNEMA O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 585-608.

HURST, W.J.(ed.). **Methods of analysis for functional foods and Nutraceuticals**. N.W: CRC Press LLC, 2002.

ISO 21570:2005 ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE NORMALIZAÇÃO. **Foodstuffs: Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products** – quantitative nucleic acid based methods. Switzerland: ISO, 2005. vi,103p.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. 2008. 4ª edição. 1032 p.

JAMES, C., 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. Brief 43, International Service for the Acquisition of Agri-biotech - ISAAA, Ithaca, NY, Disponível em: <<http://www.isaaa.org>> Acesso em: 13 jan. 2012.

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. Capítulo IX. In COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 273-398.

KAO, T.H.; CHIEN, J.T.; CHEN, B.H. Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v.107, p.1728-1736, 2008.

KIM, J.K.; KIM, S.H.; HAHN, S.J.; CHUNG, M. Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. **Food Research International**, v.38, p.435-444, 2005.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Iowa State Journal of Research**, v.60, n.4, p.501-527, 1986.

KUIPER, H.A.; KLETER, G.A.; NOTEBORN, H.P.J.M.; KOK, E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**. v.27, n.6, p. 503-528, 2001.

KUROSU, M. Biologically Active Molecules from Soybeans. In: EL-SHEMY, H.A. (ed). **Soybean and Health**. 2011, v. 1, p. 207-230.

LAJOLO, F. M.; NUTTI, M.R. **Transgênicos: Bases Científicas de sua Segurança**. 2 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011. 200p.

LENZI, C.L. A rotulagem como precaução: a liberação da soja RR e a regulação dos transgênicos no Brasil. **Estud. Soc. e Agric.**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.220-255, 2010.

LI, Y.; KONG, D.; BAO, B.; AHMAD, A.; SARKAR, F.H. Induction of Cancer Cell Death by Isoflavone: The Role of Multiple Signaling Pathways. **Nutrients**, v.3, p.877-896, 2011.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A. Daidzein and genistein contents of vegetables. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.717-725, 2000. (2000a)

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S.A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **J. Nutr. Biochem.**, v.11, p.326-331, 2000 (2000f)

LIGGINS, J.; MULLIGAN, A.; RUNSWICK, S.; BINGHAM, S.A. Daidzein and genistein content of cereals. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.961-966, 2002.

MACHADO, F.P.P.; QUEIRÓZ, J.H.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIOVESAN, N.D.; PELUZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MOREIRA, M.A. Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. **Food Chemistry**, v.107, p.649-655, 2008.

MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; CRANCIANINOV, W. S. T75 - Teor de isoflavonas em cultivares de soja da EMBRAPA SOJA . In: Congresso Brasileiro de Soja, 4, 2006, Londrina. Trabalho apresentado ... Londrina, Brasil, junho de 2006. p. 294-296

MANDARINO, J.M.G. Compostos anti-nutricionais da soja: caracterização e propriedades funcionais. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C. de O.B. (Ed.) Alimentos Funcionais: benefícios para a saúde. Viçosa, 2008. p.55-80.

MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento). **Listagem de OGM autorizados no Brasil**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: Outubro de 2012.

MARTINEZ, A.P.C.; SOUZA, M.C.; CANNIATTI BRAZACA, S.G. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 31, n.1, p. 23-30, 2011.

MARTINS, P.R; RAMOS, S.F. (org.). **Impactos das nanotecnologias na cadeia de produção da soja brasileira**. São Paulo: Xamã, 2009. 158 p.

MAZUR, W.M.; DUKE, J.A.; WA"HA"LA",K., RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. **Nutritional Biochemistry**, v.9, p.193-200, 1998.

MILLER,D.D. Minerais. In: DAMODARAN,S.; PARKIN,K.L.; FENNEMA O.R. **Química de Alimentos** de Fennema. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 409-444p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Convenção sobre Diversidade Biológica: Biodiversidade 2. Cópia do Decreto Legislativo no. 2, de 5 de junho de 1992. Brasília – DF.MMA, 2000.

MOREIRA, J.U.V. Programa de Melhoramento de Soja. Autores: Equipe de Genética e Melhoramento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - EMBRAPA-SOJA.) Disponível em <<http://www.dag.uem.br/pet/home/MelhoramentoSoja.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2011.

MYSZCZUK, A.P.; WANDSCHEER, C.B. e GLITZ, F. Segurança alimentar e consumo: Rastreabilidade e certificação de grãos GM e non-GM. Revista **Cesumar - Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v.15, n.1, p.125-145, jan./jun. 2010.

NEWELL-MCGLOUGHLIN, M. Impacto da biotecnologia sobre o suprimento e a qualidade de alimentos. In: DAMODARAN,S.; PARKIN,K.L.; FENNEMA O.R. **Química de Alimentos** de Fennema. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 819-858p.

NOGUEIRA JUNIOR, S.; NEGRI NETO, A.; TSUNECHIRO, A.; OKANO, C., SATO, G.S.; GIULIETTI, N.; TAKAHASHI, N.S.; TANAKA, R.T.; DIEHL, S.R.L. **Alimentação animal: realidade e perspectivas**. São Paulo: SAA, 1997. 95P.

NOVAIS, C.M. e ALVES, M.P. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.33, p.10-13, julho-dezembro, 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

PADGETTE, S.R.; TAYLOR, N.B.; NIDA, D.L.; BAILEY, M.R.; MACDONALD, J.; HOLDEN, L.R.; FUCHS, R.L. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.126, n.3, p.702-716, 1996.

PEDROSO, E.R.P. Água e Eletrólitos. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: SAVIER,1998.p.107-132.

PENHA, L.A.O.; FONSECA, I.C.B.; MANDARINO, J.M.G.; BENASSI, V.T. Isoflavonas em grãos de soja orgânica e convencional. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v.2, n.2, p.778-781, 2007.

PEREIRA, C.A. dos S.; OLIVEIRA, F.B. **Soja, alimento e saúde: valor nutricional e preparo**. Viçosa: UFV. 2004. 102p.

RANI, V.; GREWAL, R.B.; KHETARPAUL, N. Physical Characteristics, Proximate and Mineral Composition of some new Varieties of Soybean (*Glycine Max L.*). **Legume Res.**, v. 31, n. 1, p.31 - 35, 2008.

ROCHA, M.A. Biotecnologia na nutrição de cães e gatos. **R. Bras. Zootec.**, v.37, suplemento especial p.42-48, 2008

ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J.A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, 1216, p. 2-29, 2009.

SANTANA, A.C.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J.M.G.; LEITE, R.S.; SILVA, J.B.; IDA, E.I. Effect of harvest at different times of day on the physical and chemical characteristics of vegetable-type soybean. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.32, n.2, p.351-356, abr.-jun., Campinas, 2012.

SEAPA (Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais). Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/>> Acesso em: dez. 2012.

SERRA, A.P; MARCHETTI, M.E; CANDIDO, A.C. S; DIAS, A.C. R; CHRISTOFOLETTI, P, J. Influência do glifosato na eficiência nutricional do nitrogênio, manganês, ferro, cobre e zinco em soja resistente ao glifosato. **Ciência Rural**,v.41,n.1,pag. 77-84, jan, 2011.

SFREDO, G.J. **Soja no Brasil: Calagem, Adubação e Nutrição Mineral**. Londrina: Embrapa Soja, 2008.

SILVA, M.R; SILVA, M.A.A.P. da. Fatores Antinutricionais: Inibidores de Proteases e Lectinas Antinutritional Factors: Protease Inhibitors and Lectins. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.13,n.1,p.3-9, jan./abr., 2000.

SIMÕES, Débora da Costa. 2008. **Regras, normas e padrões no comércio internacional**: o Protocolo de Cartagena sobre biossegurança e seus efeitos potenciais para o Brasil. Dissertação, Mestre em Ciências, Área de Concentração: Economia aplicada, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2008.

SIMONNE, A.H.; SMITH, M.; WEAVER, D.B.; VAIL, T.; BARNES, S.; WEI, C.I. Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing. **J Agric Food Chem.**, v.48, n.12,p.6061-6069, 2000.

TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos). UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas) -Versão 2 – Segunda Edição. Campinas: UNICAMP. 2006.113p.

TAVARES, V.; HIRATA, M.H.;HIRATA R.D.C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.51, n.4, p.526-533, 2007.

TBCA - USP - **Tabela Brasileira de Composição de Alimento**. USP (Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>> Acesso em: 12 dez. 2012.

USDA (United States Department of Agriculture). Database for the Isoflavone. Content of Selected Foods. Release 2.0. Nutrient Data Laboratory - Beltsville Human Nutrition Research Center - Agricultural Research Service - U.S. Department of Agriculture. September 2008. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/isoflav/Isoflav_R2>.pdf f . Acesso em: 04 nov. 2011.

USDA, 2012. **Oilseeds and Products Annual. Brazil.** Global Agricultural Information Network. 12/28/2012. GAIN Report Number: BR 0827

USDA, 2013. **World Agricultural Supply and Demand Estimates.** United States Department of Agriculture. January 11, 2013. WASDE – 514. p.1-14.

VALLE, S. Transgênicos sem maniqueísmo. **Hist. cienc. saude-Manguinhos.** v.7, n.2, p.493-98, Rio de Janeiro, 2000.

VANTYGHM, S.A. WILSON, S.M.; POSTENKA, C.O.; AL-KATIB, W.; TUCK, A.B.; CHAMBERS, A.F. Dietary Genistein Reduces Metastasis in a Postsurgical Orthotopic Breast Cancer Model. **Cancer Res**; v.65, p.3396-3403, 2005. Published online April 15, 2005.

VIEIRA,C.R.; CABRAL, L.C.; PAULA, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesq. agropec. bras.**, v.34, n.7, p.1277-1283, jul. 1999.

WOOD, C.E.; APPT, S.E.; CLARKSON, T.B.; FRANKE, A.A.; LEES, C.J.; DOERGE, D.R.; CLINE, J.M. Effects of High-Dose Soy Isoflavones and Equol on Reproductive Tissues in Female Cynomolgus Monkeys. **Biology of Reproduction** **75**, p.477- 486, 2006.

ZHOU, J.; BERMAN, K.H.; BREEZE, M.L.; NEMETH, M.A.; OLIVEIRA, W.S.; BRAGA, D.P.V.; BERGER, G.U.; HARRIGAN, G.G. Compositional Variability in Conventional and Glyphosate-Tolerant Soybean (*Glycine max* L.) Varieties Grown in Different Regions in Brazil. **J. Agric. Food Chem.**, v.59, p.11652–11656, 2011.

ZOBIOLE, L.H.S.; OLIVEIRA Jr., R.S.; HUBER, D.M.; CONSTANTIN, J.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA J., A. Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. *Plant Soil*, v.328, p.57–69, 2010.

Apêndices

Apêndice I

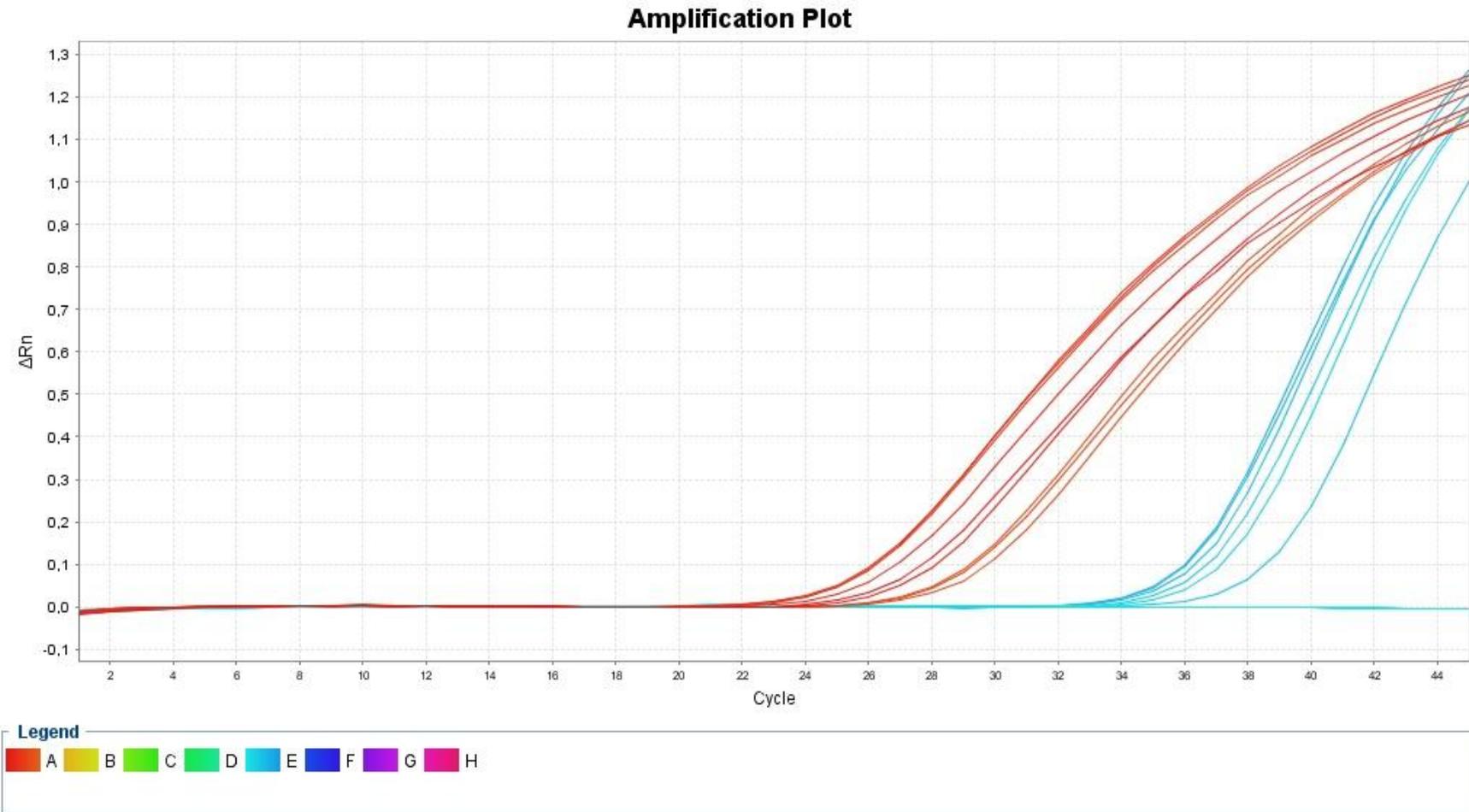
Layout do Experimento de Detecção de Modificação Gênica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GM/MRC/D129 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 27,04	GM/MRC/D129 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 27,47	GM/MRC/D129 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 26,22	GM/MRC/D130 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 25,49	GM/MRC/D130 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 25,54	GM/MRC/D130 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 25,57	GM/MRC/D132 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 28,67	GM/MRC/D132 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 29,11	GM/MRC/D132 S Lec 100 VIC-TAMRA Ct: 28,58	0001a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 22,47	0001a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 22,6	0001b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 23,88
B	0001b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 23,67	0002a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 25,29	0002a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 25,47	0002b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 22,83	0002b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 22,74	0003a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 24,72	0003a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 24,6	0003b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 24,66	0003b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 24,99	0004a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 27,55	0004a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 24,32	0004b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 25,79
C	0004b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 25,33	0005a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 25,29	0005a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 25,41	0005b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 23,74	0005b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 23,7	0006a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 25,99	0006a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 26,31	0006b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 24,39	0006b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 24,76	GM/MR/0005a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 35,99	GM/MR/0005a U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 36,98	GM/MR/0005b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: Undetermin...
D	GM/MR/0005b U Lec 10 VIC-TAMRA Ct: 39,45	Branco Ext N Lec VIC-TAMRA Ct: 36,89	Branco Mix N Lec VIC-TAMRA Ct: Undetermin...									
E	GM/MRC/D129 S 35S 0 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	GM/MRC/D129 S 35S 0 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	GM/MRC/D129 S 35S 0 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	GM/MRC/D130 S 35S 0,1 FAM-TAMRA Ct: 37,66	GM/MRC/D130 S 35S 0,1 FAM-TAMRA Ct: 37,21	GM/MRC/D130 S 35S 0,1 FAM-TAMRA Ct: 39,08	GM/MRC/D132 S 35S 1 FAM-TAMRA Ct: 36,88	GM/MRC/D132 S 35S 1 FAM-TAMRA Ct: 36,56	GM/MRC/D132 S 35S 1 FAM-TAMRA Ct: 36,51	0001a U 35S 0 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0001a U 35S 0 FAM-TAMRA Ct: 40,96	0001b U 35S 0 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...
F	0001b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0002a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0002a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0002b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0002b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0003a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0003a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0003b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0003b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0004a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0004a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0004b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...
G	0004b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0005a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0005a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0005b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0005b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0006a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0006a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0006b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	0006b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	GM/MR/0005a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	GM/MR/0005a U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	GM/MR/0005b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...
H	GM/MR/0005b U 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	Branco Ext N 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	Branco Mix N 35S FAM-TAMRA Ct: Undetermin...									

Os poços das linhas A,B,C e D foram utilizadas para análise das amostras quant à presença do gene endógeno (lecitina). Nas linhas E,F,G e H foram preparadas as amostras para análise quanto a presença do gene de interesse (35S). Na linha E colunas 1,2 e 3 estão as tres triplicatas da amostra padrão para ausência de transgenia, seguidas por 4,5 e 6 com 0,1% e 7,8 e 9 com 1% de transgênia.

Apêndice II

Curvas de amplificação - Padrões

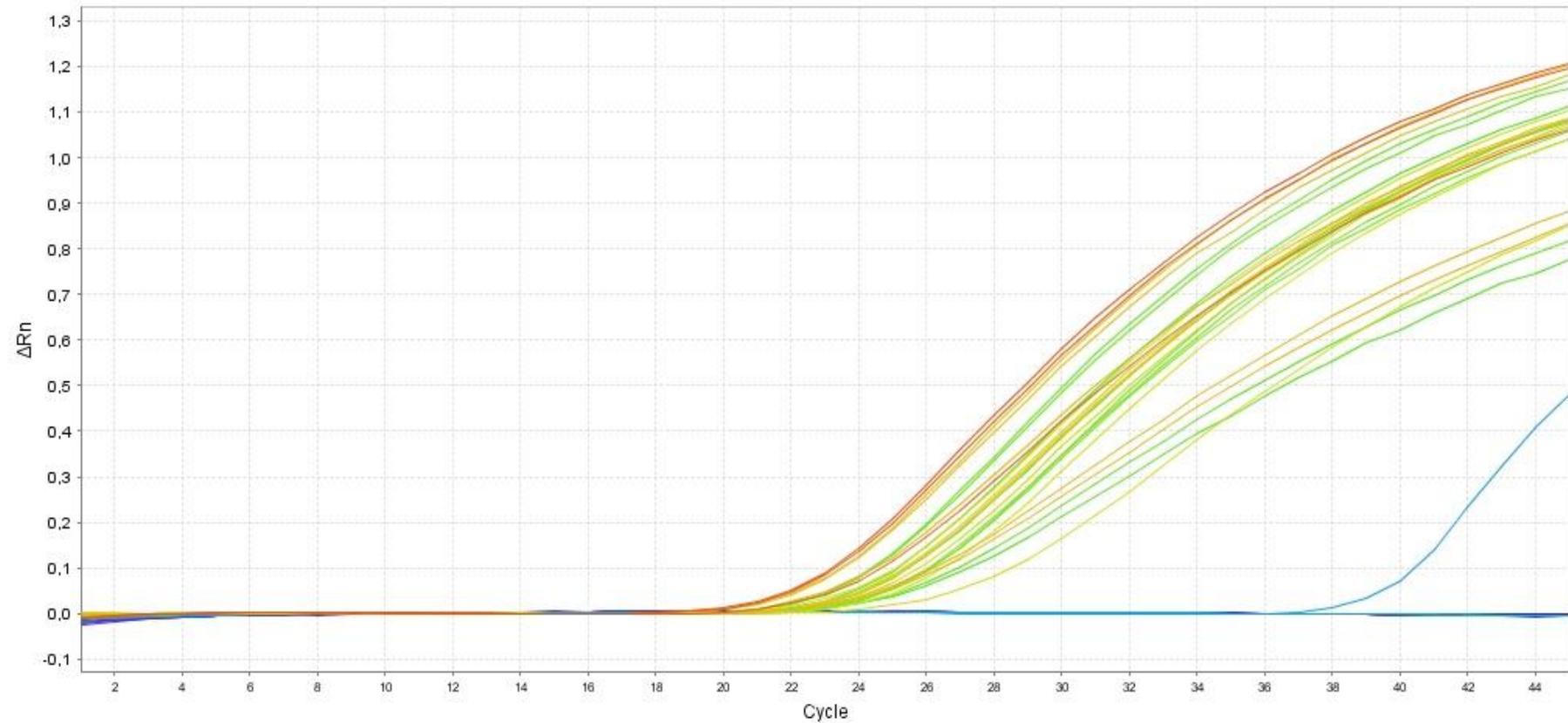


Curvas com início de amplificação para o gene da lecitina e o gene 35S. As curvas com amplificação (Cycle threshold) próximas ao ciclo 22 representam amplificação do gene endógeno e as próximas ao ciclo 32 representam amplificação do gene promotor 35S.

Apêndice III

Curvas de amplificação - Amostras

Amplification Plot



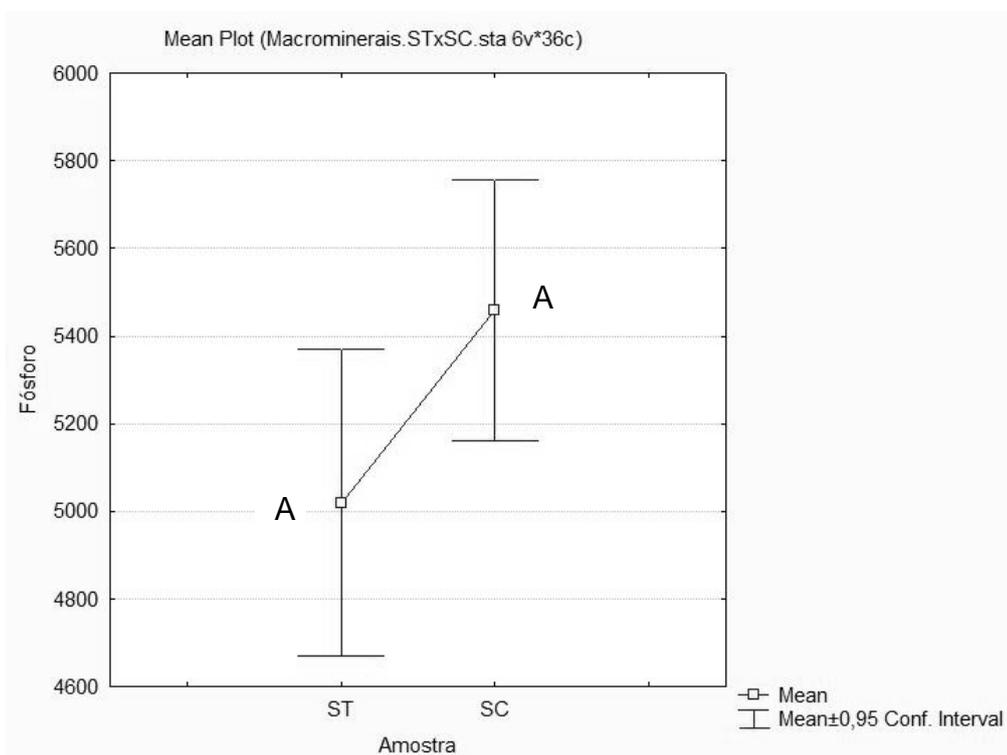
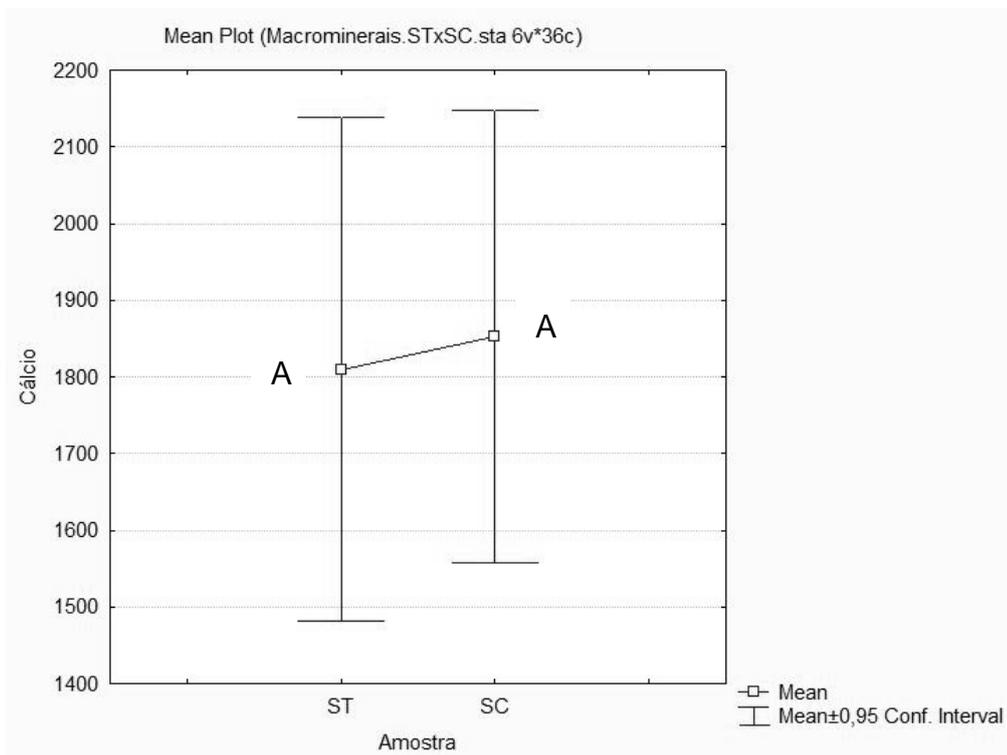
Legend

A B C D E F G H

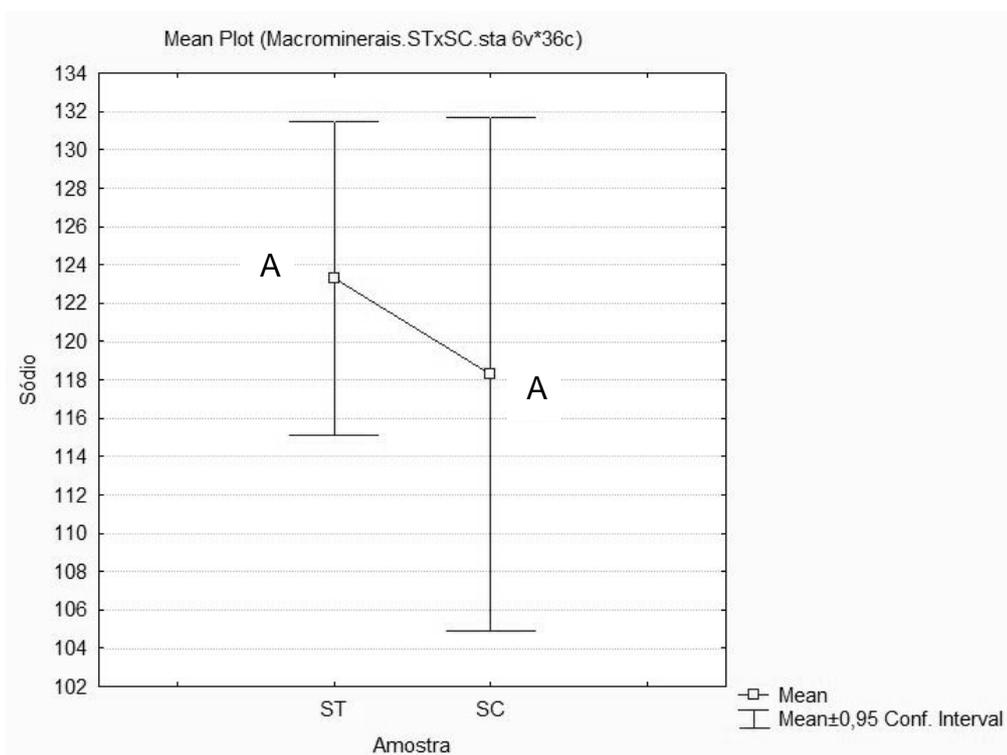
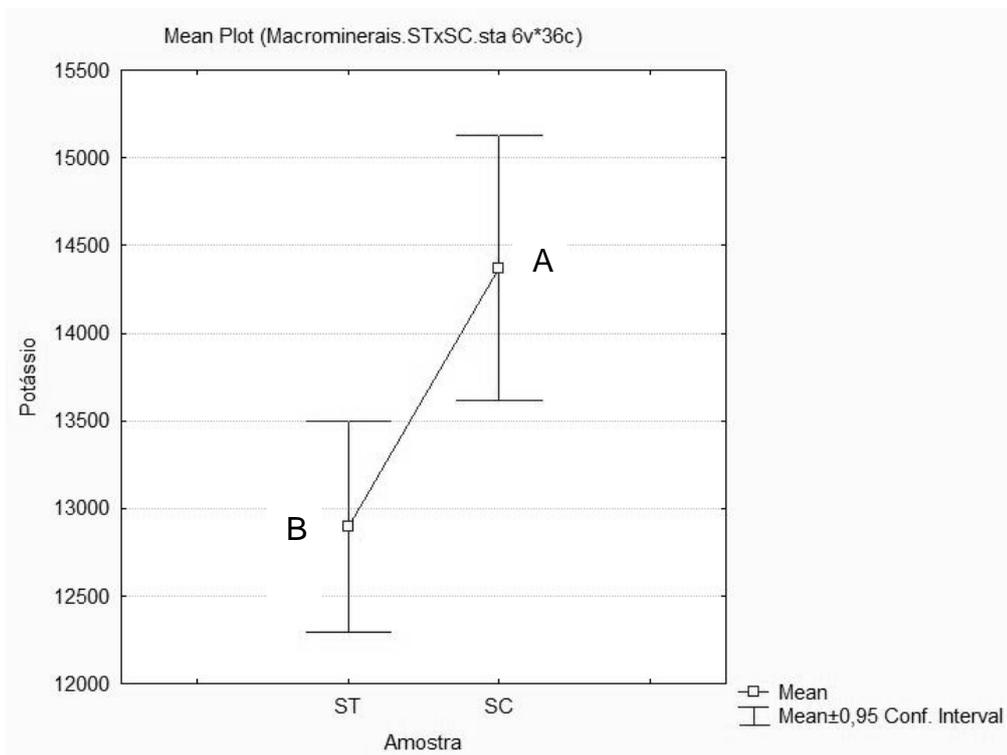
Curvas com início de amplificação para o gene da lecitina e o gene 35S. As curvas com amplificação (Cycle threshold) próximas ao ciclo 20 representam amplificação do gene endógeno e as próximas ao ciclo 37 ou não amplificadas representam o gene promotor 35S.

Apêndice IV

Macrominerais - Gráficos de dispersão tipo Whiskers



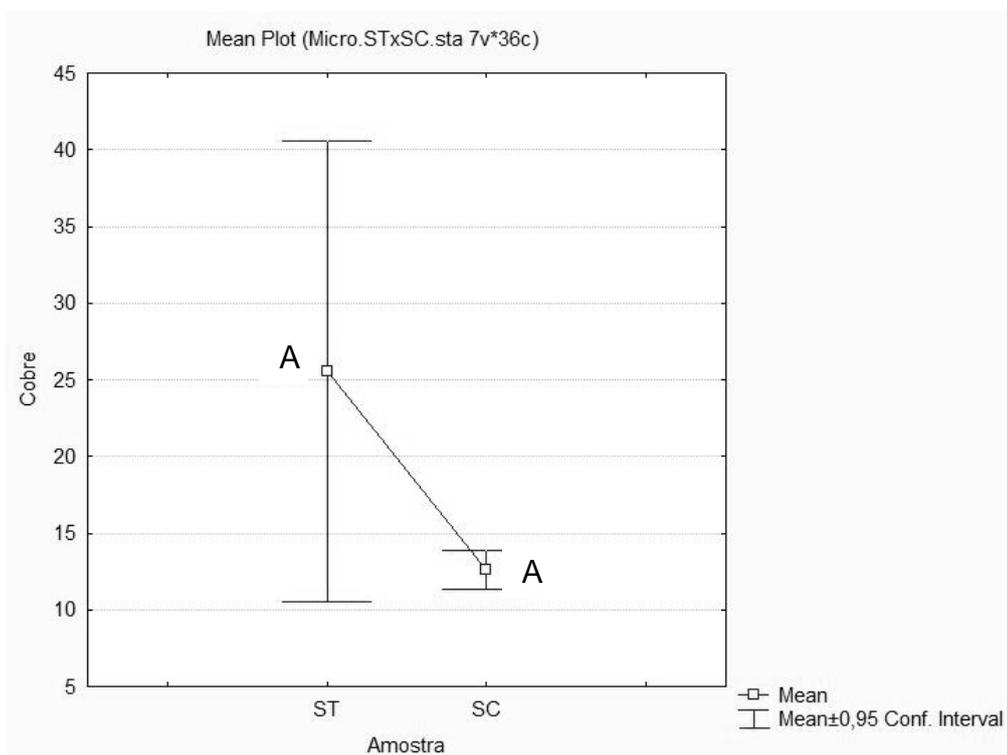
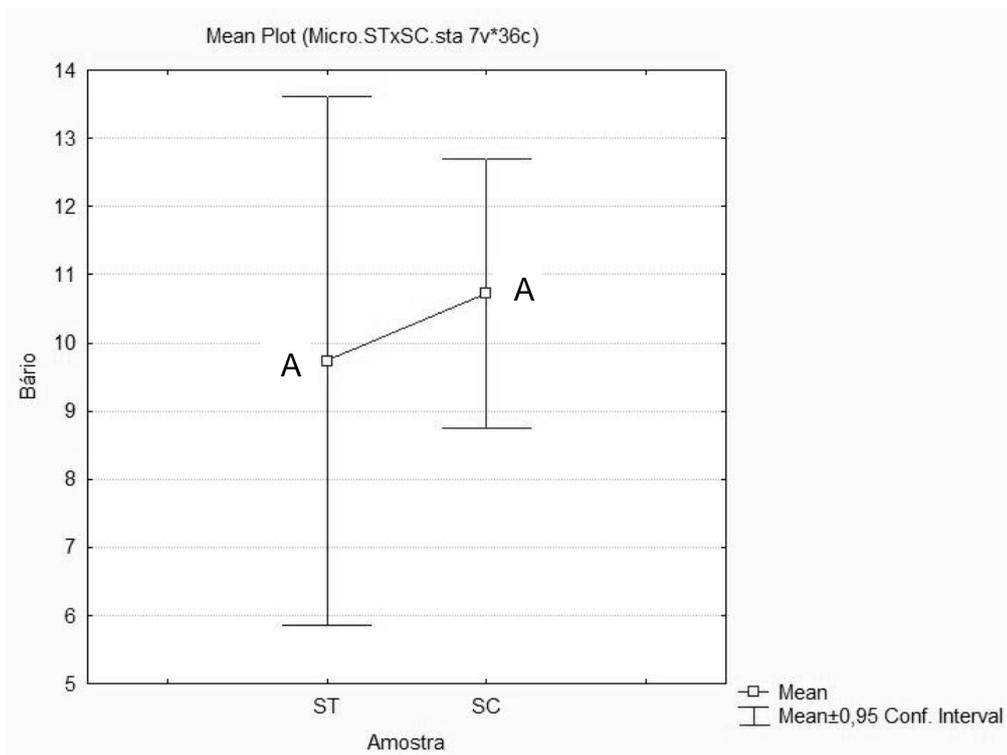
Gráficos de dispersão para cálcio e fósforo. Letras iguais indicam a não observância de diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais). No eixo y estão representados os teores dos respectivos minerais em (mg/Kg) e o x os grupos amostrais.



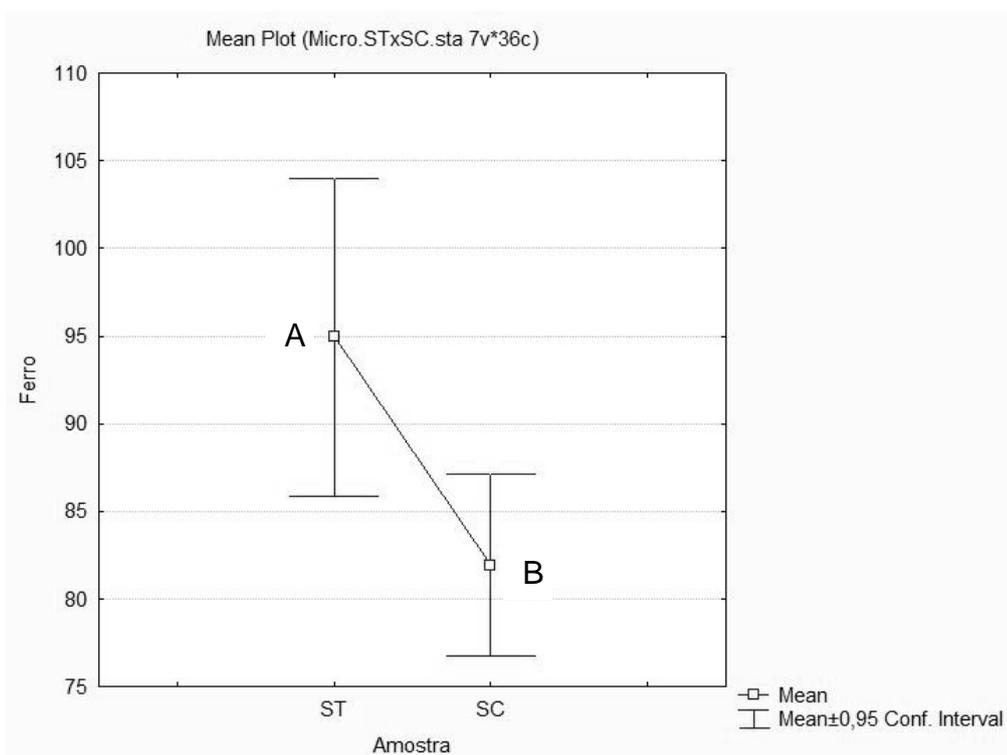
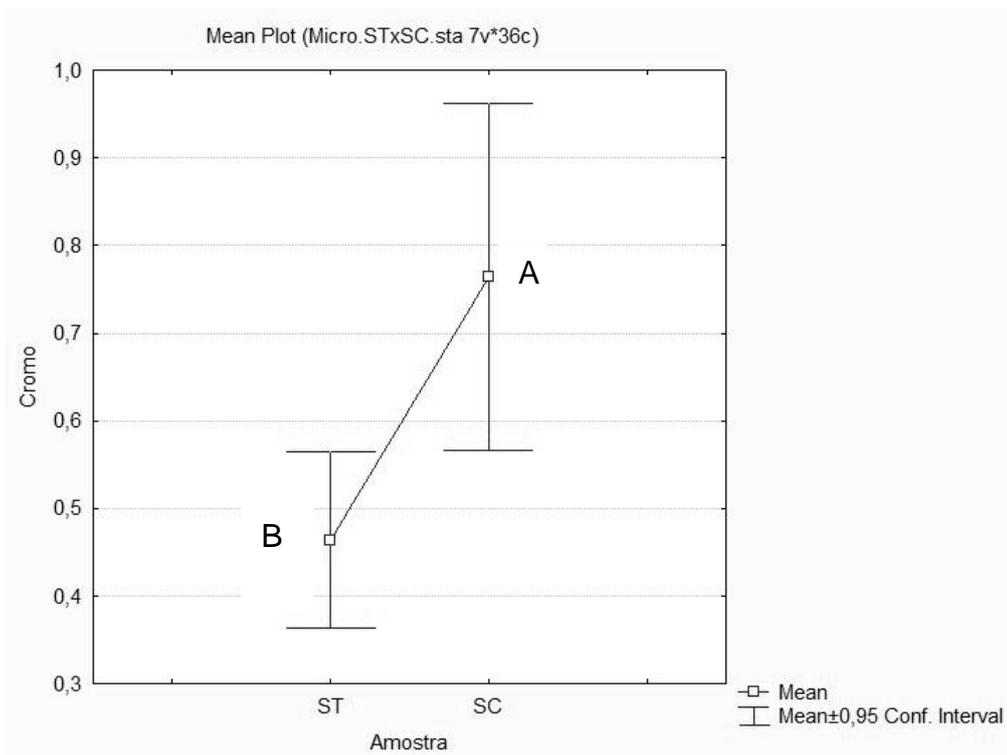
Gráficos de dispersão para potássio e sódio. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais) e letras iguais a não observância de diferença. No eixo y estão representados os teores dos respectivos minerais em (mg/Kg) e o x os grupos amostrais.

Apêndice V

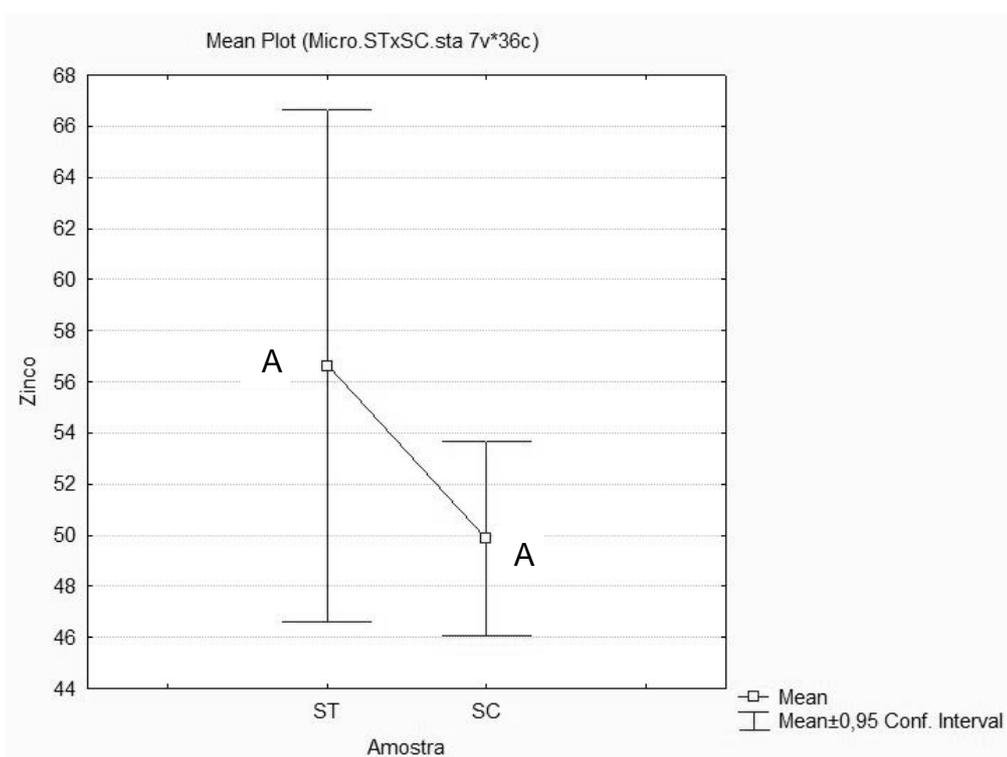
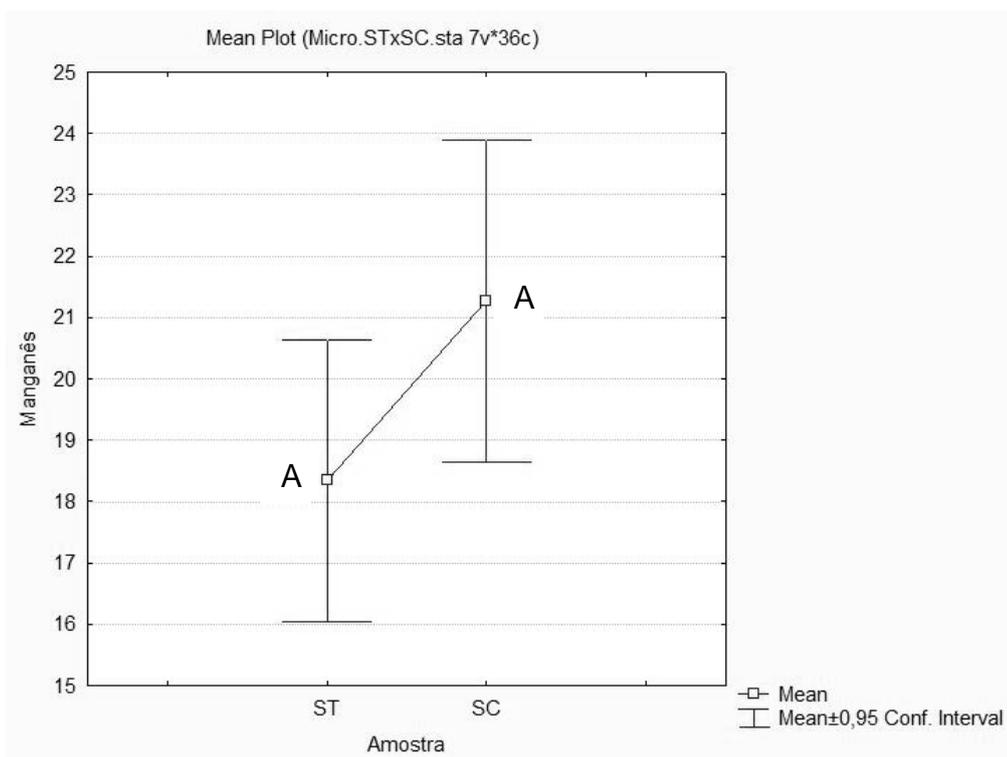
Microminerais - Gráficos de dispersão tipo Whiskers



Gráficos de dispersão para bário e cobre. Letras iguais indicam a não observância de diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais) e letras a. No eixo y estão representados os teores dos respectivos minerais em (mg/Kg) e o x os grupos amostrais.



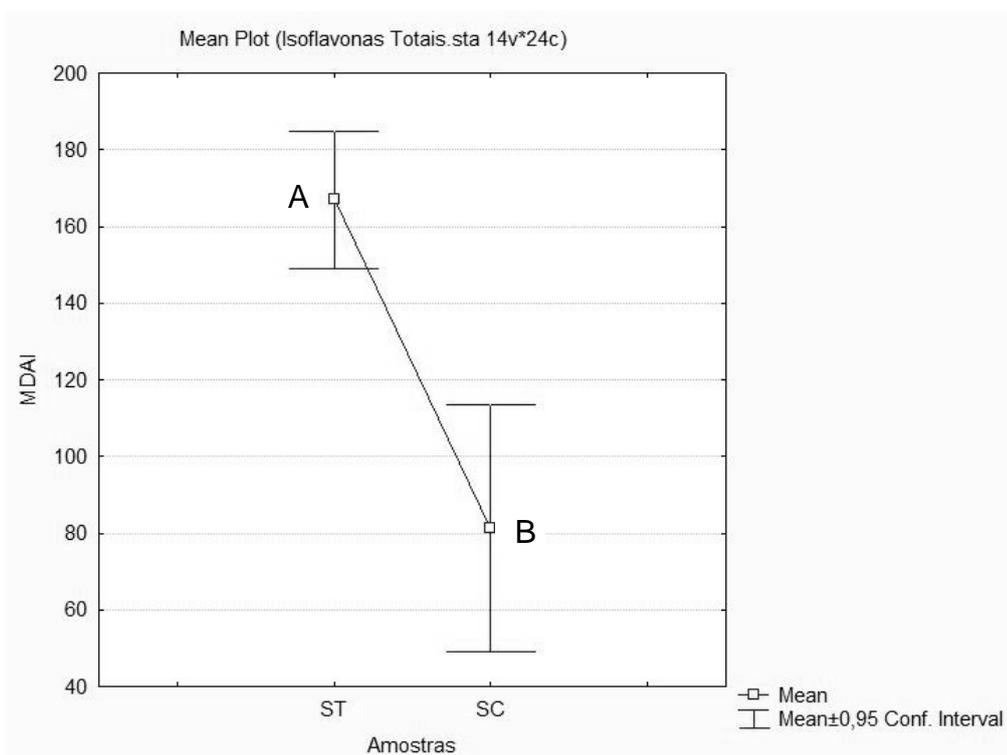
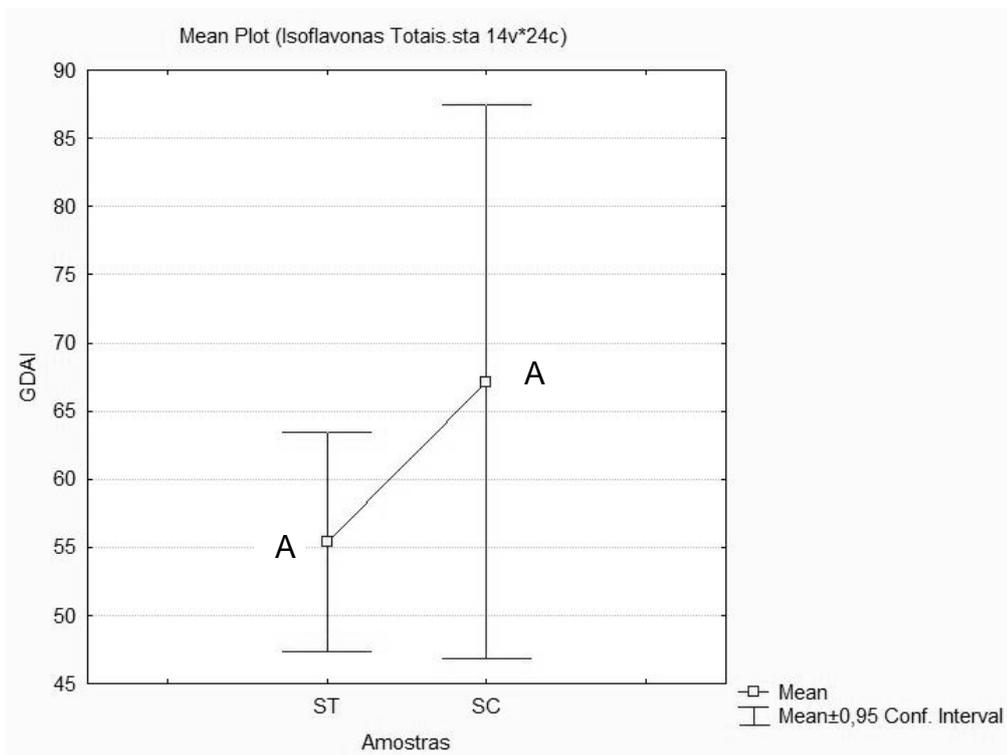
Gráficos de dispersão para cromo e ferro. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais). No eixo y estão representados os teores dos respectivos minerais em (mg/Kg) e o x os grupos amostrais.



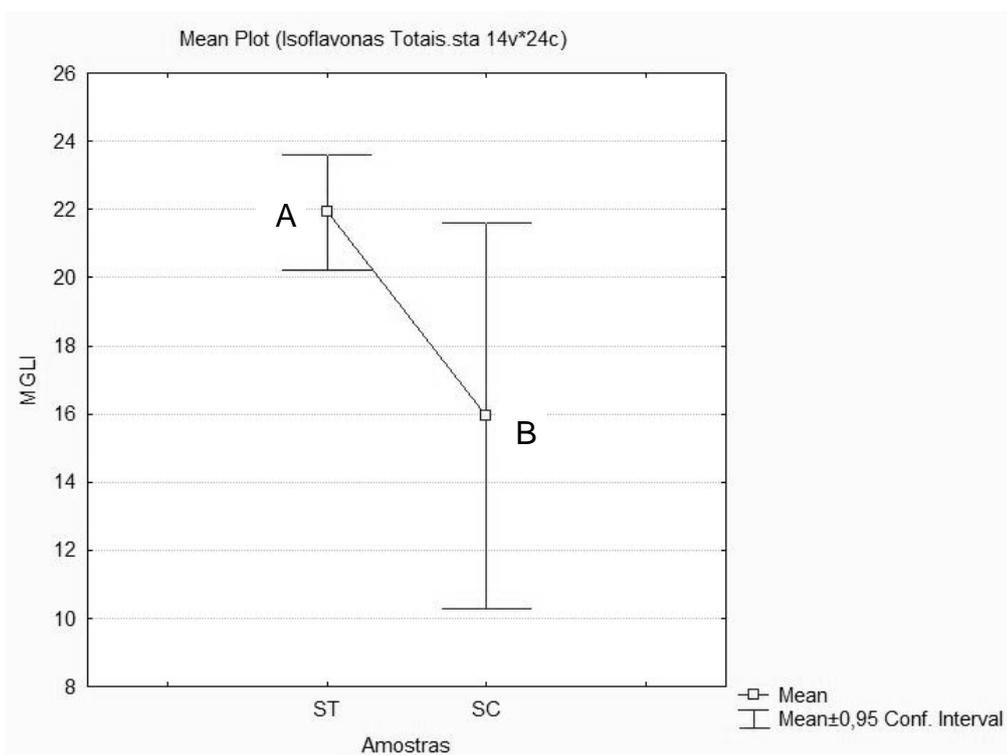
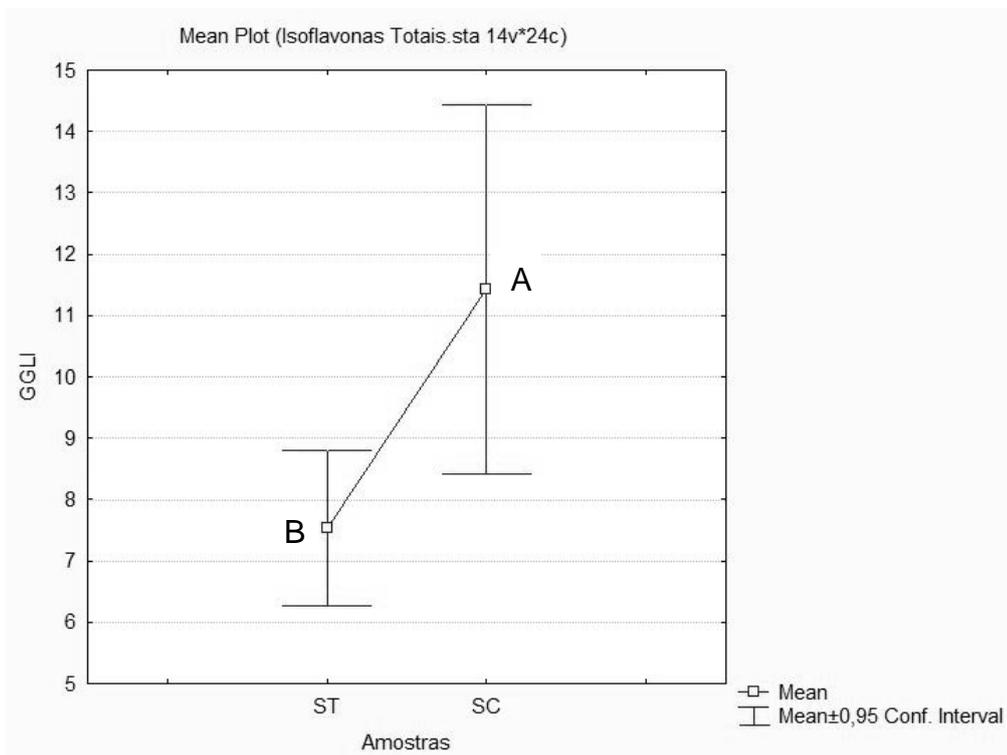
Gráficos de dispersão para manganês e zinco. Letras iguais indicam a não observância de diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais) e letras. No eixo y estão representados os teores dos respectivos minerais em (mg/Kg) e o x os grupos amostrais.

Apêndice VI

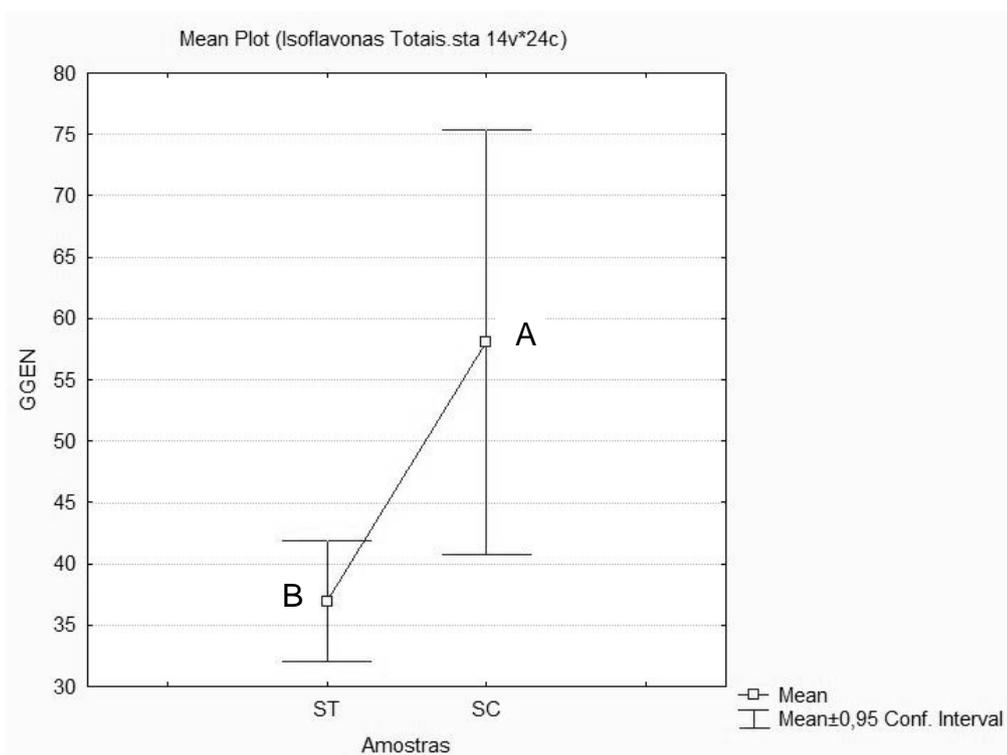
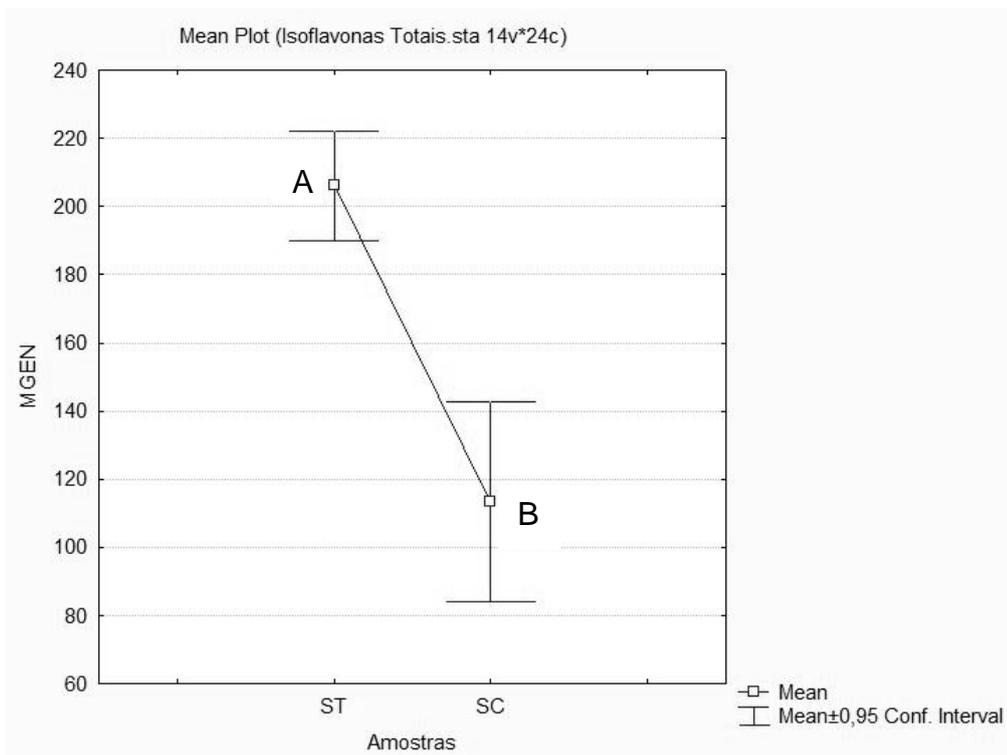
Isoflavonas - Gráficos de dispersão tipo Whiskers



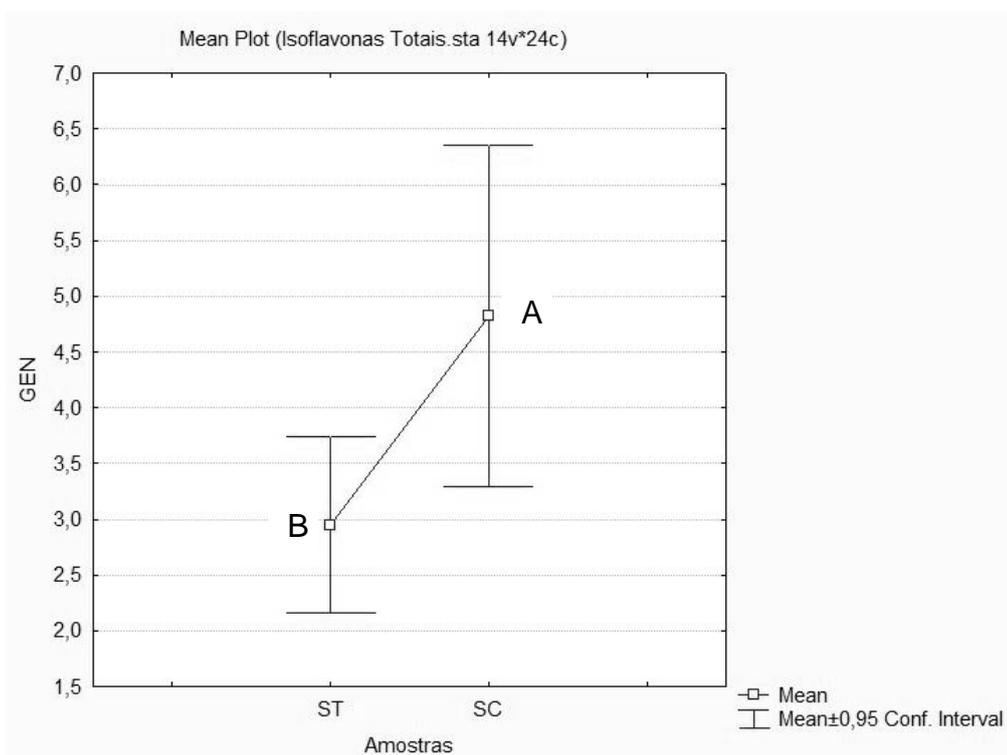
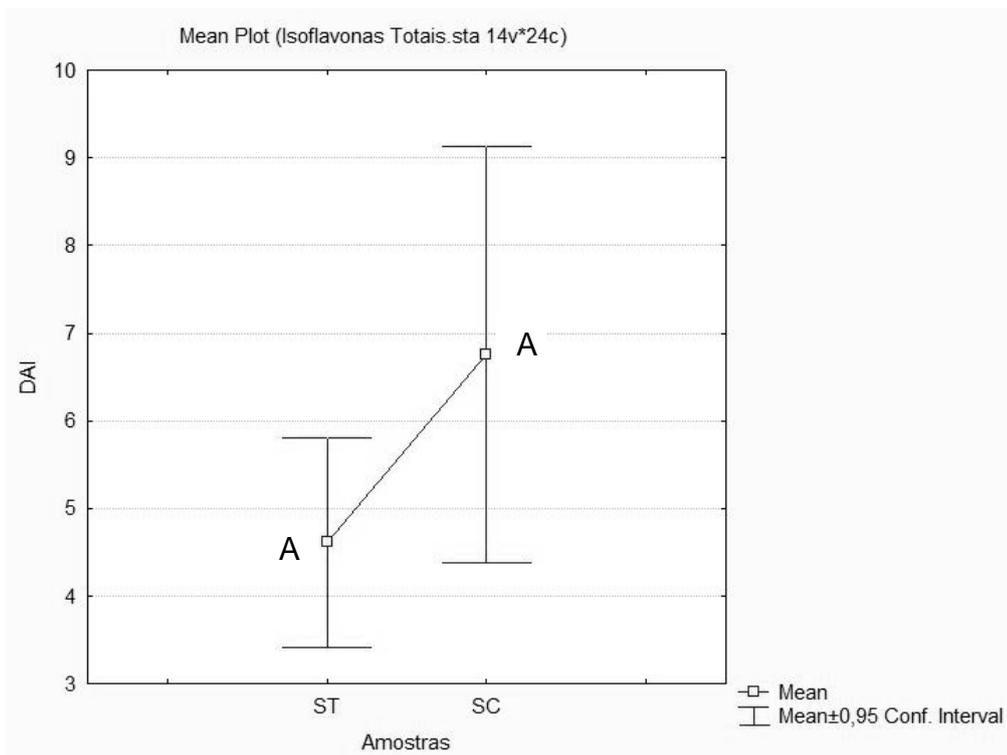
Gráficos de dispersão para GDAI (glicosildaidzina) e MDAI (manoilidaidzina) onde letras diferente indicam diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais) e letras iguais a não observância de diferença. No eixo y estão representados os teores das respectivas isoflavonas em (mg/100g de amostra desengordurada) e o x os grupos amostrais.



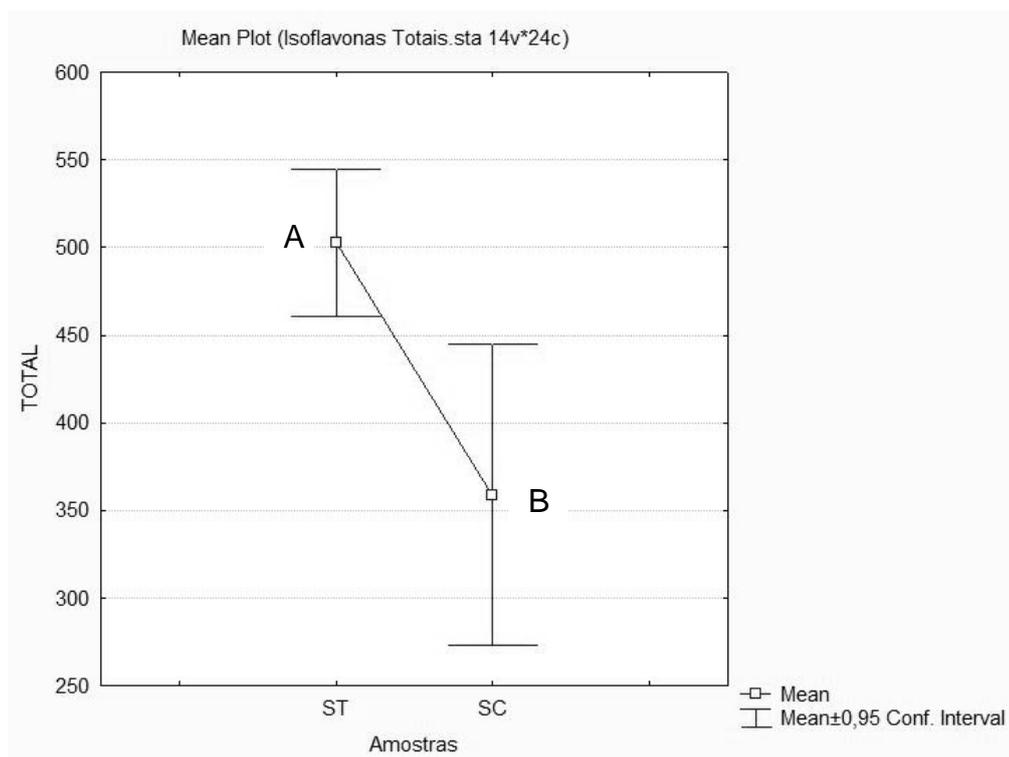
Gráficos de dispersão para GGLI (glicosilglicitina) e MGLI (manoilglicitina) onde letras diferente indicam diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais). No eixo y estão representados os teores das respectivas isoflavonas em (mg/100g de amostra desengordurada) e o x os grupos amostrais.



Gráficos de dispersão para MGEN (manoilgenistina) e GGEN (glicosilgenistina) onde letras diferente indicam diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais). No eixo y estão representados os teores das respectivas isoflavonas em (mg/100g de amostra desengordurada) e o x os grupos amostrais.



Gráficos de dispersão para DAI (daidzeína) e GEN (genisteína) onde letras diferente indicam diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais) e letras iguais a não observância de diferença. No eixo y estão representados os teores das respectivas isoflavonas em (mg/100g de amostra desengordurada) e o x os grupos amostrais.



Gráficos de dispersão para TOTAL (isoflavonas totais). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos amostrais ST (sojas transgênicas) e SC (sojas comerciais) No eixo y estão representados os teores de isoflavonas em (mg/100g de amostra desengordurada) e o x os grupos amostrais.

Anexos

Anexo I

Listagem de OGM autorizados no Brasil



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
Secretaria de Defesa Agropecuária
Coordenação de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados

LISTAGEM DE OGM AUTORIZADOS NO BRASIL

Produto	Nome Comercial	Identificador Único	Eventos	Organismo Doador	Característica	Proteína	Detentor da Tecnologia	Ano da Aprovação
SOJA	Roundup Ready	MON-04032-6	GTS-40-3-2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4-EPSPS	MONSANTO	2005
	Cultivance	BPS-CV127-9	BPS-CV127-9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	Csr 1-2	BASF & EMBRAPA	2009
	Liberty Link™	ACS-GM005-3	A5547-127	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	PAT	BAYER	2010
	Liberty Link™	ACS-GM005-4	A2704-12	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	PAT	BAYER	2010
MILHO	Intacta RR2 PRO	MON-87701-2 MON-89788-1	MON87701 & MON89788	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i> /	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	CP4-EPSPS Cry1Ac	MONSANTO	2010
	YieldGard	MON-00810-6	MON810	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Inseto (RI)	Cry1Ab	MONSANTO	2007
	Liberty Link	ACS-ZM003-2	T25	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	PAT	BAYER	2007
	TL	SYN-BT011-1	Bt11	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab PAT	SYNGENTA	2007
	Roundup Ready 2	MON-00603-6	NK603	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4-EPSPS	MONSANTO	2008
	TG	MON-00021-9	GA21	<i>Zea mays</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	mEPSPS	SYNGENTA	2008
	Herculex	DAS-01507-1	TC1507	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1F PAT	DOW AGROSCIENCES	2008
	YR YieldGard/RR2	MON-00603-6 MON-00810-6	NK603 & MON810	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	CP4-EPSPS Cry1Ab	MONSANTO	2009
	TL/TG	SYN-BT011-1 MON-00021-9	Bt11 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Zea mays</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab PAT mEPSPS	SYNGENTA	2009
	Viptera - MIR162	SYN-IR162-4	MIR162	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistência a Insetos (RI)	VIP3Aa20	SYNGENTA	2009
HR Herculex/RR2	DAS-01507-1 MON-00603-6	TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1F PAT CP4-EPSPS	DU PONT	2009	

Última atualização em 19/06/2012

Produto	Nome Comercial	Identificador Único	Eventos	Organismo Doador	Característica	Proteína	Detentor da Tecnologia	Ano da Aprovação
	PRO	MON-89034-3	MON89034	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Inseto (RI)	Cry1A.105 Cry2Ab2	MONSANTO	2009
	TL TG Viptera	SYN-BT011-1 SYN-IR162-4 MON-00021-9	Bt11 & MIR162 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Zea mays</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab VIP3Aa20 PAT mEPSPS	SYNGENTA	2010
	PRO2	MON-89034-3 MON-00003-8	MON89034 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS	MONSANTO	2010
	YieldGard VT	MON-88017-3	MON88017	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	CP4-EPSPS Cry3Bb1	MONSANTO	2010
	Power Core PW/Dow	MON-89034-3 DAS-01507-1 MON-00003-8	MON89034 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-EPSPS	MONSANTO & DOW AGROSCIENCES	2010
	HX YG RR2	MON-00810-6 DAS-01507-1 MON-00003-8	MON810 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab Cry1F PAT CP4-EPSPS	DU PONT	2011
	TC1507xMON810	DAS-01507-1 MON-00810-6	TC1507 & MON810	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1F Cry1Ab PAT	DU PONT	2011
	MON89034 x MON88017	MON-89034-3, MON-88017-3	MON89034 & MON88017	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry3Bb1 CP4 EPSPS	MONSANTO	2011
ALGODÃO	Bolgard I	MON-00531-6	MON531	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Inseto (RI)	Cry1Ac	MONSANTO	2005
	Roundup Ready	MON-01445-2	MON1445	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4-EPSPS	MONSANTO	2008
	Liberty Link	ACS-GH001-3	LLCotton25	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	PAT	BAYER	2008
	Bolgard I	MON-00531-6	MON531 &	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ac CP4EPSPS	MONSANTO	2009
	Roundup Ready	MON-01445-2	MON1445	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4EPSPS	MONSANTO	2009
	Widestrike	DAS-24236-5 DAS-21023-5	281-24-236 & 3006-210-23	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ac Cry1F PAT	DOW AGROSCIENCES	2009
	Bolgard II	MON-15085-7	MON15085	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Inseto (RI)	Cry2Ab2 Cry1Ac	MONSANTO	2009
	GlyTol	BCS-GH002-5	GHB614	<i>Zea mays</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	2mEPSPS	BAYER	2010
	TwinLink	BCS-GH004-7 x BCS-GH005-8	T304-40 & GHB119	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab Cry2Ae PAT	BAYER	2011
	MON88913	MON-88913-8	MON88913	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4-EPSPS	MONSANTO	2011
FEIJÃO	Embrapa 5.1	EMB-PV051-1	Embrapa 5.1	BGMV - Bean Golden Mosaic Virus	Resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	não se aplica	EMBRAPA	2011

Anexo II

Trabalhos Apresentados em Congresso



XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos
45 anos de Ciência e Tecnologia de Alimentos no Brasil
 01 a 04 de maio de 2012

Certificado

Certificamos que o trabalho "**ANÁLISE DE MINERAIS EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA E COMERCIAL**" foi apresentado na forma Pôster, durante o **XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, realizado no Centro de Convenções da Unicamp, Campinas-SP, no período de 1 a 4 de maio de 2012.

Autores: Gabriela Rezende Costa; João Gustavo de Souza Alves Camões; Nilton de Oliveira Couto e Silva; Ázula Narayama Malacco Ferreira; Roberto Gonçalves Junqueira; Renata Adriana Labanca de Almeida Santos
Protocolo: 423

Campinas-SP, 4 de maio de 2012

Neura Bragagnolo
 Neura Bragagnolo
 Coordenadora Comitê Científico

Jane Gonçalves Menegaldo
 Jane Gonçalves Menegaldo
 Presidente SBCTA
 Coordenadora Geral

Realização: sbCTA | Apoio: UNICAMP, CAPES, CNPq, FAPESP



Certificate of Appreciation

16th IUFOST | World Congress of Food Science and Technology

We certify that Gabriela Rezende Costa
 participated at the 16th World Congress of Food Science and Technology : *“Addressing
 Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology”*, held at
 Foz do Iguaçu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.

Glaucia Maria Pastore
 Chair

Delia B. Rodriguez-Amaya
 Scientific Committee Chair



25f2.efdb b22e.266b dc68.7718 fe81.9472



Certificate of Appreciation

16th IUFOST | World Congress of Food Science and Technology

We certify that the paper entitled

MODIFICATION GENICA: CONCORDANCE BETWEEN DECLARATION AND PRESENCE OF THIS IN SOYBEANS MARKETED IN THE CITY OF BELO HORIZONTE, BRAZIL.

authored by

Gabriela Rezende Costa; Renata Adriana Labanca; Nilson César Castanheira Guimarães; Thaísa Corrêa de Sousa

was presented in the Poster Session at the **16th World Congress of Food Science and Technology** : **"Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology"**, held at Foz do Iguaçu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.

Glaucia Maria Pastore
Chair

Delia B. Rodriguez-Amaya
Scientific Committee Chair



fef8.a006 2de0.8bd7 1525.1fbf 4e38.c8b3



Certificate of Appreciation

16th IUFOST | World Congress of Food Science and Technology

We certify that the paper entitled
PROFILE OF ISOFLAVONES IN GENETICALLY MODIFIED SOY

authored by

Gabriela Rezende Costa; Renata Adriana Labanca; José Marcos Gontijo Mandarin; Rodrigo Santos Leite;
 Thaísa Corrêa de Sousa

was presented in the Poster Session at the **16th World Congress of Food Science and Technology** :
"Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology", held at Foz do
 Iguaçu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.

Gláucia Maria Pastore
 Chair

Delia B. Rodriguez-Amaya
 Scientific Committee Chair



a882.f1ab 193a.1bcc e163.f3a a8e0.4b26

CONHECIMENTO
&
CULTURA

UFMG/2012
CONHECIMENTO E SUSTENTABILIDADE

XXI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
XVI SEMANA DE GRADUAÇÃO
XV ENCONTRO DE EXTENSÃO
XIII UFMG JOVEM



II SESSÃO COORDENADA DE COMUNICAÇÃO:
PRODUÇÃO DE CONHECIMENTO PELOS
TÉCNICO-ADMINISTRATIVOS EM EDUCAÇÃO
II PIC JR.
II DIA DA INOVAÇÃO

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA E PERFIL DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA", foi apresentado na XXI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA da UFMG, promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa, no período de 15/10/2012 a 19/10/2012.

AUTOR: THAISA CORREA DE SOUSA

CO-AUTORES: GABRIELA REZENDE COSTA, NILSON CÉSAR CASTANHEIRA GUIMARÃES, JOSÉ MARCOS GONTIJO MANDARINO, RODRIGO SANTOS LEITE

ORIENTADOR: RENATA ADRIANA LABANCA DE ALMEIDA SANTOS, do(a) FACULDADE DE FARMÁCIA.

Belo Horizonte, 19 de outubro de 2012.

Prof. Renata de Lima Santos
Pró-Reitor de Pesquisa