UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação de equivalência substancial e
potencial de alergenicidade
de cultivares de soja tolerantes ao herbicida glifosato

Cintia Bezuti Giora

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

São Paulo
2009

Cintia Bezuti Giora

Avaliação de equivalência substancial e
potencial de alergenicidade
de cultivares de soja tolerantes ao herbicida glifosato

Comissão Julgadora
Da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
orientador/presidente

Profa. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob
1° examinador

Profa. Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos
2 ° examinador

Profa. Dra. Kioko Takei
3° examinador

Profa. Dra. Inar Alves de Castro
4° examinador

São Paulo, 25 de junho de 2009.

**Aos meus pais,
pelo exemplo de vida e amor prestados.
Considerem
vossas as minhas conquistas.**

Ao meu grande amor
Marcello,
pelo aprendizado constante, incentivo à luta
sempre com honestidade e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Flavio Finardi Filho pela orientação, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental FCF/USP pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CTPA, especialmente ao Sr. Nunes, pelo fornecimento da matéria-prima utilizada neste trabalho.

Ao prof. Dr. Jorge Mancini, especialmente a técnica Rosângela, pelo auxílio na elaboração das análises e discussão do trabalho.

À prof. Dra. Maria Inês Genovese, especialmente a técnica Lucia, pela realização das análises de isoflavonas e auxílio na discussão dos resultados.

À prof. Dra. Beatriz Cordenusi pela cordialidade na utilização das dependências do Laboratório de Química e Bioquímica de Frutos.

Ao prof. Dr. Fernando Moreno, especialmente ao técnico Renato, pela cordialidade na utilização das dependências do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer.

À prof. Dra. Maria Fernanda Macedo Soares pela utilização das dependências do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan.

À Dra. Claudia Araújo pelo auxílio na elaboração das análises.

À prof. Dra. Silvia M.F. Cozzolino, especialmente ao técnico Alexandre, pela cordialidade na utilização de equipamentos do Laboratório de Minerais.

Ao Dr. Ralf Greiner pela cordialidade em realizar as determinações de fitatos nas amostras de soja.

À Dra. Cristina Miuki Jacob (ICr – HC) pelo aceite no fornecimento de soros de pacientes alérgicos à soja.

Ao prof. Dr. Eduardo Purgatto pelo auxílio e gentileza prestados em momentos de urgência.

Às amigas Helena Chiebao e Renata Trommer pelo apoio, auxílio e amizade nos momentos difíceis.

À amiga Gerby Giovanna Sanabria pelo apoio e amizade durante todo o período de trabalho.

À Joana de Almeida Santos pelos momentos de alegria e o auxílio que proporcionou aos componentes do Laboratório.

À colega Valdinéia Castro pelo trabalho em conjunto.

Às amigas Claudinéia Soares, Roberta Ghedini e Silvia Dutra pelas risadas e apoio constantes em todo o período de trabalho.

Ao amigo João Paulo pela amizade e apoio em todos os momentos necessários.

Ao técnico Vitor pelo auxílio na realização das análises.

Aos amigos deste e de outros Departamentos pela companhia, amizade, paciência e momentos de alegria.

A todos os meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Avaliação de equivalência substancial e potencial de alergenicidade de cultivares de soja tolerantes ao herbicida glifosato

Os parâmetros de avaliação de segurança de alimentos geneticamente modificados fundamentam-se na comparação de equivalência substancial entre as variedades e pela inocuidade de proteínas da planta GM com as proteínas encontradas nas plantas convencionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança alimentar de três cultivares de sojas geneticamente modificadas para tolerarem o herbicida glifosato através da determinação da equivalência substancial e do potencial alergênico das mesmas quando comparadas às suas respectivas parentais isogênicas. Seis amostras de soja foram analisadas, sendo três convencionais parentais e três GM, referentes ao cultivo de 2004-2005, em Goiás. Para a composição química foram realizadas análises em triplicata de proteínas, lipídeos, umidade, minerais e fibra alimentar. Análises complementares para determinação de aminoácidos, ácidos graxos, isoflavonas e ácido fítico também foram realizadas. O potencial de alergenicidade foi avaliado em extratos protéicos brutos de três cultivares convencionais e suas correspondentes GM. Os mesmos extratos protéicos foram fracionados para obter as globulinas 7S e 11S por precipitação e posterior purificação em coluna de bioafinidade Sepharose 4B. A glicoproteína 7S foi obtida a partir da eluição com tampão contendo α -D-mannopyranoside. A resistência à proteólise foi realizada a partir de dois fluidos gástricos simulados com pepsina nas proporções 2,5:100 e 13:1 de enzima/substrato. As amostras foram submetidas à eletroforese dissociante para se estimar a resistência à ação da pepsina em função da concentração da enzima e do tempo de incubação. Extratos brutos protéicos e frações hidrolisadas foram testados contra soros de pacientes comprovadamente alérgicos e não alérgicos à soja nas concentrações de 1/20 em ensaios imunológicos do tipo ELISA e 1/10 em ensaios do tipo Western blotting. Os resultados da composição básica de nutrientes mostraram dispersões normais esperadas entre as amostras de mesma origem, com tendências de níveis superiores de proteínas de 9 a 16% nas amostras GM. As análises de fibras insolúveis e isoflavonas revelaram valores de decréscimo das amostras GMs em relação aos teores das variedades convencionais, contrastando com o acréscimo de valores de ácido fítico nas mesmas cultivares. Quanto à proteólise, foi possível observar estabilidade de bandas protéicas com pesos moleculares em torno de 50 e 18 KDa nos extratos brutos, 10 KDa nos extratos de 11S e 50 KDa nos extratos de 7S, em geral similares entre as parentais isogênicas e GMs. Os testes de reatividade dos soros de pacientes alérgicos e não alérgicos em extratos brutos protéicos das cultivares GM demonstraram reatividade similar quando comparados às suas respectivas parentais isogênicas. Com a observação dos resultados pode-se concluir que as diferenças significativas apresentadas pelas amostras GM não as tornam inseguras para o consumo humano e animal. Da mesma forma que não foram observadas alterações na alergenicidade das amostras GM em relação às amostras parentais isogênicas por apresentarem perfis semelhantes de proteólise frente à pepsina e aos testes imunológicos contra soros de pacientes alérgicos.

Palavras-chaves: soja GM, equivalência substancial, alergenicidade, glicinina, *beta*-conglucina.

Abstract

Evaluation of substantial equivalence and potential of allergenic reactions of soybean cultivars tolerant to the glyphosate herbicide

The parameters of security evaluation of genetically modified foods are based on the substantial equivalence among varieties and the innocuity of GM vegetal proteins compared with conventional vegetal proteins. The aim of this work was to evaluate the food safety of three genetically modified soybean cultivars to tolerate glyphosate herbicide through substantial equivalence determination and allergenic potential when compared to their respective isogenic parental. Six samples analyzed were three parental soybean (conventional) and the others GM, regarding to the crop of 2004-2005, grown in Goiás state. The chemical composition was performed in triplicate and the content of moisture, minerals, proteins, lipids and fiber were determined. Additional compounds like aminoacids, fatty acids, isoflavons and phytates were analyzed. The potential of allergenic reactions was evaluated in crude protein extracts of three conventional and their corresponding GM cultivars. The same protein extracts were fractionated to obtain 7S and 11S globulins by precipitation and posterior purification on Sepharose 4B bioaffinity column. The 7S glycoprotein was obtained by elution with α -D-mannopyranoside buffer. The resistance to proteolysis was performed by two simulated gastric fluids with pepsin at the proportions 2,5:100 and 13:1 enzyme/substrate. The samples were run by SDS electrophoresis to estimate the resistance to pepsin action according to enzyme concentration and incubation time. Crude protein extracts and hydrolyzed fractions were tested against serum of allergic and non-allergic patients through ELISA immunochemistry essays at concentrations of 1/20 and Western blotting, 1/10. The results of chemical composition of nutrients showed an expected normal dispersion among samples from the same origin, with tendencies for superior levels of proteins from 9 to 16% by GM samples. The analyses of insoluble fibers and isoflavons revealed decreased values at GM samples regarding to the contents on conventional varieties, contrasting with the increase of the phytic acid values in the same cultivars. After the proteolysis, some protein bands remained apparently stable, that correspond to molecular weights around 50 and 18 KDa for crude extracts, 10 KDa for 11S extracts and 50 KDa for 7S extracts. The undigested proteins are similar in both set of samples, the parental isogenic and GM soybeans. Immuno-reactivity of proteins from crude extracts with serum from allergic and non allergic patients were also similar for isogenic and GM cultivars. These results allow us to state that the significant differences observed in the composition of GM samples will neither affect the nutrient levels nor the safety of their consumption as food or feed. As well as there were no observed changes at the potential allergenicity of GM samples regarding to parental isogenic samples by exhibit similar proteolysis profile related to pepsin and immunological essays against allergic patient serums.

Keywords: GM soybean, substantial equivalence, allergenicity, glycinin, beta-conglycinin.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas	v
1 – Introdução	1
1.2 – Revisão da Literatura.....	4
1.2.1 – Alimentos Geneticamente Modificados.....	4
Biotecnologia e sua influência nos métodos de melhoramento	
Genético vegetal.....	4
Desenvolvimento de novos produtos e disponibilidade mundial	
de AGMs	7
Soja tolerante ao glifosato.....	10
Segurança dos alimentos Geneticamente Modificados	14
Cálculo do potencial de alergenicidade dos AGMs	19
1.2.2 – Alergia Alimentar	22
Prevalência.....	23
Caracterização dos alérgenos presentes na leguminosa	24
Métodos de detecção de alérgenos na soja	25
Digestibilidade e estabilidade ao processamento.....	27
Considerações Gerais sobre a Imunoglobulina E.....	28
1.2.3 – A soja..	31
Característica biológicas.....	32
Estrutura e composição dos grãos.....	32
Características das proteínas presentes na soja	39
2 – Justificativa.....	45
3 – Objetivo	47
4 – Materiais e métodos	48
4.1 – Materiais.....	48
4.1.1 Soja	48
4.1.2 Reagentes	48
4.1.3 Soros de pacientes.....	48

4.2 – Métodos	50
4.2.1 – Preparo das amostras de soja	50
4.2.2 – Composição química	50
4.2.3 – Perfil de aminoácidos	50
4.2.4 – Perfil de ácidos graxos	51
4.2.5 – Determinação de ácido fítico	51
4.2.6 – Determinação do conteúdo de isoflavonas	51
4.2.7 – Extração e separação das globulinas	52
Obtenção do extrato bruto protéico das cultivares de soja	
isogênica (1.0, 2.0 e 3.0) e GM (1.1, 2.1 e 3.1).....	52
Obtenção do extrato bruto protéico rico em glicinina e em	
beta-conglicinina das cultivares.....	53
Purificação dos extratos protéicos (EP) ricos em glicinina e	
β-conglicinina das variedades.....	54
4.2.8 – Ensaio de hidrólise enzimática <i>in vitro</i> das frações	
protéicas.....	54
Fluido Gástrico Simulado (FGS)	54
Incubação em FGS para ensaio 2,5 : 100.....	54
Incubação em FGS para ensaio 13 : 1.....	55
4.2.9 - Quantificação de Proteínas.....	55
4.2.10 – Eletroforeses.....	55
Unidimensional.....	55
Bidimensional.....	55
Revelação dos géis.....	56
4.2.11. Testes de reatividade de anticorpos IgE presentes no soro de	
pacientes alérgicos à soja por métodos imunoquímicos.....	56
ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	56
Ensaio para padronização da técnica.....	56
Western Blotting.....	57
4.2.12. Credenciamentos.....	57
4.2.14 Análise estatística dos dados.....	58
5 – Resultados e discussão	59
5.1 – Equivalência substancial das amostras.....	59
5.1.1 – Análise da composição química dos grãos.....	59

Umidade.....	60
Proteínas.....	60
Lipídeos	61
Resíduo mineral fixo.....	61
Carboidratos.....	61
Fibras.....	62
Perfil de aminoácidos das amostras.....	69
Perfil de ácidos graxos.....	73
5.1.2 - Análises de outros compostos do metabolismo secundário	
do vegetal.....	77
Ácido Fítico.....	77
Isoflavonas.....	79
5.2 - Potencial alergênico das amostras geneticamente Modificadas.....	83
5.2.1 - Extração e caracterização dos extratos protéicos brutos	
(EPB) e aqueles potencialmente alergênicos como as	
globulinas 7S e 11S das seis variedades de soja.....	83
Purificação e caracterização da fração 11S das seis	
cultivares de soja analisadas.....	85
Purificação e caracterização das frações 7S das seis	
cultivares de soja analisadas	88
5.2.2 - Ensaios de proteólise <i>in vitro</i> para testar a resistência ao	
aquecimento dos extratos protéicos bruto, glicinina e	
β – conglucina.....	90
5.2.3 – Testes de reatividade da IgE presente nos soros de	
pacientes sensibilizados à soja com frações de EBP das seis	
cultivares da leguminosa.....	101
Teste imunoquímicos do tipo ELISA para a obtenção do	
título do anticorpo IgE presente em soros de pacientes	
alérgicos e não alérgicos à leguminosa.....	102
Avaliação da reatividade de anticorpos IgE presente em	
soros de pacientes alérgicos ao EBP das seis cultivares de	
soja por teste imunoquímico do tipo ELISA	103
Avaliação da reatividade de anticorpos IgE presente em	
soros de pacientes alérgicos ao EBP das seis cultivares de	

	soja por teste imunoquímico do tipo Western blotting.....	109
6	– Conclusões.....	111
7	- Referências Bibliográficas.....	112
8	– Anexos.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de ação do herbicida glifosato sobre a EPSPsintase na síntese de aminoácidos aromáticos.....	12
Figura 2	Esquema de procedimento detalhado necessário para calcular a segurança de um alimento GM (adaptado de EFSA, 2008).....	16
Figura 3	Fluxograma de avaliação do potencial de gerar efeitos adversos em alimentos derivados de cultivares geneticamente modificados.....	18
Figura 4	Árvore decisória para monitoramento de alergenicidade de produtos da moderna biotecnologia.....	20
Figura 5	Epítomos conformacionais e lineares	26
Figura 6	Alimentos e ingredientes a base de soja.....	34
Figura 7	Esquema do metabolismo dos fenilpropanóides.....	36
Figura 8	Mecanismo de síntese de metabólitos secundários a partir de aminoácidos aromáticos.....	37
Figura 9	Estrutura química das isoflavonas da soja	38
Figura 10	Estrutura da pró-glicinina.....	41
Figura 11	Estrutura do homotrímero na forma nativa da beta- conglucina.....	44
Figura 12	Esquema de extração dos extratos protéicos ricos em 11S (glicinina) e 7S (β-conglucina).....	54
Figura 13	Eletoforegrama SDS-PAGE dos EPB das seis cultivares de soja com cerca de 5 µg de proteína por amostra em gel de 12 % de acrilamida.....	83
Figura 14	Eletoforegramas SDS-PAGE dos EP ricos em glicinina e β-conglucina das seis cultivares de soja com cerca de 5 µg de proteína por amostra em gel de 12 % de acrilamida, corada com nitrato de prata.....	84
Figura 15	Cromatograma de extração da fração 11S de todas as cultivares de soja.....	85
Figura 16	Eletoforegramas SDS-PAGE das frações 11S isoladas das seis cultivares de soja com cerca de 2 µg de proteína por amostra em gel de 12 % de acrilamida, corada com nitrato de prata.....	86
Figura 17	Eletoforeograma bidimensional SDS-PAGE das frações isoladas 11S (glicinina) das amostras 1.0 e 1.1 com cerca de 100 µg de proteína em gel de 12 % de acrilamida, corado com Coomassie G-250.....	87
Figura 18	Cromatograma de extração da fração 7S da cultivar 2.0.....	88
Figura 19	Eletoforeograma SDS-PAGE das frações isoladas 7S (β - conglucina) de todas as cultivares com cerca de 2 µg de proteína em gel de 12 % de acrilamida, corada com nitrato de prata	89

Figura 20	Eletroforegrama bidimensional SDS-PAGE das frações isoladas 7S (β - conglucina) das amostras 1.0 e 1.1 com cerca de 150 μ g de proteína em gel de 12 % de acrilamida, corado com Coomassie G-250.....	90
Figura 21	Eletroforese SDS-PAGE (gel poliacrilamida 15%) da digestão <i>in vitro</i> de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 1.0 (A) e GM 1.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60, 90, 120, 150, 180 e 210 min com pepsina em concentração 2,5:100.....	92
Figura 22	Eletroforese SDS-PAGE (gel 15% poliacrilamida) da digestão <i>in vitro</i> de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 2.0 (A) e GM 2.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60, 90, 120, 150, 180 e 210 min com pepsina em concentração 2,5:100.....	92
Figura 23	Eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15%) da digestão <i>in vitro</i> de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 3.0 (A) e GM 3.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60, 90, 120, 150, 180 e 210 min com pepsina em concentração 2,5:100.....	93
Figura 24	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 1.0 (A) e GM 1.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....	94
Figura 25	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 2.0 (A) e GM 2.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....	94
Figura 26	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 3.0 (A) e GM 3.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....	94
Figura 27	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de glicina (11S) de soja parental isogênica 1.0 (A) e GM 1.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....	97
Figura 28	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de glicina (11S) de soja parental isogênica 2.0 (A) e GM 2.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....	97
Figura 29	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de glicina (11S) de soja parental isogênica 3.0 (A) e GM 3.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....	98
Figura 30	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de β -conglucina (7S) de soja parental isogênica 1.0 (A) e GM 1.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....	99

Figura 31	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de β -conglucina (7S) de soja parental isogênica 2.0 (A) e GM 2.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....99
Figura 32	Eletroforese SDS-PAGE da digestão <i>in vitro</i> de β -conglucina (7S) de soja parental isogênica 3.0 (A) e GM 3.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.....100
Figura 33	Curva de titulação dos soros de pacientes alérgicos (P1 e P2), atópico (C1) e não alérgico (C2) aos EBP das cultivares de soja 1.0/1.1.....101
Figura 34	Curva de titulação dos soros de pacientes alérgicos (P1 e P2), atópico (C1) e não alérgico (C2) aos EBP das cultivares de soja 2.0/2.1.....102
Figura 35	Curva de titulação dos soros de pacientes alérgicos (P1 e P2), atópico (C1) e não alérgico (C2) aos EBP das cultivares de soja 3.0/3.1.....102
Figura 36	Gráfico do ensaio de reatividade (ELISA) do extrato bruto protéico de todas as cultivares de soja parental e respectivas GMs contra soros de pacientes comprovadamente alérgicos P1 e P2, atópico C1 e não alérgico C2 à leguminosa.....104
Figura 37	Gráfico do ensaio de reatividade (ELISA) de frações remanescentes dos momentos zero, 30segundos e 5 minutos da hidrólise enzimática com pepsina (13:1) do extrato bruto protéico das cultivares de soja parental 1.0 e 1.1 contra soros de pacientes alérgicos P1 e P2, atópico C1 e não alérgico C2 à leguminosa.....105
Figura 38	Gráfico do ensaio de reatividade (ELISA) de frações remanescentes dos momentos zero, 30segundos e 5 minutos da hidrólise enzimática com pepsina (13:1) do extrato bruto protéico das cultivares de soja parental 2.0 e 2.1 contra soros de pacientes alérgicos P1 e P2, atópico C1 e não alérgico C1 à leguminosa.....106
Figura 39	Gráfico do ensaio de reatividade (ELISA) de frações remanescentes dos momentos zero, 30segundos e 5 minutos da hidrólise enzimática com pepsina (13:1) do extrato bruto protéico das cultivares de soja parental 3.0 e 3.1 contra soros de pacientes alérgicos P1 e P2, atópico C1 e não alérgico C2 à leguminosa.....107
Figura 40	A - Eletroforegrama SDS-PAGE dos EPB das seis cultivares de soja com cerca de 30 μ g de proteína por amostra em gel de 12 % de acrilamida. B – Immunoblotting de cultivares de soja reconhecidas por soro de paciente alérgico à soja revelado por anticorpo monoclonal secundário anti IgE humana em rato conjugado com fosfatase alcalina.....109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alimentos transgênicos liberados para plantio comercial ...8
Tabela 2	Proporções e características das frações protéicas hidrossolúveis dos grãos de soja.....40
Tabela 3	Composição de coeficientes de sedimentação de extrato bruto protéico de soja após ultracentrifugação (%).....40
Tabela 4	Dados de origem das cultivares de soja utilizadas neste trabalho.....49
Tabela 5	Tabela de dados clínicos dos pacientes.....49
Tabela 6	Dados de composição química das variedades parentais de soja: grãos convencionais e geneticamente modificados (%).....60
Tabela 7	Dados de composição química de amostras de soja isogênicas e GMs brasileiras e cultivadas em outros países (%).....63
Tabela 8	Composição de aminoácidos das amostras de soja parentais isogênicas e GMs em g/100 g de farinha desengordurada cultivadas em solo brasileiro na região de Goiás.....69
Tabela 9	Composição de aminoácidos de amostras de soja isogênicas brasileiras e GMs cultivadas em outros países em g/100 g de farinha desengordurada.....71
Tabela 10	Composição em ácidos graxos (g/100 g de amostras) de grãos de soja GMs e suas respectivas parentais isogênicas expressos em média $\pm$ desvio padrão73
Tabela 11	Composição em ácidos graxos (g/100 g de amostras) de grãos de soja GMs e suas respectivas parentais isogênicas cultivadas no Brasil e em outros países expressos em média.....75
Tabela 12	Conteúdo de inositol fosfato presente nos grãos das variedades de soja GMs e suas respectivas parentais isogênicas (μ mol/g b.s).....77
Tabela 13	Teor de isoflavonas (agliconas) totais (mg/100 g de amostra b.u.) e seu perfil em diferentes variedades de soja cultivadas em Goiás (safra 2004-2005).....79
Tabela 14	Distribuição das formas totais de isoflavonas presentes em variedades de soja cultivadas em Goiás (safra 2004-2005).....81
Tabela 15	Dados do teste ELISA para titulação do anticorpo IgE dirigido contra frações de EBP das amostras 1.0/1.1, 2.0/2.1 e 3.0/3.1.....137
Tabela 16	Dados do teste ELISA para investigar a reatividade dos anticorpos IgE presentes nos soros de pacientes alérgicos (P1 e P2) e controles (C1 e C2) dirigidos contra frações de EBP das amostras 1.0/1.1, 2.0/2.1 e 3.0/3.1.....138

LISTA DE ABREVIATURAS

ADF: método de determinação de fibras dos alimentos com uso de detergentes ácidos

AGM: alimento geneticamente modificado

AG: ácidos graxos

Bet v1: alérgeno encontrado no pólen

BLAST: ferramenta de alinhamento local para busca de seqüências similares em bancos de dados.

BR 16(4): linhagem de soja convencional

BRSGO: linhagem de soja cultivada no estado de Goiás

BRS: linhagem de soja cultivada na região do cerrado brasileiro

BSA: albumina sérica bovina

CAPTM –FEIA: sistema padrão para detectar anticorpos IgE específicos de significância clínica.

CF: método de determinação de fibra bruta presente nos alimentos

CP4 EPSPS: seqüência de codificação introduzida na variedade de soja A5403 para a criação da soja RR.

CQB: Certificado de Qualidade em Biossegurança

CTNBio: Conselho Técnico Nacional de Biossegurança

DBPCFC: teste de desafio oral duplo-cego placebo-controlado

Der p1: alérgeno proveniente do pó

ELISA: teste imunoenzimático para detectar anticorpos IgE específicos

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias

EP: extratos protéicos

EBP ou EPB: extrato bruto protéico

EPSPS: enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase presente em plantas, bactérias e fungos

E96-246: linhagem de soja portadora do gene que confere tolerância ao herbicida glifosato

FASTA: algoritmo usado para buscar similaridades entre seqüências.

FGS: fluido gástrico simulado

Gly m Bd 30K: glicoproteína óleo-associada presente na soja (também conhecido como P34)

Gly m Bd 28K: glicoproteína tipo vicilina presente na fração 7S da soja

Gly m 1.0101: aeroalérgeno presente na soja

Gly m 1.0102: aeroalérgeno presente na soja

Gly m 2: proteína alergênica presente na casca da soja

Gly m 3: profilina (proteína alergênica)

Gly m 4: SAM 22 (nsLTPs alergênica)

GTS : glyphosate tolerant soybean

HRP: horse radish peroxidase

IgE: imunoglobulina E

IP ou InsP: inositol fosfato

NDF: método de determinação de fibras com uso de detergentes neutros

nsLTPs: proteínas transportadoras de lipídeos não específicas

OGM: organismo geneticamente modificado

RAST: radioimunoensaio para detectar anticorpos IgE específicos.

PBST: tampão fosfato com detergente Tween

PR: proteínas relacionadas às patogêneses

rDNA : DNA recombinante

soja RR : *Roundup Ready®* ou soja desenvolvida por meio da introdução da sequência de codificação *cp4 epsps* na variedade de soja A5403

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato.

SPT: skin prick test ou teste cutâneo para detecção de alérgenos

1. Introdução

A busca pela garantia de saciedade de necessidades básicas dos povos de hoje e do futuro deve ser o foco da ciência praticada no mundo atual. Em muitas áreas do mundo a quantidade e a qualidade de alimentos não são suficientes para o fornecimento de energia mínima necessária para uma boa nutrição e bem estar da população local, pois a dieta é composta apenas por ingredientes considerados pobres em certos nutrientes essenciais. Em contraste, os países desenvolvidos necessitam de alimentos funcionais para se precaverem de certas doenças causadas, na maioria das vezes, pela ingestão excessiva ou desordenada de alimentos.

Desta forma, as melhorias nutricionais nos alimentos poderiam ajudar a resolver ambas as demandas que podem, ou não, trazer malefícios à humanidade.

O melhoramento genético convencional de plantas tem sido uma ferramenta básica para este objetivo e também para o suprimento da demanda alimentar mundial. Esta técnica possibilita, através de cruzamentos entre indivíduos rigorosamente selecionados, a obtenção de outros portando características interessantes para melhorias específicas em uma espécie vegetal. É uma prática antiga, realizada por agricultores desde os períodos primórdios da humanidade, cuja forma de utilização tem sido recentemente ampliada pela tecnologia. A maior parte dos alimentos consumidos hoje são melhorados geneticamente ou contém ingredientes derivados de tecnologia de modificação genética. Globalmente, bilhões de dólares são obtidos com a venda de sementes e cultivares provenientes destas tecnologias.

Após grandes avanços no conhecimento da genética, esta tecnologia foi sendo aprimorada e, com a integração de conhecimentos entre processos biotecnológicos e a engenharia genética, deu-se origem à tecnologia do DNA recombinante (rDNA). Esta tecnologia é um novo instrumento capaz de criar ferramentas para a introdução de um só gene de interesse no genoma de organismos vivos para melhorar a espécie em uma dada característica, sem a troca de partes dos cromossomos, como ocorre no cruzamento convencional de plantas.

No entanto, a tecnologia é rodeada por controvérsias, pois criou um impacto profundo na questão da inocuidade alimentar destes novos híbridos, que nos primeiros produtos lançados eram considerados seguros. Profissionais e

pesquisadores de várias áreas como a agronomia, medicina, farmácia, bioquímica, nutrição, engenharia de alimentos, biologia e outras se uniram na busca por respostas para questões polêmicas sobre a segurança destes novos alimentos. O debate exigiu respostas rápidas e adequadas para os diversos ângulos ainda obscuros dos riscos relativos à manipulação genética.

A contestação aos produtos GM ganhou força com a popularização dos debates sobre a segurança ao ambiente. Discussões sobre normas, procedimentos e limites de ação sobre esses novos produtos biotecnológicos foram necessários para possibilitar a pesquisa, a fim de diminuir os riscos de disseminação de material transmutado para o ambiente. Desta forma, pesquisadores de diversos países, organizaram grupos de estudos e estabeleceram critérios na escolha das transformações genéticas e dos genes envolvidos. Atualmente, os vegetais GMs e/ou ingredientes provenientes de variedades que empregam essa tecnologia são regulamentados por várias agências governamentais de todo o mundo para assegurar a segurança ao consumidor e ao meio ambiente.

Críticos da tecnologia GM incluem consumidores e grupos naturalistas, importadores de grãos da União Européia, produtores de orgânicos, ambientalistas, alguns cientistas e grupos éticos, certos grupos religiosos, alguns políticos e protecionistas de grandes marcas. Alguns dos receios específicos expressos por estes oponentes incluem alterações na qualidade nutricional dos alimentos, toxicidade, possível resistência a antibióticos de cultivares GM, alergenicidade e carcinogenicidade de alimentos GMs. Além destes, outras preocupações como poluição ambiental, transferência horizontal de genes para plantas selvagens, criação de novos vírus e toxinas, acesso limitado para sementes devido a patentes de vegetais GMs, ameaça para a diversidade genética, preocupações religiosas, culturais e éticas, e ainda, o mais agravante e comum: o medo do desconhecido.

Entre os membros que apóiam a tecnologia GM podem-se citar indústrias privadas, pesquisadores, alguns consumidores, alguns produtores e agências reguladoras. Entre os benefícios apresentados por estes proponentes incluem melhorias de cultivares como frutos e vegetais que buscam aumentar a vida-de-prateleira, as características organolépticas, a qualidade nutricional e potencializar os efeitos benéficos para a saúde já naturalmente presentes em certos alimentos, além de possibilitar a melhoria da qualidade da gordura, da qualidade e quantidade de carne e leite de alguns animais considerados de grande importância nutricional,

entre outros. E ainda, esta tecnologia pode trazer outros benefícios muito importantes como obter órgãos para transplante em animais GM, aumentar o rendimento das colheitas, melhorar práticas agrônômicas através da redução da infestação das colheitas por animais, diminuição do surgimento de doenças e aumento da resistência de cultivares a variações climáticas e herbicidas, uso de plantas GM como bio-fábricas para produção de matérias para usos industriais, emprego de organismos GMs na produção de fármacos, na reciclagem e/ou remoção de resíduos industriais tóxicos.

As características da nova tecnologia devem ser revistas de forma que seja permitido trilhar caminhos para minimizar os riscos e maximizar os benefícios da mesma. Agências regulatórias e industriais envolvidas no agronegócio devem buscar o aumento da consciência cívica sobre esta tecnologia através da educação e da divulgação de pesquisas que garantam a segurança do processo, aumentando consequentemente sua aceitabilidade mundial.

Neste trabalho serão abordados tópicos da segurança alimentar de soja GM para tolerar o herbicida glifosato através de uma análise comparativa de componentes químicos presentes nas cultivares GMs entre as suas respectivas parentais isogênicas com o foco de avaliar a possível equivalência de nutrientes e de compostos do metabolismo secundário. Paralelamente, serão comparadas formas de digestibilidade protéica e a reatividade *in vitro* de seus componentes protéicos com soros de pacientes alérgicos à soja para delineamento do potencial de alergenicidade das mesmas.

1.2. Revisão da Literatura

1.2.1 Alimentos Geneticamente Modificados (AGMs)

Biotecnologia e sua influência nos métodos de melhoramento genético vegetal

A seleção das melhores plantas pelos agricultores de séculos atrás foi o marco inicial para a domesticação das espécies. Este simples processo de melhoramento genético, definido como a escolha para reprodução de animais ou plantas cujas características são desejadas na descendência, foi responsável pela criação de vegetais híbridos.

Provenientes de cruzamentos entre indivíduos da mesma espécie ou com aqueles passíveis de multiplicação, como ancestrais selvagens ou de outras espécies correlatas, os híbridos eram totalmente dependentes da intervenção humana devido à sua natureza limitada de dispersar suas sementes (Madden, 1995). Como exemplo pode-se citar a criação do milho pelos nativos da América, há 8000 anos, por meio da domesticação de uma planta selvagem chamada teosinte (Falk e cols., 2002).

Embora se confunda com uma nova tecnologia, o melhoramento genético de plantas vem sendo utilizado por séculos pelo homem em busca de novos caminhos para cultivar alimentos de melhor qualidade e rendimento. Cruzamentos entre indivíduos escolhidos da mesma espécie lideraram um melhoramento gradual das variedades estocadas (Madden, 1995; Bueno e cols., 2001).

Paralelamente, há cerca de 10000 anos, o homem fazia uso dos microrganismos para a preparação de alimentos, como é o caso da fermentação, com o uso de um conjunto de técnicas hoje conhecido como biotecnologia (Bueno e cols., 2001). Com o avanço de outras áreas da ciência como a Biologia, Bioquímica e Genética Molecular, a mesma foi aprimorada e transformada pela capacidade de fazer alterações precisas no material genético dos organismos. Sendo então definida como a aplicação de organismos biológicos, sistemas ou processos para a fabricação de produtos industriais (Madden, 1995).

Desta forma, nas décadas de 60 e 70, a agricultura mundial ganhou um forte impulso com o Plano Sinalizador Mundial para o Desenvolvimento da Agricultura (“Revolução Verde”), o qual foi o responsável pela criação de novas variedades de

cultivares altamente produtivos (Clugstom & Smith, 2002) através de novas técnicas de irrigação e outros fatores como disponibilidade de fertilizantes inorgânicos, um avanço em terras ainda não cultiváveis e políticas governamentais favoráveis (Khush, 2001).

Com a junção de todas estas melhorias, as formas tradicionais de cruzamento de plantas e de seleção resultaram em plantas mais produtivas e mais nutritivas. Pode-se ter como exemplo a introdução de genes para baixa estatura em trigo e em outros cereais como arroz e milho que causou um aumento substancial na produtividade destes alimentos, além da resistência dos mesmos a danos ambientais (Peng e cols., 1999). E ainda a criação de soja com níveis reduzidos de inibidores de tripsina tipo Kunitz por mutação da semente (Krishnan, 2001).

A maior parte das variedades de frutos e vegetais consumidos hoje revela poucas semelhanças com seus ancestrais selvagens (Chassy, 2002), uma vez que o material genético é alterado desde o início da seleção dos indivíduos.

A biotecnologia enriqueceu a implementação do melhoramento genético vegetal com a introdução de técnicas diferenciadas de culturas de tecidos celulares onde obtêm novos indivíduos a partir deles mesmos (totipotência celular) e outras técnicas como fusão de protoplastos, DNA recombinante e uso de marcadores moleculares (Bueno e cols., 2001). Além destas, outras realizadas pela própria evolução natural ou por intervenção humana como resgate de embriões, mutação natural ou artificialmente induzida, mutagênese radioativa (Madden, 1995; Falk e cols., 2002) têm participação direta na criação destes híbridos, sendo responsáveis pelo surgimento de novas variedades com características específicas.

No entanto, apesar dos grandes avanços conquistados com o melhoramento genético vegetal tradicional acompanhado da biotecnologia, alguns problemas persistem e exigem continuidade nos esforços para a resolução dos mesmos.

São eles: a maior demanda por recursos hídricos, destacando-se a grande dependência de energia e de insumos, a mecanização da agricultura e o uso intensivo de agroquímicos; a diminuição cada vez maior de terras disponíveis para a produção de alimentos devido ao crescimento urbano e à degradação das mesmas (Sharma e cols., 2002); a queda contínua na produtividade de alimentos em países em desenvolvimento com uma representatividade anual de 3% de 1967-1982 para cerca de 1% a partir de 1995 (Lipton, 2001); o crescimento populacional intenso, o qual se estima atingir 7,5 bilhões até a década de 2020 (Cockburn, 2002), ou mesmo

mais 50% ou 9 bilhões até as décadas de 2040 ou 2050; e por fim, o decréscimo da diversidade genética de algumas plantas demonstrando que novos patamares devem ser alcançados para expandir a produção de alimentos para, pelo menos, 50% a mais nas próximas décadas, mantendo e, principalmente, melhorando a diversidade ambiental sem desrespeitar as estruturas sociais (Cockburn, 2002).

Contudo, um dos mais importantes aspectos negativos da realidade atual da modificação genética é a ausência do controle em nível molecular dos genes após um evento de multiplicação (Falk e cols., 2002), uma vez que para a obtenção do gene desejável ou a retirada daquele indesejável ocorre troca de partes inteiras ou fragmentos de cromossomos das plantas. Esta troca permite uma recombinação de genes e retorno de características indesejáveis (Madden, 1995).

Apesar dos refinamentos alcançados nos métodos de hibridação durante séculos, muitos obstáculos persistem. Com o avanço de técnicas de engenharia genética, é possível produzir variedades que contenham um ou mais genes específicos, introduzidos no genoma sob forma controlada, testada e com alterações previsíveis, bem como baseadas em princípios específicos (Falk e cols., 2002).

A tecnologia do DNA recombinante vem conquistando espaço na agricultura mundial e rompendo barreiras com a introdução de técnicas inovadoras responsáveis pela inserção direta de um gene no genoma de um indivíduo.

O desenvolvimento de um novo alimento por esta tecnologia fundamenta-se na introdução de um gene de interesse em outro indivíduo, já que, o gene é a unidade básica funcional de herança e, em conjunto, formam a molécula de DNA, a qual permite que estes genes se expressem produzindo proteínas particulares específicas que determinem as características de um indivíduo (Robinson e cols., 2000), mesmo que a transferência seja entre espécies não próximas.

O primeiro estágio da engenharia genética é identificar o gene de interesse para cloná-lo e, uma vez obtido, inseri-lo em outra planta de interesse (Jones, 1992). O sistema vetor largamente usado para a maioria das plantas é o plasmídeo indutor de tumor (TI) encontrado no DNA da bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens*. Através deste plasmídeo, a bactéria tem a habilidade de construir novas células vegetais por meio de uma ação natural de inserção do mesmo no DNA da planta hospedeira, para que a última produza substâncias de interesse à bactéria (Madden, 1995). Biologistas moleculares usam esta ferramenta para introduzir genes

exógenos, construindo plasmídeos do *Agrobacterium* com genes de sua preferência (Robinson e cols., 2000) já que a bactéria o introduzirá naturalmente na célula da planta.

No entanto, algumas monocotiledôneas como o milho, o arroz, o trigo e a cevada são resistentes ao *Agrobacterium* (Jones, 1992), sendo necessário, então, a transferência dos genes por outros métodos como biobalística (bombardeamento), eletroporação e microinjeção.

Desenvolvimento de novos produtos e disponibilidade mundial de AGMs

O plantio comercial de variedades geneticamente modificadas vem aumentando substancialmente nos últimos dez anos e gerando impactos significativos na economia mundial e no meio ambiente. Pode-se dizer que este aumento decorre da grande variedade de benefícios que a tecnologia do DNA recombinante pode e está oferecendo atualmente.

Um estudo sobre o impacto global cumulativo da tecnologia GM entre 1996 e 2005 baseado nos efeitos sócio-econômico e ambiental (rendimento da colheita, impacto do uso de herbicidas e inseticidas nas plantações e a emissão de gases poluentes provenientes de combustíveis de maquinário necessário) demonstrou benefícios econômicos significativos para os produtores de países desenvolvidos e em desenvolvimento da ordem de \$27 bilhões. Esta economia é resultado do uso em menor escala de 224 milhões de kilogramas de pesticidas acompanhado de uma redução de 15,3% do impacto ambiental (Brookes & Barfoot, 2006).

Existem mais de 150 vegetais GM diferentes aprovados para produção em torno do mundo, incluindo cereais, leguminosas, vegetais fibrosos, frutos, nozes e plantas ornamentais. Estas modificações permitem a introdução de novos traços nos alimentos para torná-los tolerantes, resistentes, mais produtivos, mais saborosos, mais nutritivos, mais duráveis (com capacidade de manter maior vida de prateleira), menos agressivos ao meio ambiente, veicular medicamentos e/ou vacinas, ou qualquer outro objetivo passível da nova técnica (Madden, 1995; Robinson e cols., 2000; Chassy, 2002; Aulrich e cols., 2002; Sharma e cols., 2002; Clugstom & Smith, 2002; Moffat, 2002). A tabela 1 apresenta alguns exemplos de vegetais em escala comercial.

Tabela 1: Alguns dos alimentos transgênicos liberados para plantio comercial.

Países	Alimentos	Características
Canadá	Abóbora	Resistência a vírus
	Batata	Resistência a insetos e vírus
	Beterraba	Tolerância ao glufosinato
	Canola	Tolerância ao glufosinato, fertilidade, teor de óleo modificado
	Mamão	Resistência a vírus
	Milho	Tolerante a herbicida, resistente a inseto e maior teor lisina
	Soja	Tolerância a herbicida e teor de óleo modificado
	Tomate	Maturação tardia e resistência a insetos
Estados Unidos	Abóbora	Resistência a vírus
	Alfafa	Tolerância a herbicida
	Batata	Resistência a insetos e tolerância a herbicida
	Canola	Tolerância a herbicida.
	Mamão	Resistência a vírus
	Milho	Resistência a insetos e tolerância a herbicidas.
	Soja	Tolerância a herbicidas
	Tomate	Resistência a insetos e maturação tardia
México	algodão	Resistência a insetos e tolerância a herbicidas
	Soja	Resistência a insetos e tolerância a herbicidas
	Tomate	Maturação tardia
Argentina	Milho	Resistência a insetos
	algodão	Tolerância a herbicida
	Soja	Tolerância ao glifosato
Brasil	Soja	Tolerância ao glifosato
	Milho	Tolerância a herbicida e tolerância a inseto
	algodão	Resistente a insetos
Coréia	Milho	Tolerância ao glifosato e resistência a insetos
	Soja	Tolerância a herbicida
Japão	Batata	Resistência a insetos e vírus
	Beterraba	Tolerância a herbicidas
	Canola	Tolerância a herbicidas e fertilidade
	Milho	Resistência a insetos e tolerância a herbicidas
	Soja	Tolerância a herbicidas e teor de óleo modificado
	Tomate	Maturação tardia
China	Milho	Resistência a insetos e tolerância a herbicidas
	Soja	Tolerância ao glifosato
	tomate	Maturação tardia e resistência a vírus
	pimentão	Resistência a vírus
Bulgária	Milho	Resistência a insetos
	Soja	Tolerância ao glifosato
Filipinas	Milho	Resistência a insetos e tolerância a herbicidas
	Soja	Tolerância ao glifosato
União Européia	Canola	Tolerância a herbicidas
	Chicória	Tolerância a herbicidas e fertilidade
	Milho	Tolerância a herbicida e resistência a insetos
	Soja	Tolerância ao glifosato
Suíça	Milho	Tolerância a herbicida e resistência a insetos
Colômbia	Milho	Resistência a insetos
Índia	Algodão	Resistência a insetos
Austrália	Batata	Resistência a insetos e vírus
	Beterraba	Tolerância ao glifosato
	Canola	Tolerância a herbicidas e fertilidade
	Milho	Tolerante a herbicida, resistente a inseto e maior teor lisina
	Soja	Tolerância ao glifosato e teor de óleo modificado

Fonte: Relatório ISAAA n°37 - 2007 (James, 2007).

Desde 1980, várias empresas alimentícias pesquisam as possibilidades oferecidas pela biotecnologia vegetal em prol da melhoria do suprimento alimentar no mundo. O ano de 1990 ficou marcado pelo início das realizações nesta área. Depois de extensivos períodos de descobertas, pesquisas, testes e revisões de regulamentos nacionais, sementes de tomate conhecido como Flavr SavrTM com capacidade de amadurecimento tardio foi lançado em 1994, bem como sementes melhoradas com tolerância a herbicidas e proteção contra insetos tornaram-se disponíveis em 1996 (Rogers, 1998).

A princípio, as modificações resultaram em benefícios principalmente voltados ao agricultor e ao meio ambiente com os alimentos tolerantes a herbicidas e resistentes a pesticidas, contendo somente benefícios indiretos aos consumidores (Cockburn, 2002). Podem ser tomados como exemplos a criação de alimentos caracterizados como tolerantes a herbicidas em alimentos como soja, canola, algodão e milho (Cromwell e cols., 2002), resistentes a insetos e vírus como arroz geneticamente modificado para expressar resistência a um inseto (Duan e cols., 1996), batata alterada geneticamente para expressar o SKTI (inibidor de tripsina tipo de Kunitz da soja) para resistir contra a larva de mariposa *L. oleracea* (Gatehouse e cols., 1999), tabaco geneticamente alterado para expressar inibidores de tripsina provenientes da mostarda (De Leo&Gallerani, 2002) e muitos outros. E ainda, na última década, pesquisadores têm utilizado, com sucesso, a tecnologia de marcadores moleculares, a qual permite uma identificação mais precisa de genes que trazem características capazes de tornar a planta apta a viver em condições áridas, sob estresse constante, como baixas temperaturas e altas concentrações de sal, além de outras condições ambientais e climáticas (Moffat, 2002; Cockburn, 2002).

Entretanto, uma segunda geração de produtos geneticamente modificados com benefícios diretos ao consumidor está em linhas de pesquisa (Bren, 2003). Um exemplo é o teor aumentado de ácido esteárico nos óleos de milho e canola sem a necessidade de hidrogenação química e a produção conseqüente de ácidos graxos *trans* (Cockburn, 2002), ou mesmo, batatas com teores aumentados de amido e reduzido de água (Madden, 1995), batata contendo proteína de melhor qualidade (Chakraborty e cols., 2000); alimentos que contenham maiores teores de minerais (Lönnerdal, 2003) e menores teores de fatores antinutricionais (Holm e cols., 2002). Algumas variedades já estão disponíveis para comercialização como é o caso da

soja com perfil modificado de ácidos graxos (Austrália, Canadá, Japão, Nova Zelândia, EUA), canola com a mesma característica (Canadá, EUA), o milho com maior teor de lisina (Austrália, Canadá, Japão, México, Filipinas, EUA) e o fumo, que apesar de não ser alimento reflete diretamente na saúde do consumidor, com menor teor de nicotina (EUA).

E ainda, através de engenharia genética, variedades tradicionais podem ser utilizadas para produzir substâncias químicas valiosas em escala agrônômica. Este conceito, conhecido como biofábricas, permitiria produzir anticorpos, hormônios, enzimas e outras importantes ferramentas contra doenças para populações de baixa renda (Jones, 1992; Loza-Rubio & Gómez-Lim, 2006).

Soja tolerante ao glifosato

A soja tolerante ao glifosato é o cultivar transgênico mais cultivado no mundo (Reddy, 2001; Duke e cols., 2003) e é comercializada desde 1996 (Goodman & Leach, 2004).

O glifosato (*N*-fosfoenometil-glicina) é um herbicida não seletivo usado extensivamente em todo o mundo durante três décadas em lavouras no período de emergência até a floração do vegetal. Eficaz contra a maioria dos capins anuais e perenes e contra plantas daninhas de folhas largas, mata ou diminui o tamanho destas e, desta maneira, maximiza a rentabilidade da colheita e a qualidade nutricional do vegetal (Reddy, 2001; Rogers, 1998). Age inibindo uma enzima (EPSP-sintase) necessária para a síntese de aminoácidos aromáticos, essencial para o crescimento da planta (Steinrücken & Amrhein, 1980; Reddy, 2001). No cultivo convencional, o herbicida deve ser aplicado somente na preparação do solo e após a semeadura antes da emergência da plântula.

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a introdução de um gene na soja que a tornasse tolerante especificamente a este herbicida (Padgett e cols., 1995). Esta soja, também conhecida como GTS, *Roundup Ready*®, ou simplesmente soja RR, permite o controle de ervas daninhas pelo uso do herbicida durante todo o ciclo de vida da planta.

Desde 1990, variedades tolerantes ao glifosato têm sido comercializadas como a soja, a canola, o algodão e milho (Reddy, 2001; Cromwell e cols., 2002). A tolerância pode ser vista como um benefício uma vez que atua no controle da

presença das ervas daninhas, consideradas economicamente destrutivas e nutricionalmente prejudiciais. Tendo como foco o valor nutricional do grão, pode-se dizer que sem a disputa por nutrientes o vegetal minimiza a síntese de substâncias que agem como fatores antinutricionais ligadas aos mecanismos de defesa das plantas, melhorando, conseqüentemente a qualidade do mesmo (Shaner, 1995).

O modo primário de ação do glifosato é a inibição competitiva para o fosfoenolpiruvato e não competitiva para o chiquimato 3-fosfato, resultando numa ligação ao complexo 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) / chiquimato-3-fosfato. Este complexo ternário estável (EPSPS/chiquimato-3-fosfato/glifosato) impede a atuação biológica da enzima e, ainda, bloqueia o transporte do EPSP (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato) para o cloroplasto. Com o bloqueio desta reação, as plantas convencionais tratadas com glifosato não conseguem produzir aminoácidos aromáticos essenciais à sua sobrevivência (Coruzzi & Last *in* Buchanan e cols., 2000) (Figura1).

Esta enzima somente é alvo fisiológico do glifosato em vegetais, ou seja, está presente em plantas, bactérias, fungos, mas não em animais (Rogers, 1998).

O gene da EPSP-sintase pode ser clonado de qualquer espécie vegetal e, sofrendo uma mutação (glicina ao invés de alanina), se torna insensível ao herbicida por ter baixa afinidade pelo mesmo, tornando-se cataliticamente ativo na presença do herbicida (Coruzzi & Last *in* Buchanan e cols., 2000). Então pode agir, tanto no citoplasma quanto nos cloroplastos, dando continuidade à rota dos aminoácidos aromáticos e a conseqüente síntese de metabólitos secundários aromáticos.

A introdução de um gene quimérico que expressa a enzima EPSP-sintase tolerante ao glifosato não deve afetar, a princípio, o desenvolvimento das plantas modificadas para a inclusão desta característica, no entanto, há possibilidade de alterações de genes pré-existentes causadas pela inserção do gene na planta. Em conseqüência, há dúvidas sobre eventuais perdas do perfil nutricional da semente (Rogers, 1998), ou outras implicações.

Reddy (2001) e Pline e cols. (1999) suscitam a possibilidade de o glifosato causar injúria, como a diminuição dos níveis de clorofila, em cultivares de soja, uma vez que este composto é dependente da temperatura, da quantidade e forma de aplicação do herbicida a que o vegetal foi submetido. Quanto maior a temperatura e as taxas de herbicida, maior a perda de clorofila. Porém, sugerem também que estas respostas dependem da suscetibilidade do vegetal, da localização do cultivo,

condições ambientais, tipos de solo, ecologia microbiológica do local, entre outras variáveis.

Para a obtenção do controle efetivo das ervas durante o cultivo da soja GM tolerante ao glifosato, o herbicida deve ser aplicado após a emergência da maior parte das ervas, ou seja, em torno de 18 a 28 dias após o plantio. As aplicações podem ser em dose única ou em dose dupla da emergência ao florescimento (Reddy, 2001).

Figura 1. Mecanismo de ação do herbicida glifosato sobre a EPSPsintase na síntese de aminoácidos aromáticos (Coruzzi & Last *in* Buchanan e cols., 2000).

Taylor e cols. (1999), Padgett e cols. (1995) e Cromwell e cols. (2002) realizaram análises composicionais e de segurança na soja tolerante ao glifosato e não encontraram diferença entre ela e sua cultivar parental. Entre estas análises

estavam inclusas dosagens de níveis de expressão da CP4 EPSPS, níveis de aminoácidos, análise da composição centesimal e isoflavonas.

Hammond e cols. (1996) realizaram ensaios com animais (ratos, gatos, aves e gado leiteiro) e não encontraram nenhum efeito adverso nos animais alimentados com soja alterada geneticamente para expressar tolerância ao glifosato.

Produção de Soja Transgênica no País e no mundo

Em 2007, a soja tolerante ao glifosato foi plantada em 58,6 milhões de hectares correspondendo a 64% do total global de 91 milhões de hectares de soja e 57% da área global de cultivares geneticamente modificadas. A variedade é cultivada em países como EUA, Canadá, Argentina, Paraguai, Uruguai, África do Sul e México (James, 2007).

Em 2008, a Embrapa já lançou mais de 30 novas variedades de cultivares de soja transgênica tolerantes a herbicidas adaptadas para plantio em vários estados do Brasil, tendo como foco as especificidades de cada região. Só em 2005, a Embrapa e 250 produtores de oito fundações de apoio à pesquisa, multiplicaram sementes de soja geneticamente modificada (safra 2004/2005) por todas as regiões produtoras do país, o que resultou em 26,8 mil hectares de cultivo com 670 mil sacas, multiplicadas novamente na safra 2005/06, antes de chegarem, em grande escala, às mãos dos agricultores brasileiros (<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2005>).

Em termos de mercado nacional, a safra 2002/03 de soja RR atingiu cerca de 18% da área total plantada no Brasil, sugerindo uma semeadura de cerca de 3,4 milhões de hectares.

De acordo com Galvão & Borchgrave (2004), as variedades transgênicas têm a vantagem de reduzir os custos de produção, substituir herbicidas mais tóxicos e de difícil degradação no meio ambiente por outros menos tóxicos e de rápida degradação, facilitar o manejo da lavoura e o emprego do plantio direto, práticas ambientalmente amigáveis. Para o produtor, primeiramente, estima-se que a adoção da soja Roundup Ready (RR) possa permitir uma redução média de custos da ordem de US\$ 35,00/hectare e para os consumidores, um dos benefícios esperados é o de preços mais baixos para produtos derivados da utilização dessa tecnologia. (http://www.cib.org.br/pdf/artigo_anderson.pdf).

Segurança dos Alimentos Geneticamente Modificados

A segurança alimentar é dependente de circunstâncias políticas, sociais e econômicas em níveis regional, nacional e mundial. De modo mais específico, o alimento deve estar disponível, as pessoas devem ter acesso a ele, e ainda, ele deve ser nutricionalmente adequado em termos de quantidade, qualidade e variedade (Hotta, 2000). Para isso, a disponibilidade de alimentos deve suprir a demanda populacional crescente em todo o mundo.

Os avanços na agricultura como métodos de irrigação, preparo do solo, seleção e melhoramento genético, além do uso de agroquímicos contribuíram para a estabilidade, a diversidade e a abundância de alimentos existentes atualmente (Rogers, 1998).

A implementação de ferramentas da genética e biologia molecular vem provando que são complementares e essenciais ao melhoramento genético tradicional, devido à sua capacidade de fornecer dados básicos do genoma de espécies dos reinos animal ou vegetal, para viabilizar soluções de problemas antes indecifráveis. Estas informações elucidam a função do gene e a complexa interação dos genes que resultam em fenótipos diferentes sob distintas condições ambientais (Sharma e cols., 2002). Técnicas atualmente disponíveis como mutações, mapeamento de traços por marcadores moleculares, clonagem posicional, manipulações genéticas e transformações de genes desejáveis asseguram poder e velocidade ao melhoramento genético (Holm e cols., 2002).

Mais de 20 espécies de novas plantas, incluindo os cultivares de grande importância econômica, têm sido modificadas geneticamente com sucesso (Goodman & Leach, 2004). O intuito é melhorar a proteção contra insetos, retardar o amadurecimento, resistir a vírus e a doenças, melhorar a qualidade dos óleos e do amido, bem como tolerar herbicidas e outros defensivos agrícolas.

Porém, Cockburn (2002) suscita que em qualquer transferência de genes, como nas cultivares tradicionais ou naquelas geneticamente modificadas, existe o risco potencial de alterar a segurança dos alimentos. A expressão de um ou mais novos genes no vegetal pode estar associada às reações adversas, sobretudo de toxicidade e alergenicidade, através de alterações na estrutura das moléculas. Estes novos constituintes podem ser produzidos quando as modificações levam ao

silenciamento ou à inativação de genes essenciais e a alterações no metabolismo secundário das plantas.

Devido a este fato, existe a necessidade de rigorosas especificações para assegurar a inocuidade destes produtos para a saúde humana, animal e do ambiente (Novak & Haslberger, 2000; Cockburn, 2002; Madden, 1995; Belém e cols., 2000^B, Metcalfe e cols., 1996). Duke e cols. (2003) sugerem que a introdução de um cultivar geneticamente modificado no mercado só deve ocorrer após uma discussão científica sobre questões relacionadas ao potencial efeito pleiotrópico do gene inserido tanto na qualidade dos alimentos quanto na área da nutrigenômica.

Um alimento será considerado seguro se houver razoável certeza de que seu consumo, sob condições apropriadas, não implicará em nenhum dano à saúde (OECD, 1992). Por muitos anos, novos cultivares de programas de melhoramento genético tradicional têm sido liberados no mercado com características benéficas em relação às variedades anteriores, como cultivares de trigo resistentes a doenças e com proteína de melhor qualidade, sem que nenhum teste de inocuidade alimentar tenha sido feito (Belém e cols., 2000^B; Chassy, 2002). Entende-se ser inócuo neste caso o cruzamento entre duas variedades de uma planta de forma que qualquer que seja a combinação de seus genes, não haveria produção de compostos tóxicos que gerassem reações adversas.

No entanto, Hashimoto e cols. (1999) alertam que o aumento dos níveis de expressão protéica em algumas novas variedades, que receberam novos genes inseridos, poderia provocar tanto alterações nutricionais como distúrbios metabólicos imprevisíveis nos novos alimentos, devido ao fato de proporcionarem desvios de rota por parte de alguns compostos (como aminoácidos) para a produção dos polipeptídeos expressos pelos genes exógenos.

A segurança, ou avaliação de risco, de alimentos geneticamente modificados está baseada na identificação do perigo, caracterização deste perigo e o cálculo da exposição a este perigo (Kuiper e cols., 2001).

O perigo pode ser definido como o potencial intrínseco de um material de causar efeitos adversos à saúde devido a três fatores: a) sua toxicidade e/ou alergenicidade; b) alteração nutricional ou efeitos antinutricionais e c) possibilidade remota de transferir genes a bactérias ou células de mamíferos (Cockburn, 2002). Já o risco é determinado em função da probabilidade de que um efeito adverso ocorra em presença de um composto perigoso no alimento e a severidade deste efeito

adverso, portanto uma função da exposição e da toxicidade (Kuiper e cols., 2001). Esta exposição é quantificada em termos de dose, intensidade, duração e rota (Cockburn, 2002).

Os parâmetros de avaliação fundamentam-se no conceito de equivalência substancial, determinada pela comparação da composição da nova variedade com seu análogo convencional com o intuito de identificar diferenças intencionais e não intencionais essenciais para a avaliação do seu impacto no ambiente, sua segurança para o consumo humano e animal e ainda, a sua qualidade nutricional. O critério de comparação é baseado na razoável certeza de que o alimento-fonte é considerado seguro pelo seu histórico de uso (OECD, 1993).

A abordagem comparativa para averiguar se o vegetal GM é tão seguro quanto seu análogo convencional abrange vários aspectos de avaliação como efeitos toxicológicos, nutricionais, microbiológicos e ambientais (Cockburn, 2002; EFSA, 2008). Um esquema de procedimento detalhado necessário para acessar a segurança de um alimento GM é demonstrado na figura 2.

Figura 2 : Esquema de procedimento detalhado necessário para calcular a segurança de um alimento GM (adaptado de EFSA, 2008).

Em geral, o cálculo de segurança é focado na presença e nas características das novas proteínas expressas, além de possíveis alterações nos compostos naturais do alimento em virtude da variação normal do mesmo após uma

multiplicação. No entanto, a visão preliminar da estratégia de testes de segurança e naqueles de enfoque nutricional deve ser voltada para dados de origem do vegetal parental convencional, do gene inserido e do papel pretendido da nova proteína no vegetal GM, bem como seu potencial tóxico e/ou alergênico (EFSA, 2008).

De acordo com a OECD (1993), produtos únicos de expressão dos genes e novos metabólitos devem ser submetidos a testes específicos de toxicidade e alergenicidade, realizados *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, de acordo com métodos apropriadamente padronizados por comunidades científicas.

Quando o foco é o novo alimento, o mesmo deve ser submetido a análises composicionais para a identificação de similaridades e potenciais diferenças entre o cultivar GM e a convencional parental. Dentre estas análises destaca-se a determinação de quantidades aproximadas de macro e micro-nutrientes e a possível presença e caracterização de toxinas inerentes, alérgenos e anti-nutrientes (Metcalf e cols., 1996; Goodman & Leach, 2004, EFSA, 2008).

A ocorrência de efeitos não intencionais é uma das principais questões a serem consideradas durante a avaliação de segurança de um alimento GM. Efeitos não-intencionais podem ser definidos como “diferenças consistentes entre o vegetal GM e seu controle, aquém daquela esperada com a introdução de um gene alvo” (EFSA, 2006). Alguns desses efeitos podem ocorrer devido ao rearranjo genético causado pela inserção do novo gene e/ou também por ocasionais rupturas na via metabólica do vegetal receptor. Dentre as mudanças podem-se citar alterações nas vias metabólicas maximizando níveis antes normais de toxinas endógenas ou alérgenos, ou presença de níveis inferiores aos encontrados no vegetal parental de nutrientes essenciais, além da possível expressão de genes que anteriormente estavam silenciados que codificam alérgenos ou toxinas (EFSA, 2008).

Vale a pena lembrar que a ocorrência destes efeitos não-intencionais não é um fenômeno específico da engenharia genética. Em melhoramento genético clássico, a seleção de linhas desejáveis e o descarte de linhas indesejáveis é prática normal dos melhoristas, a fim de remover efeitos não intencionais (Bueno e cols., 2001; Kuiper e cols., 2001).

Ao contrário destes testes de segurança citados acima para AGMs, plantas produzidas por métodos tradicionais de melhoramento genético comercializadas

atualmente não sofreram nenhum teste de avaliação de sua segurança (Kuiper e cols., 2002), ao passo que os alimentos transgênicos são rigorosamente avaliados dentro de um processo global de análise de sua segurança alimentar, por meio de métodos *in vitro* e *in vivo*, antes de serem liberados para comercialização (Belém e cols., 2000^A).

O Brasil, para possibilitar o desenvolvimento da biotecnologia com segurança, estabeleceu através de legislação específica normas de biossegurança para regulamentar o uso da engenharia genética e a liberação no meio ambiente de organismos modificados (Figura 3) (Belém e cols., 2000^A).

Figura 3: Fluxograma de avaliação do potencial de gerar efeitos adversos em alimentos derivados de cultivares geneticamente modificados.

Um dos pontos principais de avaliação de risco, contribuindo para a garantia de segurança de alimentos geneticamente modificados, é a análise do potencial de alergenicidade das proteínas codificadas pelos genes inseridos (Cockburn, 2002;

EFSA, 2008). Essas modificações genéticas podem afetar a alergenicidade dos OGMs de duas formas principais: pela introdução de alérgenos estranhos ou pela modificação do nível ou da natureza de alérgenos intrínsecos (Souza Junior & Martins, 2003).

Cálculo do potencial de alergenicidade dos AGMs

Os alimentos podem ser alérgenos de alta prevalência, baixa prevalência ou sem nenhum histórico de alergenicidade. Para os primeiros, define-se como os 8 alimentos de alergenicidade conhecida responsáveis por 90% das alergias alimentares, cujas reações clínicas podem ser, muitas vezes, fatais (L'Hocine & Boye, 2007). Alérgenos de alta prevalência são aqueles para os quais 50% dos indivíduos desenvolvem reações clínicas de pele ou por imunoenaios de reatividade. Para o segundo grupo, são materiais não totalmente disponíveis como pólen, bolor, venenos e outros (Metcalf e cols., 1996).

O cálculo do potencial de alergenicidade dos alimentos derivados da biotecnologia deve ser focado num processo analítico diferenciado no qual são fundamentais alguns parâmetros como o conhecimento da fonte alimentar de origem do gene da nova proteína, comparações de seqüências de aminoácidos da nova proteína com alérgenos conhecidos por meio de análises *in silico* com programas específicos como FASTA ou BLAST (King e cols., 1994), testes *in vitro* da nova proteína e/ou do alimento GM como imunoreatividade de compostos íntegros ou aqueles submetidos a diferentes pHs e/ou hidrólise enzimática e temperatura com a imunoglobulina E (IgE) presente em soros de pacientes comprovadamente alérgicos (Metcalf e cols., 1996; Goodman & Leach, 2004; Cockburn, 2002). E ainda, sob circunstâncias específicas recomenda-se um teste cutâneo SPT (skin prick test) (Goodman & Leach, 2004).

Em 1996, órgãos internacionais como a OECD (Organização para Colaboração e Desenvolvimento Econômico), a FAO/WHO, a IFBC (Conselho Internacional de Biotecnologia Alimentar) e o Instituto de Alergia e Imunologia do Instituto Internacional de Ciências Vitais (ILSI) definiram uma série de condições para acessar o potencial alergênico de novas proteínas introduzidas em alimentos geneticamente modificados por meio de uma árvore decisória (Cockburn, 2002, Goodman & Leach, 2004), a fim de assegurar que os alimentos derivados de uma

nova variedade não introduzirão outros alergênicos, além daqueles que já existem no mercado (Fig. 4) (Metcalf e cols., 1996).

A estratégia do cálculo por meio da árvore decisória tem sido amplamente utilizada e vêm provando eficácia, como é o caso da introdução de um gene da castanha-do-Pará que codificava uma proteína alergênica na soja a fim de melhorar seu perfil aminoacídico (Nordlee e cols., 1996). Após a detecção do potencial de alergenicidade, o desenvolvimento da soja geneticamente modificada foi interrompido.

Figura 4: Árvore decisória para monitoramento de alergenicidade de produtos da moderna biotecnologia. Adaptado de FAO/WHO, 2001.

Porém, em 2001, a FAO/WHO detectou que a árvore decisória não seria conclusiva com relação ao potencial de alergenicidade da proteína, caso a fonte protéica não tivesse histórico ou uso dietético freqüente e, com isso, acrescentou algumas recomendações a fim de aprimorar esta estratégia de avaliação. Cockburn (2002) expôs duas delas: a definição e validação prévia para implementação de métodos de avaliação de soros de pacientes com histórico alergênico e de modelos animais, além do uso de epítomos contendo uma sequência linear de 8 ou mais

aminoácidos uma vez que resultaria em baixos números de falsos positivos e valores não tão previsíveis.

Por outro lado, a tecnologia de modificação genética oferece a oportunidade de reduzir ou eliminar alergênicos protéicos que ocorrem naturalmente em alimentos específicos (FAO/WHO, 2001). Pesquisadores têm trabalhado para retirar alergênicos naturalmente presentes em trigo, leite e amendoim. Assim, a biotecnologia tem contribuído para reduzir problemas com alergias alimentares e não para agravá-los (Avery, 2000).

Recentemente Herman e cols. (2003) silenciaram o gene de soja responsável pela síntese de *Gly m Bd 30K*, uma das três proteínas que desenvolvem reações alérgicas reduzindo as reações *in vitro* com soros de pacientes sensíveis.

Goodman & Leach (2004) supõem que a modificação genética pela introdução de um ou mais genes não é suficiente para alterar substancialmente o potencial de alergenidade do vegetal, a menos que o gene introduzido codifique uma proteína com alta similaridade de seqüências aminoacídicas.

1.2.2 Alergia Alimentar

Sob condições de saúde, o sistema imune reage a antígenos dietéticos inócuos pela indução de uma resposta sistêmica não receptiva específica a antígenos chamada de tolerância oral, enquanto que sob condições patológicas, como a alergia, acredita-se que há uma desregulação nesta resposta imunológica (Gizzarelli e cols., 2006).

A alergia alimentar envolve uma resposta imunológica anormal a proteínas alimentares mediada por uma reação de hipersensibilidade tipo 1, pela ação de Imunoglobulina E (Helm, 2002). Este mecanismo pode ocorrer em duas vias: a sensibilização que induz o sistema imunológico a produzir anticorpos de alta afinidade, particularmente os da classe das IgEs; e a resposta alérgica, na qual a pessoa sensibilizada desenvolve sintomas alérgicos (Aalberse, 2000), como urticária, angioedema, vômitos, hipotensão, dificuldade na respiração, edema faringeal, diarreia e ou choques anafiláticos (Beyer e cols, 2002; Goodman & Leach, 2004).

Alérgenos, incluindo proteínas alimentares, são moléculas que induzem a produção de IgE, a qual se liga a células maduras e basófilos, que, quando presentes com frequência, permitem a liberação de potentes mediadores como histamina e leucotrienos que causam a ocorrência dos sintomas da resposta alérgica (Helm, 2002; Goodman & Leach, 2004; Mills e cols., 2004). De acordo com Yum e cols. (2005), em geral são glicoproteínas solúveis em água com pesos moleculares em torno de 5 a 60 KDa e estáveis ao aquecimento, acidez e tratamentos com proteases. Já para os componentes do Painel de GMO EFSA (2008), com raras exceções, a maior parte dos alérgenos alimentares são proteínas.

A sensibilização por alérgenos alimentares pode ocorrer com a ingestão, contato na pele ou inalação, desencadeando frequentemente reações sistêmicas. Não se sabe a causa de certos alimentos serem mais alergênicos que outros, mas o nível de exposição a agentes sensibilizadores e as propriedades estruturais e biológicas das proteínas desempenham um papel importante na predisposição do organismo aos alérgenos por possibilitar a ocorrência de interações com o sistema imunológico (Mills e cols., 2004).

Para que ocorra uma resposta mediada por IgE, um alérgeno deve ser capaz de entrar no organismo (cruzar a barreira da mucosa) e manter integridade estrutural

suficiente para interagir com o sistema imunológico. Para isso, alérgenos alimentares devem ser estáveis a processos térmicos e resistentes a condições digestivas (Mills e cols., 2004).

O diagnóstico de alergia alimentar deve ser obtido por um teste padrão conhecido como Teste de provocação alimentar duplo-cego placebo-controlado (DBPCFC). Por ser laborioso e de alto risco, seu uso é restrito a pesquisas acadêmicas realizadas em locais apropriados como hospitais (Bock e cols, 1988; Bruijnzeel-Koomen e cols., 1995; Poulsen, 2001). Os resultados deste teste são essenciais para estabelecer uma relação entre outras abordagens diagnósticas e a situação clínica do paciente, para, enfim, representar a prova definitiva para se atestar a alergenidade de um dado alimento.

No entanto, um diagnóstico de sensibilidade pode ser obtido de uma forma mais simples como a realização de um teste de desafio conhecido como skin prick test (SPT), com a presença de extratos de vários alimentos ou aqueles considerados suspeitos e a posterior confirmação do resultado com um teste *in vitro* com IgE específica do paciente como RAST (Teste radio-absorvente de sensibilização a alimentos), ELISA ou CAPTM – FEIA (imunoensaios enzimáticos fluorescentes) e western blotting. (Goodman & Leach, 2004).

Lack (2004) sugere que as diferenças genéticas da população, respostas imunes do hospedeiro, padrões de amamentação, composição do leite materno, idade do desmame, padrão do consumo de novos alimentos e a forma e extensão do processamento dos novos alimentos como os GMs podem interagir para determinar se a introdução deste novo alimento em uma população levará à sensibilização alérgica.

Prevalência

Reações alérgicas podem ser severas. Um número pequeno de reações a poucos dos muitos alérgenos conhecidos pode resultar num número de mortes estimado em 100 a 200 nos EUA por ano (Goodman & Leach, 2004). Em termos globais, mais de 6 % das crianças e 4% dos adultos da população mundial são alérgicos a algum alimento (Lack, 2004).

A exata prevalência da alergia à soja na população em geral é desconhecida e é dependente do hábito alimentar da região e da exposição ao alimento; no

entanto, sugere-se uma taxa de 0,3 a 0,4% da população geral (L'Hocine & Boye, 2007; Lee e cols., 2007^B).

Reações alérgicas a soja não são muito comuns, principalmente pela sua presença em muitos produtos para uso humano e animal (Burks e cols, 1988). Afeta em torno de 6% de crianças atópicas e possui manifestações clínicas comuns às alergias como enterocolite grave, eczema atópico e raramente reações sistêmicas IgE-mediadas. Embora reações severas à soja sejam raras em relação a outros alimentos como amendoim, nozes, peixe e crustáceos, eventos fatais após a ingestão podem ocorrer (L'Hocine & Boye, 2007).

Caracterização dos alérgenos presentes na leguminosa

A soja apresenta pelo menos 16 proteínas alergênicas (Batista e cols. 2007; L'Hocine & Boye, 2007; Gizzarelli e cols., 2006; Lee e cols, 2007^B).

De acordo com as propriedades funcionais e estruturais, as proteínas são agrupadas em famílias cuja classificação se baseia no percentual de identidade residual (se 30% ou mais) entre umas e outras ou se possuem identidades seqüenciais inferiores acompanhado de funções e estruturas similares. Muitos alérgenos pertencem à superfamília das cupinas, representadas pelas frações 7S e 11S das proteínas de reserva da soja e à superfamília das prolaminas, representadas pela fração 2S, que, por sua vez é composta por proteínas albumina 2S (as nsLTPs -proteínas transportadoras de lípidos não-específicas-, os inibidores de alfa-amilase/tripsina e as prolaminas de reserva presentes nos cereais). Existem também as proteínas relacionadas à patogênese (PRs) que representam uma coleção de 14 famílias protéicas de vegetais que estão envolvidas com a resistência do vegetal a patógenos ou condições ambientais adversas (Lack, 2004; Breiteneder & Radauer, 2004; L'Hocine & Boye, 2007).

Análises ultracentrifugacionais que dividem as proteínas de soja em coeficientes de sedimentação revelam quatro frações conhecidas como 2S, 7S, 11S e 15S. Estas frações não são homogêneas, ou seja, contém proteínas distintas, de peso aproximado (L'Hocine & Boye, 2007; Mills e cols., 2004). A fração 2S contém 2 a 15% de proteína extraída da soja e consiste em enzimas e alguns inibidores de protease como o Kunitz e o Bowman-Birk. A fração 7S compreende 35% de proteínas solúveis e contém a β -conglucina, proteína de reserva que abrange 85%

das proteínas desta fração. A fração 11S compreende 31 a 52% das proteínas solúveis da soja, sendo que aproximadamente 85% deste montante é composto por glicinina. Já a fração 15S é composta por cerca de 10% da proteína total extraída e contém polímeros de proteínas da soja (L'Hocine & Boye, 2007; Sathe e cols., 2005; Mills e cols., 2004). As características biológicas do grão e bioquímicas das proteínas serão abordadas adiante.

As proteínas de alto potencial alergênico presentes na leguminosa são a *Gly m* Bd 30 K, a β -conglucina, a *Gly m* Bd 28 K, a glicinina, o inibidor de protease do tipo Kunitz, algumas proteínas presentes na casca (*Gly m* 1.0101, *Gly m* 1.0102 e *Gly m* 2), a profilina (*Gly m* 3), a SAM 22 (*Gly m* 4), além de outros alérgenos como a lectina e a lipoxigenase (L'Hocine & Boye, 2007; Batista e cols., 2007; Gizzarelli e cols., 2006).

Métodos de detecção de alérgenos

De acordo com o FDA (Food and Drug Administration), o foco primário é conhecer a fonte alimentar da qual o gene foi extraído (Goodman & Leach, 2004), pois se foi obtido de uma fonte alergênica, é prudente considerar que a proteína manterá esta capacidade mesmo depois de transferido de matriz, a não ser que seja assegurado que o gene se expresse em partes não comestíveis do organismo vegetal que não atinjam o homem através de vias respiratórias ou orais (raízes de soja ou folhas de amendoim) (Metcalf e cols., 1996).

Independentemente da fonte alimentar da qual o gene foi extraído, um exame de similaridade de seqüências de aminoácidos da nova proteína com alérgenos conhecidos deve ser feita, considerando alérgenos não alimentares como pólenes, esporos de fungos e venenos de insetos (Metcalf e cols., 1996; Goodman & Leach, 2004). A bioinformática é a ferramenta utilizada para este fim e compara seqüências de aminoácidos (estrutura primária da proteína) com o uso de informações presentes em banco de dados de variedades cultivadas globalmente (Silvanovich e cols., 2006).

A alergenicidade de proteínas ocorre devido às numerosas estruturas imunorreativas (epítomos IgE-ligantes) que estão espalhados na molécula da proteína. Também conhecidos como determinantes antigênicos, os epítomos são porções do antígeno que reúnem aspectos físicos e químicos que favorecem o

reconhecimento por regiões específicas dos anticorpos. Uma única molécula antigênica normalmente possui vários epítopos diferentes (Vaz e cols, 2007).

Epítopos conformacionais são aqueles formados pelas estruturas secundária, terciária ou quaternária de uma proteína, ou pelo dobramento tridimensional normal de um polissacarídeo (Figura 5) (Sell, 1996). Caso, sejam desnaturados, perdem suas funções de epítopos (Vaz e cols, 2007).

Epítopos lineares são aqueles formados por resíduos dispostos sequencialmente de maneira linear num antígeno protéico ou polissacarídico (Figura 5) (Sell, 1996). Não são afetados por nenhum tratamento que altere a estrutura tridimensional da substância (Vaz e cols, 2007).

Figura 5 . Epítopos conformacionais e lineares. (STITES, 2000)

Tendo em vista o já conhecimento de seqüências de aminoácidos de epítopos alergênicos em alguns poucos alimentos, a comparação destas seqüências com as presentes em novas proteínas se baseia na provável identificação de similaridade entre elas, diagnosticando uma baixa ou alta probabilidade de apresentarem ligação com a IgE e, então, desencadearem um processo imunológico de hipersensibilidade.

No entanto, pode-se afirmar que este processo é limitado e não pode identificar epítopos conformacionais descontínuos, pois a análise é realizada com a proteína desnaturada, cuja cadeia de aminoácidos está na forma linear. Isso leva a crer que a conformação estrutural da cadeia é determinante para o reconhecimento do epítopo pela IgE (Metcalfe e cols., 1996; Lee e cols., 2007^B).

Porém, Metcalfe e cols. (1996) considera essencial o mapeamento dos aminoácidos e o reconhecimento dos epítomos responsáveis pela alergenicidade com métodos imunoquímicos, ou seja, reconhecimento por IgE, células T e B. Estudos indicam que um peptídeo que contenha entre 8 e 12 aminoácidos pode ser reconhecido por uma célula T, porém para o reconhecimento pelas células B, a sequência pode ser maior. Estes ensaios imunoquímicos *in vitro* podem ser por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), RAST (radio allerge sorbent test) e immunoblot.

Testes com IgE são recomendados em casos em que a proteína seja ou não derivada de uma fonte alergênica ou que tenha grande semelhança seqüencial a um alérgeno conhecido, pois haverá reconhecimento pela imunoglobulina de indivíduos que tem IgE específica para esta proteína ou a mesma tiver alta similaridade na sequência de aminoácidos com a anterior (Goodman & Leach, 2004).

Se um teste *in vitro* for negativo ou surgir uma dúvida por reação cruzada, é necessário realizar um teste *in vivo* como o SPT (skin prick test), utilizando a quantidade de 14 pacientes comprovadamente alérgicos por meio de testes padronizados (Metcalfe e cols., 1996).

É interessante ressaltar que as características físico-químicas e biológicas da nova proteína podem ser comparadas com as de proteínas conhecidamente alergênicas (Metcalfe e cols., 1996). A estabilidade, solubilidade, tamanho e compactabilidade da proteína são aspectos estruturais importantes para determinar a alergenicidade da mesma, uma vez que refletem dependência para o transporte pelas barreiras da mucosa e a susceptibilidade a proteases (Aalberse, 2000).

Porém, o principal pré-requisito para a avaliação do potencial de alergenicidade de uma proteína é sua resistência à hidrólise (Metcalfe e cols., 1996).

Digestibilidade e Estabilidade ao processamento

As mais simples e notórias características atribuídas aos alimentos alergênicos são a estabilidade ao aquecimento e a resistência à degradação enzimática (Helm, 2002).

Entende-se que pelo simples fato de a proteína ser capaz de suportar as condições ácidas e proteolíticas do trato digestório e, então, alcançar e cruzar a membrana mucosa do intestino, conclui-se então que possui alta probabilidade de

desenvolver a alergenicidade (Fuchs & Astwood, 1996; Metcalfe e cols., 1996). Por isso, um dos métodos mais utilizados para avaliar a alergenicidade de uma proteína é a detecção de fragmentos intactos ou de resíduos antigênicos após uma digestão artificial determinada por cromatografia líquida de alta performance e análises por imunoblot em gel de eletroforese. Além disso, respostas imunogênicas em animais podem contribuir para a avaliação da alergenicidade por meio da produção de IgE e IgG com liberação subsequente de mediadores imunológicos alérgicos (histamina, triptase, eosinófilos e fator α necrose) de células sensibilizadas de animais previamente sensibilizados (Helm, 2002).

De acordo com Metcalfe e cols (1996), quase todos os alérgenos alimentares são estáveis à digestão *in vitro* com enzimas proteolíticas, mantendo-se intactos ou em fragmentos proteolíticos por cerca de 2 minutos em fluido gástrico simulado. Algumas proteínas altamente alérgicas podem suportar mais de 60 minutos.

Segundo L'Hocine & Boye (2007), o tratamento térmico pode alterar significativamente a estrutura protéica, porém a natureza e a extensão destas alterações são dependentes da temperatura e da duração do tratamento. Esta alteração pode trazer a destruição de epítopos existentes nas moléculas nativas, bem como a exteriorização de outros antes escondidos por processos de dobradura da molécula.

As globulinas demonstram resistência à proteólise, como é o caso da glicinina que forma compostos intermediários estáveis (PM ~28 KDa) conhecidos como glicinina T quando submetidos a tripsinólise e/ou quimitripsinólise. Estes intermediários retêm a estrutura quaternária e resultam de pequenos cortes em subunidades ácidas para formar fragmentos de PM ~13 e 16 KDa, enquanto que as básicas permaneceram intactas. A resistência à desnaturação e à proteólise é uma característica geral dos membros da superfamília das cupinas (Mills e cols., 2004).

Vários fatores estão envolvidos na estabilidade da proteína como a estrutura 3-D compacta, ligações de dobraduras (pontes dissulfeto) e glicosilações (Mills e cols., 2004).

Considerações Gerais sobre a Imunoglobulina E

As imunoglobulinas E são anticorpos (proteínas) que possuem alta afinidade com seus antígenos, uma vez que são produzidas quando o organismo é

sensibilizado com uma proteína desconhecida (antígeno), desencadeando assim a ação da resposta humoral adaptativa (Vaz e cols, 2007). Esta resposta, primariamente gerada para proteger o organismo contra infecções com bactérias, vírus, parasitas e fungos, possibilita também uma reação inapropriada ou excessiva a um dado composto não necessariamente tóxico, causando uma hipersensibilidade ao mesmo (Roitt e cols, 2001).

Uma vez que a IgE é produzida em resposta a um grupo seletivo de antígenos como alérgenos em geral e parasitas (Vaz e cols, 2007), todos os indivíduos, sendo alérgicos ou não, podem conter quantidades consideráveis da imunoglobulina no soro sanguíneo. Isto explica a possível presença da imunoglobulina no soro de pacientes não-alérgicos em uma faixa extensa (< 10 a 10000 UI / ml), sendo que a maior parte das pessoas possui menos de 1 µg IgE/ml de soro sanguíneo (Roitt e cols, 2001).

Os anticorpos são formados por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ambas idênticas. Tanto uma quanto a outra contêm regiões variáveis aminotermiais e regiões constantes carboxitermiais que se combinam entre si entre as cadeias, ou seja, a região variável de uma cadeia pesada é justaposta a uma região variável de uma cadeia leve para formar o sítio de combinação com o antígeno (Vaz e cols, 2007).

O anticorpo possui uma especificidade tão grande que é capaz de reconhecer a substituição de 1 aminoácido. No entanto, como possuem afinidades diferentes a diversas substâncias, terminam por se ligar a um que não seja o seu antígeno de melhor complementaridade através de ligações mais fracas com regiões semelhantes, mas não idênticas, àquele que o induziu. Essa ligação é conhecida como reação cruzada (Sell, 1996).

Vaz e cols (2007) propõem três modelos de interação antígeno-anticorpo:

- a) Ligação com formação de rede estável conhecida como zona de equivalência;
- b) Ligação com formação de complexos instáveis por excesso de antígeno e
- c) Ligação com formação de complexos instáveis por excesso de anticorpo.

A ligação é do tipo não-covalente e é representada por forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e hidrofóbicas (Roitt e cols, 2001). Os antígenos possuem estruturas químicas que favorecem a complementaridade com o anticorpo, através de ligações não-covalentes reversíveis. As interações multivalentes entre antígeno e anticorpo são biologicamente significativas, uma vez

que imunocomplexos podem ser formados ao misturar o antígeno multivalente com anticorpo específico (Vaz e cols, 2007).

No próximo parágrafo serão descritos os autores que comprovaram por meio de ensaios imunoquímicos a alergenicidade das proteínas da soja.

A atividade de ligação das proteínas dos complexos 11S, 7S e 2S com a IgE foram inicialmente detectadas por Shibasaki (1980). Ogawa e cols (1991) afirma que a Gly m Bd 30K é considerada um grande alérgeno devido ao fato de apresentar 30% de homologia seqüencial com um alérgeno proveniente do pó (Der p1) e ainda conter 5 epítomos lineares. Ogawa e cols (1995) reconhecem a atividade de ligação da subunidade α da β -conglucina e determinaram, ainda, que os epítomos desta subunidade não têm ligação com a molécula de açúcar, afirmando que a alergenicidade da subunidade é independente de sua característica glicoprotéica. Hiemori e cols (2000) identificaram o resíduo da asparagina do carboidrato ligado à Gly m Bd 28 K como o local de ligação da IgE após ensaio de reatividade com soros de pacientes alérgicos à leguminosa. Helm e cols (2000) encontraram 11 epítomos lineares representados por seqüências de 15 aminoácidos com atividade de ligação à IgE em 1 das porções ácidas da molécula de glicina, enquanto que Xiang e cols (2002) identificaram atividade de ligação com a IgE por ambas as subunidades das cadeias ácidas da glicina. Awazuhara e cols (1997) demonstraram através de imunoblotting a reatividade da porção básica da glicina (20 KDa). Quirce e cols (2002) demonstraram resposta positiva cutânea ao inibidor de tripsina do tipo Kunitz da soja. Proteínas presentes na casca da soja como Gly m 1.0101, Gly m 1.0102 e Gly m 2 foram identificadas como alergênicas após realização de ensaio com soro de pacientes asmáticos na Espanha em 1999 (Anto e cols, 1989; Quirce e cols 2000). Gly m 3 (profilina) da soja foi caracterizada como alérgeno após ensaio de reatividade com soro de pacientes alérgicos (Rihs e cols, 1999). A Gly m 4 (SAM22) é uma proteína relacionada a patogênese que foi identificada como alérgeno em 1992 após o surgimento de similaridade de quase 50% da seqüência aminoacídica com o alérgeno Bet v 1, o qual é responsável por mais de 95% das doenças alérgicas no nordeste e centro da Europa e na América o Norte (Crowell e cols, 1992).

1.2.3 A soja

A existência da soja é descrita desde 1000 anos antes de Cristo no Japão e na China e, somente a partir do século XIX, passou a ter importância econômica de expressão mundial (Miura e cols., 2000).

A soja, *Glycine Max*, é uma leguminosa anual, oleaginosa, originária no clima quente do nordeste da China e cultivada em diversos países (L'Hocine & Boye, 2007). Possui grande importância ambiental uma vez que fixa nitrogênio atmosférico através de bactérias *Rhizobium* que nodulam nas raízes, porém, esta planta exige a inoculação de sementes pelo menos por três anos consecutivos com a cepa específica da bactéria (Costa, 2003; Zarkadas e cols, 1999).

Esta leguminosa tem sido submetida a melhoramento genético tanto convencional como o molecular para torná-la mais produtiva, tolerante ao frio, resistente a ervas daninhas (Zarkadas e cols, 1999), ausente de inibidor de protease do tipo Kunitz, ausente nas 3 das principais proteínas alergênicas da soja (subunidades α e α' da β -conglucina e a *Gly m Bd 28 K*), hipoalergênica (que não contém as subunidades α e β da β -conglucina), entre outras (L'Hocine & Boye, 2007).

Desde sua primeira menção nas estatísticas brasileiras em 1941, a soja tem se destacado por fornecer diferentes produtos de grande importância no mercado internacional como o óleo, o farelo, a lecitina, além de outros metabólitos secundários como as saponinas e as isoflavonas. O Brasil é o segundo maior exportador de grãos de soja e o principal exportador de farelo de soja com 32% do mercado mundial, o que representa 7% da produção brasileira (Park, e cols., 2002), e ainda, o grão de soja é destinado também à extração de óleo vegetal, alimento amplamente consumido pela população brasileira. O complexo soja (grão, farelo e óleo) é responsável por 21% das exportações do agronegócio brasileiro, demonstrando a importância que a soja tem para a balança comercial do país (http://www.cib.org.br/pdf/artigo_anderson.pdf).

A torta (ou farelo) resultante desta extração é destinada ao uso em ração animal ou para a produção de derivados protéicos, cuja funcionalidade os torna ingredientes importantes de diversos produtos alimentícios. Este farelo representa aproximadamente 62% dos ingredientes protéicos utilizados nas dietas alimentares animais; uma vez que contém aminoácidos de disponibilidade relativa, se

comparado com outras fontes protéicas, porém de baixo custo (Grieshop & Fahey, 2001). Em 2001, o cultivo mundial de soja foi avaliado em \$ 12,3 bilhões de dólares, com cerca de 42% de plantio só nos EUA, seguido do Brasil com 24%, da Argentina (16%), China (8%) e Índia (3%). Os EUA é o líder em produção e exportação de soja, contribuindo com 16% de suprimento mundial, atrás da Argentina (35%) e Brasil (25%) (Karr-Lilienthal e cols., 2004).

Desde 1960, novos produtos a base de proteína de soja têm sido desenvolvidos como farinha de soja, flocos, concentrados e isolados protéicos. Devido às suas excelentes propriedades nutricionais e funcionais (absorve água e gordura, emulsificante, espumante, gelificante e ligante), estes produtos são cada vez mais incorporados como ingredientes em alimentos industrializados contendo carnes, provenientes de processos de panificação, lácteos, espalhadores e outros (Figura 6).

Características biológicas

Estrutura e composição dos Grãos

A soja é uma das sementes mais utilizadas na alimentação devido ao seu rico teor nutricional. A semente ou o grão compreendem três partes principais: a casca, os cotilédones e o hipocotilédone.

A composição química, em base seca, constitui-se de 30 a 42% de proteínas, 30% de carboidratos (sendo 12% não-estruturais), 18 a 20% de gorduras, minerais como ferro, cobre, cálcio, magnésio, zinco, cobalto, fósforo e potássio, vitaminas como tiamina, a riboflavina, além de ácidos graxos essenciais como o linoléico e o linolênico (Garcia e cols., 1997; Park e cols., 2002; Zarkadas e cols, 1999). A soja também é considerada uma excelente fonte de fibra dietética, principalmente a fibra insolúvel, a qual tem sido utilizada em dietas para minimizar os níveis de colesterol sérico em indivíduos hipercolesterolêmicos (Messina, 1999). A soja é utilizada na alimentação humana e animal em forma de grãos e outros produtos obtidos do seu processamento como concentrados, isolados e texturizados protéicos, óleo, lecitina, flocos desengordurados, farinha e outros (Horan, 1974).

Além do valor nutritivo, a soja apresenta concentração elevada de isoflavonas, substâncias com propriedades benéficas denominadas fitoestrógenas,

capazes de provocar uma resposta estrogênica em animais experimentais (Liener, 1994; Genovese & Lajolo, 2001), que promove prevenção e tratamento da osteoporose e câncer (Messina, 1999).

Apesar destes benefícios, há alguns problemas associados com o uso de produtos da leguminosa tanto processados como *in natura*, uma vez que contém uma grande quantidade de fatores antinutricionais como inibidores de proteases, taninos, fitatos, lectina, saponinas e as enzimas lipoxigenase e urease, que apesar da maior parte ser removida com algum tipo de processamento, mantêm-se nos grãos prejudicando a absorção de boa parte dos nutrientes. Estes compostos compreendem cerca de 8 a 11% da composição dos grãos e são influenciados entre outros por fatores ambientais, tipo de solo, forma e tempo de armazenamento das sementes após a colheita.

As propriedades e as características físico-químicas de significância nutricional desta leguminosa são condicionadas ao seu processamento, às interações entre seus componentes (Garcia e cols., 1997), além do seu genótipo e ambiente de cultivo (Cromwell e cols., 1999). A qualidade de produtos contendo soja pode ser reduzida por conter sementes que se deterioram durante o armazenamento em decorrência de reações enzimáticas e desenvolvimento de bolores (Mao e cols., 1993; Wettlaufer & Leopold, 1991).

Karr-Lilienthal e cols. (2004) comentam que se o farelo ou a torta de soja forem submetidos a más condições de processamento, altas concentrações de fatores antinutricionais como inibidores de tripsina e saponinas permanecem presentes e diminuem drasticamente a qualidade deste alimento, particularmente para não-ruminantes. Além disso, o processamento excessivo pode resultar na indisponibilidade de lisina, um aminoácido importante por sua essencialidade na alimentação de humanos e animais, devido à sua ligação com carboidratos na ocorrência da reação de Maillard.

Liener (1994) propõe que o perfil de aminoácidos de algumas proteínas pode determinar o seu valor nutricional, com exclusão à proteína de soja, a qual exige a aplicação de processamento térmico para esta determinação (Rackis, 1974), devido a presença destas substâncias antinutricionais que comprometem a biodisponibilidade de suas frações protéicas.

Figura 6: Alimentos e ingredientes a base de soja. Adaptado de L'Hocine & Boye (2007).

Fitatos

Os fitatos são compostos cíclicos que contém seis grupos de fosfato e estão presentes na soja em torno de 1 a 1,5% do seu peso seco. Eles são responsáveis pela diminuição da absorção de substâncias como cálcio, magnésio, zinco e ferro, pois agem como quelantes destes minerais (Rackis, 1974). Além dessa reação, podem interagir com resíduos de proteínas, inibindo a ação de enzimas importantes na digestão como pepsina, tripsina e alfa-amilase, o que conseqüentemente, diminui a disponibilidade de nitrogênio e altera o crescimento. São relativamente termoestáveis, podendo ser destruídos com aquecimento em altas temperaturas por 2 horas ou mais (Liener, 1994; Garcia e cols., 1997).

O IP6 é originado do *myo*-inositol, um carboidrato hexacarbônico considerado nutriente essencial e presente em vitaminas do complexo B, e é formado quando os seis carbonos estão agregados a grupos fosfato (Vucenik & Shamsuddin, 2006). Os bi- e trifosfato inositol (IP2 e IP3), além dos IP4, IP5 e IP6 são moléculas versáteis com importantes papéis na regulação de diversas atividades celulares como o processo de sinalização celular que ocorre em todos os tecidos animais e vegetais (Stephens e cols, 1993).

Isoflavonas

Plantas superiores usam a via de síntese dos aminoácidos aromáticos também para produzir uma extensa quantidade de metabólitos secundários aromáticos ou derivados fenólicos que podem ser flavonóides, estilbenos, suberina/cutina, taninos, ligninas, lignanas. Possuem funções variadas como antibióticos, pesticidas naturais, sinalizadores para simbiose, atrativos para polinizadores, protetores contra raios ultravioletas (UV), toxinas contra animais, componentes de paredes celulares, formação de camadas impermeáveis e outras (Heldt, 1997, Croteau e cols. *In* Buchanan e cols., 2000).

Embora a maior parte dos fenólicos resulte do metabolismo dos fenilpropanóides, ou seja, dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, formados pela via ácido chiquímico, outros são gerados por vias alternativas como os taninos (Figuras 7 e 8) (Heldt, 1997; Croteau e cols. *In* Buchanan e cols.,

2000). Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem se divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais (Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

Figura 7: Esquema do metabolismo dos fenilpropanóides (Heldt, 1997).

Os flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como C₆-C₃-C₆ compreendem flavonas, isoflavonas e antocianidinas. Funcionam como antibióticos, sinalizadores para interação com simbioses, pigmentos e protetores contra a luz (Heldt, 1997; Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

Os não flavonóides, responsáveis pelo sabor e cor da soja, são classificados como:

- os derivados das estruturas químicas C₆-C₁ específicas dos ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico;
- os derivados das estruturas químicas C₆-C₃ específicas dos ácidos caféico e *p*-cumárico hidroxicinamatos;

- os derivados das estruturas químicas C₆-C₃- C₆ específicas do trans resveratrol, cis-resveratrol e trans resveratrol-glucosídeo (Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

Figura 8. Mecanismo de síntese de metabólitos secundários a partir de aminoácidos aromáticos (Croteau e cols. *In* Buchanan e cols., 2000).

A distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com a fila/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioleta B, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz (Degáspari & Waszczynskyj, 2004; Bennet e cols., 2004). Consequentemente, plantas cultivadas em estufas, onde os raios ultravioleta são bloqueados o conteúdo de flavonóides é reduzido. Vegetais que crescem na Espanha ou na África do Sul são apontados como contendo de 4 a 5 vezes mais flavonóides que os que crescem no Reino Unido (Buchanan e cols., 2000; Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

As isoflavonas são os maiores componentes fenólicos em soja, sendo encontradas em concentrações variáveis de acordo com fatores genéticos, locais de plantio e condições climáticas (Genovese & Lajolo, 2001; Park, e

cols., 2002; Bennet e cols., 2004). O grão de soja contém basicamente três tipos de isoflavonas que se apresentam normalmente em quatro diferentes formas: glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina); acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina); malonilglicosiladas (malonildaizina, malonilgenistina e malonilglicitina) e na estrutura não conjugada aglicona (daidzeína, genisteína e gliciteína) (Figura 9) (Park, e cols., 2002; Kao e cols., 2007; Carrão-Panizzi e cols., 1998).

Figura 9. Estrutura química das isoflavonas da soja (Genovese & Lajolo, 2001)

Estão presentes no vegetal primariamente como glicosídeos (7-O-β-glicosídeos): malonilglicosídeos e glicosídeos desesterificados (daidzina, genistina e glicitina), sendo que acetilglicosídeos e agliconas podem ser formados durante o processamento (Liener, 1994; Carrão-Panizzi e cols., 1998; Park e cols., 2002). Kao e cols.(2007) observaram um aumento de 50% do conteúdo de acetilglicosídeos e agliconas após o aquecimento de farinha de soja a 200°C por 10 minutos. No entanto, em um período de 30 minutos os acetilglicosídeos foram totalmente suprimidos e as agliconas triplicaram, sugerindo que os acetilglicosídeos quando submetidos a altas temperaturas se convertem às suas respectivas formas agliconas.

Características das proteínas presentes na soja

Em certos estágios de desenvolvimento, as leguminosas sintetizam grande quantidade de proteínas em tecidos específicos, dependendo da nutrição da planta e do grau de nitrogênio obtido do solo. Esta síntese resulta na formação de grupos de proteínas de reserva conhecidamente pobres em aminoácidos sulfurados que agem como compostos de reserva de nitrogênio e carbono para as sementes (Sathe e cols., 2005). Estas proteínas de reserva estão presentes na semente madura em discretos depósitos chamados corpos protéicos, apresentando uma mistura de componentes que exibem polimorfismos de genótipos únicos ou entre vários da mesma espécie. Este polimorfismo surge de famílias multigênicas e, em alguns casos, processamento proteolítico e glicosilações pós-tradução (Shewry e cols, 1995; Müntz, 1998).

As proteínas de reserva são classificadas de acordo com sua forma de extração e solubilidade em água (albuminas), em soluções salinas (globulinas), misturas entre água e álcool (prolaminas) em soluções alcalinas ou ácidas (glutelinas) (Shewry e cols, 1995; Yamauchi e cols, 1991).

No perfil protéico da soja encontram-se aproximadamente 70-90% de globulinas e o restante em albuminas (Burks e cols., 1988; Iwabuchi & Yamauchi, 1987^A; Iwabuchi & Yamauchi, 1987^B; Zarkadas e cols, 1999; Mills e cols., 2004). As primeiras são largamente distribuídas e estão presentes não só nas dicotiledôneas, mas também nas monocotiledôneas (incluindo cereais e palmáceas). Possuem grande importância nutricional apesar de serem deficientes em cisteína e metionina (Shewry e cols, 1995, Thanh & Shibasaki, 1976).

As proteínas da soja compreendem uma gama de cadeias polipeptídicas com tamanhos moleculares diferentes que foram inicialmente classificados em função dos perfis de sedimentação quando submetidas à ultracentrifugação. Foram designados 7S e 11S (Shewry e cols, 1995), além de outros como 2S e 15S, (Yamauchi e cols, 1991) com características diferentes entre eles (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Proporções e características das frações protéicas hidrossolúveis dos grãos de soja

Frações	2S	7S	11S	15S
Proporção (%)	~15	~35	~40	~10
Componentes protéicos	Enzimas Inibidores de proteases Albuminas	Citocromo C B-amilase Lipoxigenases Hemaglutininas Globulina 7S (B- conglucina)	Globulina 11S (glicina)	Dímeros de glicina
Massas molares (Da)	7860 - 21500	12000 6200 102000 110000 140000 - 175000	320000 - 350000	600000

Fonte: Cheffert e cols (1989), Hou & Chang (2004)

Segundo os autores, a globulina da soja é um termo geral para as proteínas de reserva ou aquelas precipitadas sob condições ácidas (Yamauchi e cols, 1991), embora contenham grandes quantidades de outras substâncias contaminantes não-protéicas (Iwabauchi & Yamauchi, 1987^B). Porém, Thanh & Shibasaki (1976), após ensaios de solubilidade com proteínas de soja, concluíram que o melhor pH para separação das globulinas 11S e 7S das demais proteínas presentes é o de 6,4 e 4,8 considerando-se que a amostra tenha sido preparada em tampão TrisHCl 0,03 M, o que garante uma força iônica de 0,5, característica garantida pela interação dos íons do tampão Tris com as proteínas.

O fracionamento das proteínas das sementes em seus diferentes níveis de solubilidade é o método mais usado na preparação de globulinas puras para a análise de sua caracterização.

Tabela 3: Composição de coeficientes de sedimentação de extrato bruto protéico de soja após ultracentrifugação (%)

Frações isoladas	Fração total de proteínas (%)	Composição ultracentrifugacional (%)			
		2S	7S	11S	15S
Extrato bruto protéico	100	16	52	31	1
Globulinas 11S (pH 6,4)	36	9	10	78	3
Globulinas 7S (pH 4,8)	44	14	86	-	-
Irreversivelmente Insolúveis	6	-	-	-	-
Proteínas do soro	14	-	-	-	-

Fonte: Thanh & Shibasaki (1976)

As globulinas 11S consistem em duas cadeias polipeptídicas ligadas por pelo menos uma ponte dissulfeto entre resíduos de cisteína (Cys) em posições altamente conservadas na grande cadeia ácida (aproximadamente 40 KDa) e na pequena cadeia básica (aproximadamente 20 KDa) (Müntz, 1998), ou seja, 6 domínios ou pares de subunidades que interagem não-covalentemente entre si formando um hexâmero. Cada par consiste em uma subunidade ácida com aproximadamente PM ~12/32 – 45 KDa e uma subunidade básica de aproximadamente PM ~ 20 – 22,5 KDa. O ponto isoelétrico das subunidades é bem distinto: ~5,2 das ácidas para ~8,2 das básicas (Hou & Chang, 2004; Yamauchi e cols, 1991, Müntz, 1998; Adachi e cols., 2001).

Os polipeptídeos são ligados covalentemente por pontes de dissulfeto e possuem cerca de 80% de similaridade estrutural de cadeia entre eles, contendo aproximadamente 25% de ligações α -hélix e folha β , 42% de ligações alças β e 8% espirais ao acaso (Figura 9).

Figura 10 Estrutura da pró-glicinina mostrando os laços internos desordenados. As cisteínas estão representadas pelos números. A ponte $\text{Cis}_{88}\text{-Cis}_{298}$ conecta as cadeias ácida e básica no fundo. Após a clivagem do laço dos resíduos 249 e 296, a superfície mais baixa provavelmente interage com outro trímero com resíduos 249 e 291. As fitas mais claras representam a ligação dupla-hélice da proglicinina (e glicinina) a qual é provável também manter ligações de hidrogênio. As fitas escuras representam as ligações folhas e α -hélix, as quais podem possivelmente alterar a conformação sem desdobrar a “dupla hélice” (Mills e cols., 2003).

Ambas as cadeias são geradas de um precursor comum após a tradução no retículo endoplasmático formando trímeros conhecidos como pró-glicinina (Adachi e cols., 2001; Yamauchi e cols, 1991, Müntz, 1998) e então transportadas para o vacúolo para que a proteólise ocorra e libere os polipeptídeos ácidos e básicos que se juntarão para formar o hexâmero.

A conformação cristalizada da pró-glicinina trimérica revela uma estrutura similar à globulina 7S (Mills e cols., 2004). Cada glicinina contém pelo menos duas pontes dissulfeto altamente conservadas que contribuem para a estabilidade estrutural e dobramento da proteína (Mills e cols., 2004; Adachi e cols, 2001). Sua cristalografia demonstra subunidades arrumadas em uma estrutura de anel aberto, orientada alternativamente para cima e para baixo, num disco cujo diâmetro é de 145 Å e espessura ~90 Å (Shewry e cols, 1995). A glicinina é a proteína típica de reserva de maior abundância neste coeficiente de sedimentação sendo responsável por 40% do total de proteínas da semente (Adachi e cols., 2001).

As globulinas 7S são complexos de proteínas que incluem α -conglucina, a β -conglucina e a γ -conglucina (Lee e cols, 2007^B). As β -conglucinas são tipicamente triméricas de PM ~150 a 190 KDa, podendo chegar a 210 KDa. São compostas por grupos de subunidades polimórficas derivadas de famílias multigênicas que geram proteínas de composição consideravelmente variável, devido, principalmente, às diferenças ocorridas no processo pós-translacional, momento onde ocorre a glicosilação da proteína. São conhecidamente carentes em cisteína e impossibilitadas de formar ligações dissulfídicas (Shewry e cols, 1995; Müntz, 1998, Yamauchi e cols, 1991; Zarkadas e cols, 1999). Thanh & Shibasaki (1979) afirmam que a proteína, apesar de ser trimérica, pode sofrer agregação reversível para um hexâmero, dependendo da força iônica a que for submetida. A β -conglucina é proteína típica de reserva de maior abundância neste coeficiente de sedimentação que contém moléculas de glicose agregadas em quantidades próximas a 5% além de uma molécula de asparagina agregada a cada subunidade. Possui três subunidades: α' (57 – 72 KDa), α (57 – 68 KDa) e β (42 – 52 KDa), cujos pontos isoelétricos são 4,9 a 5,2 para as duas primeiras e 5,7 a 6 para a segunda (Yamauchi e cols, 1991; Thanh & Shibasaki, 1979). Em

pH neutro, as moléculas de β -conglucina são negativamente carregadas, apresentando-se como hidrofílicas *in natura* (Yamauchi e cols. 1991).

As estruturas tridimensionais de várias globulinas 7S foram determinadas com uso de cristalografia por raios-X e demonstraram uma proteína trimérica em forma de disco com diâmetro de ~ 90 Å e espessura ~ 30 a 40 Å (Shewry e cols, 1995) (Figura 10).

Após a ultracentrifugação, aparece também o coeficiente de sedimentação 2S, ou α -conglucina, formado por um grupo heterogêneo de proteínas, algumas homólogas às albuminas. Representam o maior grupo de proteínas de reserva presentes nas espécies vegetais dicotiledôneas e possuem uma característica especial no âmbito nutricional de serem geralmente ricas em metionina, pois várias destas proteínas exibem seqüências similares às prolaminas dos cereais (Müntz, 1998; Yamauchi e cols.1991).

Figura 11: Estrutura do homotrímero na forma nativa da beta- conglucina. Os três monômeros são mostrados nas cores azul, verde e rosa. A glicosilação é mostrada em amarelo. Fonte: Maruyama e cols., 2001.

Todas as proteínas de reserva de sementes são sintetizadas com um sinal péptico de clivagem das mesmas quando atingem o lúmen do retículo endoplasmático do vegetal, onde, então, assumem sua conformação estrutural, por meio da formação de pontes dissulfeto (Sherry e cols, 1995; Adachi e cols., 2001). Porém, isto pode ocorrer tanto com proteínas individuais quanto agregados como a 7S e 11S que se unem neste tecido. Estes complexos protéicos são transportados via aparato de Golgi ao vacúolo, onde formarão os corpos protéicos e se manterão protegidos contra quebra por proteases citoplasmáticas (Sherry e cols, 1995; Müntz, 1998). No caso da globulina 11S,

as proteínas monoméricas se agregam inicialmente no retículo endoplasmático em trímeros (pró-glicinina) para serem transportados para o vacúolo, onde são unidas em sua forma final de hexâmero (Sherry e cols, 1995; Adachi e cols., 2001).

As glicinina + β -conglucina compõem 55% do total de proteínas da semente, enquanto que 32% são outras globulinas, que quando concentradas e analisadas se apresentam nas frações de lipoxigenase, β -amilase, inibidores de tripsina (Iwabuchi & Yamauchi, 1987^B) e os 13% restantes são proteínas do soro (albuminas) em adição a substâncias como hemaglutininas e urease (Burks e cols, 1988).

Solubilidade das proteínas

Com relação à solubilidade das proteínas de soja, cerca de 85% é solúvel em pH 2 a 7; em pH 11 pode se solubilizar em até 95%. Um perfil de solubilidade parecido pode ser observado com a farinha de soja desengordurada, preparada em condições suaves de processamento como trituração sem calor excessivo e desengordurada por hexano (Cheftel e cols, 1989).

As globulinas são solúveis em uma faixa de pH (3,7 a 5,2) situada em torno de seu ponto isoelétrico (pH 4,2 a 4,6), mas podem se solubilizar progressivamente a esses mesmos pHs por aumento da força iônica (com NaCl, por exemplo). A um valor de pH 7, as proteínas da soja se expandem entre as forças iônicas 0 e 0,1 e se tornam ainda mais solúveis (Cheftel e cols, 1989). Thanh & Shibasaki (1976) realizaram ensaios com várias concentrações de proteína, diferentes valores de pH e força iônica e concluíram que as globulinas 7S precipitaram em valores de pH entre 4 e 5,6 enquanto que as 11S entre 4,4 e 6,8; apresentando melhor solubilidade em tampão Tris 0,03 a 0,06 diferentemente das 11S (0,1 a 0,2 M). Além disso, comentam que a adição de NaCl à solução de globulinas 11S resultou num aumento drástico da sua solubilidade.

Porém, Müntz (1998) comenta que produtos de dissociação (monômeros) das frações 11 e 7S gerados em altas concentrações de sais podem ocupar a posição das 2S.

2. Justificativa

A modificação da composição nutricional dos alimentos vegetais é uma questão urgente e básica para a maior parte da população que sofre com carências nutricionais ou patologias específicas, que estão direta ou indiretamente interligadas. Um vasto número de pessoas em países em desenvolvimento vive com dietas simples compostas por alimentos básicos como mandioca, trigo, arroz e milho, que são pobres fontes de alguns macro e micronutrientes essenciais (DellaPenna, 1999).

O genoma nutricional é uma abordagem geral para a descoberta de genes que são aplicáveis para compostos de importância nutricional, sintetizados ou acumulados por plantas e outros organismos. A identificação de genes que aumentem os níveis de micronutrientes essenciais e componentes fitoquímicos específicos em alimentos básicos é um objetivo imediato para a melhoria da alimentação humana mundial (DellaPenna, 1999).

No entanto, o desenvolvimento de novos alimentos, como os alimentos geneticamente modificados, suscitou dúvidas quanto à sua segurança causando uma grande busca por métodos seguros para acessar o seu potencial de toxicidade e/ou alergenicidade (Sinagawa-Garcia e cols., 2004).

As alergias alimentares atingem cerca de 6 % das crianças e 4% dos adultos da população mundial, e, em alguns casos, podem levar a choques anafiláticos (Young e cols., 1994). Embora os sintomas clínicos da alergia à soja não sejam tão severos quanto os de outros alimentos, eles estão presentes e em alta prevalência, uma vez que está incluso no grupo de 9 alimentos responsáveis por 90% de todos os casos de incidência alérgica do mundo (amendoim, soja, nozes, leite, ovos, peixe, crustáceos, moluscos e trigo) (Metcalf e cols., 1996).

Vale a pena ressaltar que a soja é amplamente utilizada em alimentos processados devido a presença de compostos de grande importância nutricional e funcional, além de ser fonte de ingrediente funcional. E, muitas vezes, a sua presença não está anunciada em rótulos, o que dificulta a identificação por parte das pessoas que desenvolvem esta patologia.

Sob outro aspecto, deve-se considerar que mais de 37% da leguminosa convencional produzida no país é utilizada no mercado interno e o restante é

exportado (Vencato e cols., 2005) tornando-se o segundo maior exportador de grãos de soja e o principal exportador de farelo de soja, com 22% do mercado mundial (Martin e cols., 2008). A soja GM tolerante ao herbicida glifosato produzida no país, variedade transgênica liberada no Brasil, por sua vez, atingiu 11 milhões de hectares em 2006/2007, ou seja, 5% da área global de cultivo (<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias2005>).

3. Objetivo

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a inocuidade alimentar de três cultivares de soja que foram geneticamente modificadas para tolerarem o herbicida glifosato, através da determinação da equivalência substancial e do potencial alergênico das mesmas quando comparadas às suas respectivas parentais isogênicas.

Objetivos Específicos

1) Determinar a equivalência substancial das amostras.

- Realizar análises da composição química dos grãos.
- Realizar análises de outros compostos do metabolismo secundário como fitatos e isoflavonas.

2) Avaliar o potencial alergênico das amostras geneticamente modificadas e compará-lo com suas respectivas parentais isogênicas.

- Extrair complexos protéicos brutos e aqueles potencialmente alergênicos como as globulinas 7S e 11S das 6 variedades de soja.
- Caracterizar os extratos protéicos bruto e potencialmente alergênicos por meio de eletroforeses uni e bidimensional.
- Analisar a resistência ao aquecimento e à hidrólise enzimática destes extratos protéicos através de ensaios de digestão *in vitro*.
- Detectar o potencial alergênico dos extratos protéicos por meio de ensaios imunoquímicos com soro de pacientes comprovadamente alérgicos à leguminosa.

4. Materiais e métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Soja

A linhagem E96-246, portadora do gene que confere tolerância ao herbicida glifosato, foi fornecida pela Monsanto do Brasil, detentora do processo de obtenção da soja tolerante ao herbicida glifosato, à EMBRAPA para desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições locais. A variedade selecionada do cruzamento BR 16(4) x GTS (E96-246) deu origem às demais cultivares adaptadas.

As amostras de soja foram obtidas por cruzamento clássico pela EMBRAPA – PR, posteriormente cultivadas em cidades diferentes do Estado de Goiás e fornecidas pelo Centro Tecnológico de Pesquisas Agropecuárias - CTPA (GO) em lotes de grãos convencionais e geneticamente modificados com o gene *cp4*. As amostras foram certificadas na origem e transportadas de acordo com as normas da legislação vigente. As cultivares parentais e GM são denominadas BRSGO Jataí/ GM BRS Silvânia RR, BR/MG 46 Conquista/ GM BRS Valiosa RR e BRS Celeste/GM BRS Baliza RR, todas referentes ao cultivo da safra de 2004-2005.

A Tabela 4 dispõe de forma resumida as características agrônômicas das cultivares de soja destinadas a cultivo nas regiões compreendidas pelo cerrado brasileiro, que foram empregadas no presente trabalho.

A manipulação da amostra GM foi realizada conforme as recomendações da CTNBio, em observância especial da Instrução Normativa nº7.

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou para cromatografia líquida.

4.1.3 – Soros de pacientes

Para a avaliação da reatividade de anticorpos IgE às frações protéicas EB, 11S e 7S de todas as cultivares de sojas parentais isogênicas e GMs, foram utilizados soros de pacientes alérgicos à soja e controles (Tabela 5) selecionados no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas de São Paulo.

Tabela 4: Dados de origem das cultivares de soja utilizadas neste trabalho.

Cultivares	Jataí	Silvânia RR	MG/46 - Conquista	Valiosa RR	Celeste	Baliza RR
Linhagem	BR92-31910	BR 00-69526	nd	BR00-69515	BR91-4549	BR00-69522
Local de cultivo para testes	6 locais em GO e DF	10 locais GO e DF	nd	6 locais em MG, MT, RO, GO e DF	7 locais em MT, GO, MG, BA e DF	8 locais em GO e DF
Cruzamento de origem	BR83-9520 (3) x FT-Estrela	BRSGO Jataí*6 X E 96-246	nd	5 retrocruzamentos para MG/46 Conquista	hibridação entre Bossier e BR-1T	BRS Celeste*4[MS/BR 39RCH X (E 96-246 X Uirapuru)]
Ano de origem	1999	2001	nd	2001	1993	2001
Resistência	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana Nematóide de galha	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana Necrose da haste Nematóide de galha Vírus mosaico	Cancro da haste Oídio Pústula bacteriana	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana
Região indicada	GO e DF	GO, MG e DF	MT e MG	GO, DF	cerrado	BA, GO, DF
Codificação empregada	1.0	1.1	2.0	2.1	3.0	3.1

nd – dados não disponíveis

Fonte: www.embrapa.gov.br**Tabela 5.** Tabela de dados clínicos dos pacientes.

Pacientes	Idade (anos)	Dados clínicos	RAST (Imunocap)	Prick Test	Conc. Sérica de IgE total UI
Paciente 1 L.C.B.J.	6	Alergia ao leite de vaca e à soja	Classe 3 ao leite de vaca e soja	-	> 5000
Paciente 2 J.C.M.	45	Alergia à soja, mofo, frutos do mar, camarão	-	-	-
Paciente 3 W.M.G.	7	Dermatite atópica Alergia ao leite de vaca e à soja	Classe 5 leite de vaca e soja	-	-
Controle 1 A.P.B.M.C.	35	Rinite	-	Negativo para soja Positivo para ácaros	-
Controle 2 L.W.	30	Não alérgico	-	Negativo para aeroalérgenos e soja	-

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das amostras de soja

Foram trituradas com casca em moinho de facas, moídas em moinho M 20 IKa Labortechnik (Alemanha) e armazenadas em temperatura de -18°C para análises posteriores.

4.2.2 Composição química

As análises de composição dos grãos compreendem quantificações de compostos como proteínas, lipídeos, umidade, resíduo mineral fixo e carboidratos, fibras, perfil de aminoácidos e ácidos graxos, cujos métodos serão brevemente descritos e referenciados abaixo.

Umidade: determinação por método gravimétrico utilizando estufa a 105°C (AOAC, 1995).

Resíduo mineral fixo: foram determinadas pelo método gravimétrico utilizando mufla a 550°C AOAC (1995).

Lipídeos: as amostras foram desengorduradas pelo método de Soxhlet (Association of Official Analytical Chemistry - AOAC, 1995) em um período de 12 horas, com éter etílico.

Proteínas: foram determinadas pelo método micro-Kjeldhal (AOAC, 1995), utilizando fator de conversão 5,7.

Carboidratos: foram estimados usando a equação com dados em matéria seca descontados os teores de proteínas, lipídeos e resíduo mineral fixo.

Fibras: determinação do conteúdo de fibras solúveis e insolúveis totais pelo método enzimico-gravimétrico (Bennink, 1994; Filisette-Cozzi & Lajolo, 1991; Prosky e cols., 1992; Prosky e cols., 1988). A soma das mesmas é o resultado do conteúdo de fibras totais.

4.2.3 Perfil de aminoácidos

As amostras foram desengorduradas, pelo método de Soxhlet, e enviados ao laboratório de bioquímica do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL (Campinas), onde foram submetidas à hidrólise ácida e os aminoácidos quantificados por reação pós coluna com ninhidrina. Os aminoácidos cistina e metionina foram oxidados e

determinados como ácido cistéico e metionina sulfona, e o triptofano por reação com p-dimetileno benzaldeído (Spies, 1967).

4.2.4 Perfil de ácidos graxos:

As frações lipídicas foram extraídas por hidrólise ácida com ácido clorídrico 8,3 M e a extração ocorreu na presença de ácido pirogálico e ácido graxo utilizado como padrão interno (C17- methyl heptadecanoate). Posteriormente foram metiladas com uso de fluoreto de boro 7% em metanol (AOAC, 2002). Os ácidos graxos metilados foram analisados por cromatografia gás-líquida GC 17 A Shimadzu/ Class GC 10 em coluna cromatográfica de sílica fundida Supelcowax 10 (polietilenoglicol) de 30 m e 0.25 mm. de d.i. e 0,25 microns de espessura de filme da fase estacionária. As condições de programação de temperatura, detecção e quantificação dos resultados seguiram metodologia padronizada (Moreira e cols., 2001).

4.2.5 Determinação de Ácido fítico

O ácido fítico foi extraído em HCl (2,4%) a partir de 1g da amostra. Após agitação por 3 horas a 20°C, a solução foi centrifugada a 16000rpm por 30min a 4°C e o sobrenadante foi congelado durante a noite para posterior centrifugação. O extrato resultante foi diluído para solução com 50mL, completando o volume com água desmineralizada e em seguida foi submetido a coluna cromatográfica com resina de troca iônica AG 1x4, 100-200 mesh (Biorad). Os fosfatos de inositol totais foram eluídos com 25mL de HCl 2N e congelados a -18°C. Posteriormente, o extrato foi evaporado a vácuo (50°C) com auxílio de ultra-som. Foram separadas as diferentes frações por meio de diluições seriadas seguidas de evaporações. Na quarta evaporação, o fosfato de inositol foi seco e em seguida diluído em água desmineralizada para a posterior injeção em cromatógrafo de alta eficiência com coluna ULTRASEP ES 100 RO18 (2x250mm) de acordo com o método de Sandberg (1986), utilizando-se padrões ácido fítico (Fluka) e Na-fitato 1mM (Aldrich). Os fatores utilizados para cálculo de concentração foram 1,1 (IP5), 1,5 (IP4), 2,4 (IP3).

4.2.6 Determinação do conteúdo de Isoflavonas

As amostras de soja em grão foram moídas em moinho Janke & Kunkel A-10 (Ika & Works, Inc., Wilmington, E.U.A.) e passadas em peneira 60 mesh (0,25 mm)

previamente à extração. A extração das isoflavonas foi realizada com agitador mecânico e barra magnética por 2 horas a 4 °C, na proporção de 1:20 (m/v), com metanol 80% [Genovese e Lajolo, 2001]. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e submetidos à rotaevaporação (Rotavapor® RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça) até atingir o volume de 2 mL. A seguir completou-se o volume para 5 mL em balão volumétrico com metanol (grau HPLC). As amostras foram filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,45 µm de poro para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE. As extrações foram realizadas em triplicata.

Cromatografia líquida de alta eficiência: A separação das isoflavonas foi realizada em coluna C 18 µBondapak (Waters, Milford, E.U.A.) de acordo com o método de SONG e cols. [1998]. O cromatógrafo líquido utilizado foi o da Hewlett Packard (Palo Alto, E.U.A.) série 1100, equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detetor com arranjo de diodos, controlados pelo software ChemStation. Os padrões das doze isoflavonas (agliconas e conjugados) foram obtidos da LC Laboratories (Woburn, E.U.A.). A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção e dos espectros. As amostras foram injetadas em duplicata. Os resultados foram expressos na forma de média ± desvio-padrão, como mg de isoflavonas (agliconas) por 100 g de amostra (b.s.). As formas das isoflavonas (β-glicosídeos, malonilglicosídeos, acetilglicosídeos e agliconas) foram expressas em % do total.

4.2.7 Extração e Separação das Globulinas

Obtenção do extrato bruto protéico das cultivares de soja isogênica (1.0; 2.0 e 3.0) e GM (1.1; 2.1 e 3.1)

Para a obtenção do extrato bruto, a farinha de soja desengordurada foi submetida a agitação em água (1:10 p/v) por 1 hora em temperatura ambiente e centrifugada a 10000rpm/ 25°C/ 30 minutos. O sobrenadante foi dessalinizado em membrana de celulose regenerada (AMICON ULTRA ®) com capacidade de retenção de moléculas acima de 5 KDa, em centrífuga (5570rpm/ 25°C/ 15 minutos) contra água destilada por 6 vezes.

Obtenção do extrato bruto protéico rico em glicinina e em β -conglícinina das cultivares. Adaptado de Hou & Chang, 2004.

A farinha de soja desengordurada foi submetida à agitação por 1 hora em água (1:10 p/v pH 7,8) em temperatura ambiente. O sobrenadante do extrato centrifugado foi fracionado em globulinas por precipitação em pH 6,5, e mantido em agitação durante a noite em 4 °C para posterior centrifugação. O precipitado rico em glicinina foi lavado com água destilada e liofilizado para uso posterior. Para obtenção da fração 7S, o sobrenadante obtido da segunda centrifugação teve seu pH ajustado para 5,5 e então centrifugado novamente a 12000 g por 20 minutos (4 °C). O pH do sobrenadante foi novamente ajustado para 4,8 e recentrifugado. O precipitado rico em β -conglícinina foi lavado com água destilada e liofilizado para uso posterior (Figura 11).

Figura 12: Esquema de extração dos extratos protéicos ricos em 11S (glicinina) e 7S (β -conglícinina).

Purificação dos extratos protéicos (EP) ricos em glicinina e β -conglucina das cultivares

Os extratos protéicos ricos em glicinina foram ressolubilizados em tampão 20 mM Tris-HCl + 0,5 M NaCl, pH 7,5 e recentrifugados para separar frações indissolúveis. Foram aplicados individualmente em coluna de sepharose 4B ConA (concanavalina A) de acordo com o método de Hou & Chang, 2004 (adaptado). A coluna foi empacotada com tampão 1 M NaCl, 1mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 e 1 mM MgCl_2 , pH 6 e, então, equilibrada com 20 mM Tris-HCl + 0,5 M NaCl, pH 7,5. A eluição foi realizada com a solução 0,2 M α -D-mannopyranoside para que a proteína de interesse, como é o caso da β -conglucina, fosse extraída da matriz. Frações de 2,5 ml foram coletadas e lidas em espectrofotômetro sob absorvância de 280 nm.

As etapas de fracionamento das proteínas foram acompanhadas por eletroforese dissociante (SDS-PAGE) em gel de 12% de acrilamida, segundo Laemmli (1970), em meio redutor contendo β -mercaptoetanol. A revelação das bandas protéicas foi realizada com nitrato de prata.

4.2.8 Ensaios de hidrólise enzimática *in vitro* das frações protéicas

Extratos protéicos bruto das 6 cultivares de soja, não processados e não aquecidos, foram submetidos a digestão com pepsina em fluido gástrico simulado (FGS) na concentração de 13:1 (enzima:substrato) (Thomas e cols, 2004) e também na concentração 2,5:100.

Fluido Gástrico Simulado (FGS)

O FGS foi preparado de acordo com o descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) e consistiu em dissolver 0,032g de pepsina em 10 ml de solução 0,03M NaCl pH 1,2 (FAO/WHO, 2001).

Incubação em FGS para ensaio 2,5 : 100

O FGS (54 μ l) foi diluído em 346 μ l de solução NaCl 0,03 M pH1,2 e então aquecido em temperatura de 37 °C por 10 minutos. Esta solução foi acrescentada à 1 ml de amostra (6 mg/ml) de soja, totalizando uma concentração de 2,5:100 (e:s) e mantida por 210 minutos na mesma temperatura. Alíquotas de 200 μ l foram retiradas nos tempos 0, 0,5, 2, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos. A reação foi

interrompida com 70 µl de solução 0,2 M Na₂CO₃ pH 9,5 e 70 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE (Laemmli, 1970) seguido de fervura por 5 minutos.

Incubação em FGS para ensaio 13 : 1

O FGS (1ml) foi diluído em 550µl de solução NaCL 0,03 M pH1,2 e então aquecido em temperatura de 37 °C por 10 minutos. Esta solução foi acrescentada à 50 µl de amostra (6 mg/ml) de soja, totalizando uma concentração de 13:1 (e:s) e mantida por 60 minutos na mesma temperatura. Alíquotas de 200 µl foram retiradas nos tempos 0, 0,5, 2, 5, 15, 30 e 60 minutos. A reação foi interrompida com 70 µl de solução 0,2 M Na₂CO₃ pH 9,5 e 70 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE (Laemmli, 1971) seguido de fervura por 5 minutos.

4.2.9 Quantificação de Proteínas

Para a quantificação de proteínas foram utilizados os métodos de Bradford (1976), no qual a proteína solúvel se liga ao reagente por meio de ligações hidrofóbicas formando uma coloração azul visível à luz em espectrofotômetro em $\lambda = 595\text{nm}$; e Smith (1985), o qual faz uso do reagente ácido bicinconínico que, em ensaio a quente (60° C por 15 minutos) se liga ao complexo Cu¹⁺ em meio alcalino, o qual foi reduzido de Cu²⁺ para Cu¹⁺ por alguns aminoácidos, liberando uma cor púrpura lida em luz visível no espectrofotômetro em $\lambda = 562\text{ nm}$. Para ambos, foi elaborada uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 1 mg/ml a cada ensaio.

4.2.10 Eletroforeses

Unidimensional

A visualização de bandas protéicas foi feita a partir de eletroforese unidimensional descontínua em gel de poliacrilamida (10 a 15%) na presença de sódio dodecil sulfato (SDS – PAGE) (Laemmli, 1970).

Bidimensional

O mapeamento protéico das glicinina e *beta*-conglucina purificadas de todas as amostras foi feito por eletroforese bidimensional com faixa de pH 3-10 e gel de

poliacrilamida (12%) na presença de sódio dodecil sulfato (SDS – PAGE) (Laemmli, 1970).

Revelação dos géis

A revelação dos géis foi realizada por reação com nitrato de prata (segundo protocolo interno do laboratório) e Coomassie brilliant blue (CBR-250) a 1%. Um padrão de peso molecular foi utilizado em cada corrida (10 a 220 KDa)

4.2.11 Testes de reatividade de anticorpos IgE presentes no soro de pacientes alérgicos à soja por métodos imunoquímicos

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Para a padronização da técnica para investigar a reatividade das sojas aos soros de pacientes alérgicos, foi realizada primeiramente uma titulação de anticorpos presentes nos soros utilizados.

Após a obtenção do valor da concentração de soro a ser utilizado nos ensaios (1/20), os testes de reatividade com os EBP de soja de todas as cultivares juntamente com as frações resultantes da hidrólise enzimática foram realizados utilizando a mesma metodologia descrita abaixo para padronização da técnica.

Ensaio para padronização da técnica

As placas de poliestireno de 96 poços da Nunc polisorp foram sensibilizadas com 100 µl de solução de anticorpo monoclonal anti-IgE humana (Abcam) dissolvido em tampão carbonato de sódio na concentração de 1:1000000 e mantidas overnight a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS+Tween 20 (0,05% v/v) e incubadas por 2 h a 37°C com 200 µl de solução de BSA 2,5% para bloqueio. Após a lavagem das placas, foram adicionadas 100 µl soluções de soros de pacientes alérgicos e não-alérgicos previamente dissolvidos em tampão PBS + Tween 20 diluídos em várias concentrações diferentes com diluições seriadas de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 e 1/640 com posterior incubação por 1 h a 37°C. Após serem lavadas 4 vezes, as placas foram incubadas novamente com 100 µl de solução de antígeno (EBP de todas as cultivares) marcado com biotina (éster n-hidroxisuccinimida do ácido biotinâmico- Sigma) na concentração de 5 µg ptn./poço. Após 4 lavagens, foi acrescentado 100 µl de solução contendo a proteína

estreptoavidina conjugada com HRP 1:30 (Abcam) para reconhecimento da biotina e incubada novamente por 30 minutos a 37°C. Após 4 lavagens, foi acrescentado 100 µl do substrato específico para peroxidase OPD (o-Phenylenediamine - Sigma) dissolvido em tampão 0,05M citrato pH 5,0 e utilizado juntamente com H₂O₂. A reação do cromógeno foi interrompida com 50 µl de solução 3M H₂SO₄ e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

Western Blotting

Frações de 2 extratos protéicos (extrato bruto protéico e *beta*-conglucina) de todas as cultivares de soja foram submetidas à eletroforese unidimensional descontínua em gel de poliacrilamida (12%) na presença de sódio dodecil sulfato (SDS – PAGE) (Laemmli, 1970), na quantidade de 30 µg de proteína por poço. Em seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride – Immobilon P - Millipore) de 0,45 µm em temperatura de 4°C por 90 minutos a 65 volts. Após a transferência a membrana foi mantida overnight a 4°C em solução de bloqueio (3% de BSA diluído em tampão PBSTween - 58 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄.H₂O, 68 mM NaCl e 0,2% Tween 20) conforme descrito por Batista e cols, (2005). Após o bloqueio a membrana foi incubada com o soro do paciente alérgico a soja diluído 1:10 em solução de bloqueio durante 1 hora e 30 minutos a 37°C com agitação suave. Em seguida a membrana foi lavada 3xs com PBST por 15 minutos cada e posteriormente incubada com anticorpo secundário anti-IgE humano monoclonal conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA) na diluição de 1:1000 em solução de bloqueio durante 1 hora em temperatura ambiente com agitação leve. Após três novas lavagens de 15 minutos cada com o tampão PBST, a membrana foi incubada durante 5 minutos em solução reveladora Immobilon® (Millipore) e os blots foram visualizados por uma reação de quimiluminescência após exposição (10 minutos) ao Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

4.2.12 - Credenciamentos

O laboratório de Biotecnologia de Alimentos da FCF-USP está credenciado e autorizado a desenvolver ensaios envolvendo OGM conforme certificado CQB 0090/98. Os ensaios relatados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Biossegurança da FCF-USP.

4.2.13 Análise Estatística dos dados

As variáveis foram analisadas por ANOVA univariada. Nos casos em que houve suposição significativa, os dados foram analisados através de testes não paramétricos de Fisher-LSD, seguindo comparação múltipla. Os valores foram expressos com média e desvio-padrão adotando-se um valor para α de 0,05.

5. Resultados e Discussão

5.1 Equivalência substancial das amostras

As possíveis consequências toxicológicas de alterações não intencionais em plantas GMs são inicialmente estudadas pela constatação da presença subjetiva de compostos individuais como proteínas, gorduras e metabólitos em geral nos alimentos por testes *in vitro* (EFSA, 2008). Quando ocorre a inserção de um gene em particular, os resultados da expressão de uma proteína nova, ou modificada, devem ser analisados e o foco de atenção não deve ser só direcionado para a mesma, como também para os níveis de metabólitos secundários da planta, alterados ou não intencionalmente. Esta suposição está baseada nas possíveis implicações da metodologia de biobalística empregada para inserir o gene *cp4 epsps*, cuja inserção se faz de modo aleatório dentro do genoma da planta.

O acesso a segurança de alimentos geneticamente modificados se baseia em uma análise comparativa entre os componentes nutricionais e anti-nutricionais presentes no vegetal isogênico e geneticamente modificado (Harrigan e cols., 2007), sendo que a análise da composição química (umidade, proteínas, gorduras, fibras, resíduo mineral fixo e carboidratos) é um procedimento padrão, recomendado para a primeira avaliação entre duas amostras (Taylor e cols., 1999), ou seja, uma ferramenta básica e inicial para o alcance da segurança do alimento em questão.

5.1.1 Análise da composição química dos grãos

O cultivo de variedades de soja iguais em locais diferentes pode causar grandes variações na composição e qualidade dos grãos. Nos EUA, variedades de soja cultivadas na região norte apresentam menores concentrações de proteínas e maiores de ácidos graxos que no sul. E ainda, diferenças nas condições de processamento causam uma diferença ainda maior no perfil nutricional do produto final (Karr-Lilienthal e cols., 2005).

As seis cultivares analisadas apresentaram os resultados expressos na Tabela 6. Vale destacar que os dados de composição química de sementes em geral, e da soja em particular, podem sofrer oscilações em função das características intrínsecas da variedade e do ambiente (Karr-Lilienthal e cols., 2004). No caso das amostras analisadas, as variáveis extrínsecas serão consideradas

irrelevantes para efeito de oscilações entre as cultivares pareadas, ou entre as seis cultivares, devido ao cultivo ter ocorrido na mesma safra e na mesma região geográfica.

Tabela 6. Dados de composição química das variedades parentais de soja: grãos convencionais e geneticamente modificados (%).

Frações (base seca)	1.0	1.1	2.0	2.1	3.0	3.1
Umidade inicial	7,60± 0,08 ^a	8,53 ± 0,24 ^b	7,98 ± 0,24 ^a	8,65 ± 0,28 ^b	7,71 ± 0,24 ^a	7,98± 0,52 ^a
Matéria seca	92,4	91,47	92,02	91,35	92,29	92,02
Proteínas	32,83±0,36 ^a	35,75±1,17 ^b	33,47± 0,55 ^a	36,49±0,81 ^{b,c}	31,89±1,77 ^a	37,82±0,33 ^c
Lipídeos	25,37±0,50 ^{a,b}	25,97±0,47 ^b	25,22±0,51 ^{a,b}	25,21±0,65 ^{a,b}	24,52±0,23 ^a	24,76±0,67 ^a
Resíduo mineral	4,85 ± 0,06 ^{a,b}	4,72 ± 0,12 ^a	5,11 ± 0,12 ^{b,c}	4,82 ± 0,02 ^{a,b}	5,48±0,14 ^{b,c}	4,92 ± 0,11 ^c
Carboidratos Totais*	29,35	25,03	28,22	24,83	30,40	24,52
Fibras Totais. ^d	30,20±0,50 ^{a,b}	29,60±1,50 ^a	33,08±2,37 ^b	30,57±1,55 ^{a,b}	31,86±1,15 ^{a,b}	29,39±3,06 ^a
solúvel	2,26 ± 0,55 ^a	3,61±0,87 ^{a,b}	4,06 ± 1,27 ^b	3,98 ± 0,21 ^b	2,48 ± 0,80 ^a	3,59±0,72 ^{a,b}
insolúvel	28,50± 0,99 ^a	26,89±0,44 ^b	30,03 ± 0,96 ^c	27,59± 1,31 ^{a,b}	30,00±0,66 ^c	26,69±1,28 ^b
Total	100	100	100	100	100	100

n=4 fibras solúveis e insolúveis; n=3 para as demais análises.

Letras iguais na mesma linha indicam amostras com conteúdos similares do nutriente (p < 0,05).

* Valores obtidos por cálculo para o total de 100 com proteínas, lipídeos e resíduo mineral fixo, em matéria seca.

^d Soma dos valores de fibras insolúveis e solúveis.

Umidade

A umidade presente nas seis cultivares analisadas variou entre 7,60 a 8,65 % (91,35 a 92,4% de matéria seca), sendo 7,60 a 7,98% (92,02 a 92,4% de matéria seca) entre as parentais isogênicas e 7,98 a 8,65% (91,35 a 92,02% de matéria seca) entre as GMs (Tabela 6). A umidade nas amostras das cultivares isogênicas (1.0; 2.0 e 3.0) demonstraram similaridade estatística também com a GM 3.1, enquanto que as outras GMs apresentaram valores estatisticamente superiores.

Proteínas

Os valores de proteína de todas as cultivares variaram entre 31,89 a 37,82 % de matéria seca, sendo 31,89 a 33,47 % entre as parentais isogênicas e 35,75 a 37,82% entre as GMs. Observa-se um acréscimo do nutriente nas variedades GMs se comparado às parentais isogênicas, demonstrando diferença significativa entre as variedades parentais isogênicas e as respectivas GMs. As parentais isogênicas

apresentaram valores similares entre si, enquanto que a amostra GM 3.1 diferiu das demais também GMs. É interessante ressaltar que as amostras 3.0 e 3.1 apresentaram o menor e o maior teor protéico, respectivamente, se comparados às outras amostras (Tabela 6).

Lipídeos

O conteúdo de lipídeos encontrado com a análise das seis variedades variou entre 24,52 e 25,97% de matéria seca, sendo 24,52 a 25,37 % entre as parentais isogênicas e 24,76 a 25,97% entre as GMs. Os teores deste nutriente seguiram a mesma tendência que os de umidade e proteínas, ou seja, as amostras GMs apresentaram valores maiores que as parentais isogênicas, porém sem significância estatística, com exceção dos valores apresentados pelas amostras 3.0 e 3.1, que, apesar de não serem significativamente diferentes entre si, o são em relação à cultivar 1.1 (Tabela 6).

É interessante ressaltar que as mesmas amostras citadas anteriormente (3.0 e 3.1) apresentaram os menores conteúdos de gorduras totais.

Resíduo mineral fixo

Quanto à concentração de resíduo mineral fixo presente nas amostras analisadas pode-se dizer que apresentaram comportamentos inversos em relação aos outros nutrientes. Os valores médios constatados pela análise das amostras parentais isogênicas (4,85 a 5,48%) foram maiores que aqueles demonstrados pelas amostras GMs (4,72 a 4,92%), porém sem apresentar diferença estatística (Tabela 6).

Carboidratos

O conteúdo de carboidratos encontrado com a análise das seis variedades variou entre 24,52 e 30,40% de matéria seca, sendo 28,22 a 30,40 % entre as parentais isogênicas e 24,52 a 25,03% entre as GMs. Estes resultados seguiram a tendência inversa aos de umidade, proteínas e gordura, ou seja, as amostras GMs apresentaram valores menores que as parentais isogênicas (Tabela 6), uma vez que foram estimados por cálculo de diferença.

Fibras

De acordo com a Associação Americana de Químicos de Cereais (American Association of Cereal Chemists – AACC) a fibra da dieta é a parte comestível das plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado de humanos com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. A fibra da dieta inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias associadas às plantas (Filisetti, 2006 *in* Lajolo & Menezes, 2006).

Estão inclusos nesta definição: polissacarídeos não-amido (NSP) e oligossacarídeos resistentes (OR) (celulose, hemicelulose, frutanos, gomas e mucilagens e pectinas); lignina; substâncias associadas aos NSP (compostos fenólicos, proteínas de parede celular, oxalatos, fitatos, ceras, cutina e suberina); carboidratos análogos (amido resistente e maltodextrinas, além de produtos resultantes de sínteses químicas e enzimáticas como polidextrose, lactulose, frutooligosacarídeos, gomas oligofrutose e outros); fibras de origem animal (quitina, quitosana, colágeno e condroitina) (Filisetti, 2006 *in* Lajolo & Menezes, 2006).

O método de análise de fibras utilizado neste trabalho foi o enzimico-gravimétrico que hidrolisa todo o amido presente na amostra restando, então, resíduos de proteína e matéria inorgânica. Após a utilização de quatro volumes de etanol em diferentes porcentagens, foram obtidas as frações solúvel e insolúvel da fibra presentes nas amostras.

A quantidade de fibras totais encontrada nas amostras analisadas variou entre 29,39 a 33,08% de matéria seca, sendo que 30,20 a 33,08% entre as parentais isogênicas e 29,39 a 30,57% entre as GMs (Tabela 6). Os resultados seguiram a tendência inversa aos de umidade, proteínas e gordura, ou seja, as amostras GMs apresentaram valores menores que as parentais isogênicas, porém sem significância estatística.

Quanto às fibras solúveis, as quantidades variaram entre 2,48 a 4,06%, sendo 2,26 a 4,06% entre as parentais isogênicas e 3,59 a 3,98 % entre as GMs (Tabela 6). Com exceção das cultivares 2.0 e 2.1, os valores se apresentaram superiores aos de suas respectivas GMs.

As fibras insolúveis das amostras analisadas neste trabalho variaram entre 26,69 a 30,03%, sendo 28,50 a 30,03% entre as parentais isogênicas e 26,69 a 27,59% entre as GMs. As três cultivares GMs demonstraram a mesma tendência de declínio em relação aos valores das isogênicas (Tabela 6).

Os valores de fibras totais apresentados não demonstram diferença significativa entre as cultivares GM e suas respectivas parentais convencionais, porém, ao analisar as frações diferenciadas observa-se uma diferença significativa entre as parentais isogênicas e suas respectivas GMs quanto ao conteúdo de fibras insolúveis. Esta diferença pode ter sido causada por motivos diversos como o cultivo em locais diferentes (Karr-Lilienthal e cols., 2005), conforme discutido anteriormente.

Para facilitar a comparação dos resultados, dados de nutrientes de grãos de soja isogênicas e/ou GMs cultivadas no Brasil e em outros países estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Dados de composição química de amostras de soja isogênicas e GMs brasileiras e cultivadas em outros países (%).

Frações (base seca)	Média parentais isogênicas ^a	Média GMs ^b	Média isogênicas (Brasil)	Média GMs (Brasil) ⁱ	Média isogênicas (outros países)	Média GMs (outros países)
Umidade inicial	7,60 a 7,98	7,98 a 8,65	7,89 a 14,89 c,d,h,i	7,51 a 7,91	6,4 a 12,6 c,d, e,f,g	5 a 10,56 ^{f, g}
Matéria seca	92,02 a 92,29	91,35 a 92,02	85,11 a 92,11 c,d,h,i	92,09 a 92,49	87,4 a 93,6 c,d, e,f,g	89,44 a 95 f, g
Proteínas	31,89 a 33,47	35,75 a 37,82	26 a 42,3 ^{c,d, h,i}	25,77 a 40,61	32,6 a 54,6 c,d, e,f,g	37,73 a 41,46 ^{f, g}
Lipídeos	24,52 a 25,37	24,76 a 25,97	12,06 a 26,35 ^{c,h,i}	12,13 a 27,76	12,9 a 19,65 c,f,g	17,28 a 20,41 ^{f, g}
Resíduo mineral	4,85 a 5,48	4,72 a 4,92	3,91 a 5,6 ^{c, h,i}	3,96 a 4,24	4,97 a 5,81 c,f,g	5,31 a 5,54 ^{f, g}
Carboidratos Totais*	28,22 a 30,40	24,52 a 25,03	22,1 a 47,53 h,i	18,99 a 47,68	33,38 a 38,58 ^{f,g}	31,57 a 39,5 ^{f, g}
Fibras Totais. ^k	30,20 a 33,08	29,39 a 30,57	16,47 a 28,29 ^{d,h,i}	15,05 a 32,83	6,35 a 24,1 d, e,f,g	6,28 a 16,85 ^{f,g}
solúvel	2,26 a 4,06	3,59 a 3,98	1,87 a 4,19 ⁱ	2,71 a 4,46 i	Nd	Nd
insolúvel	28,50 a 30,03	26,69 a 27,59	11,5 a 17,13 c,d, i	17,09 a 28,37 ⁱ	11,1 a 24,9 c,d, e,g	18,57 ^g

^a Variedades 1.0, 2.0 e 3.0

^b Variedades 1.1, 2.1 e 3.1

^c Grieshop & Fahey (2001)

^d Karr-Lilienthal e cols., (2004);

^e Grieshop e cols., (2003)

^f Taylor e cols.(1999);

^g Harrigan e cols. (2007)

^h Tabela Brasileira de composição de Alimentos – USP – www.fcf.usp.br/tabela

ⁱ Giora (2004); Cintra (2005)

nd - não detectado

Grieshop & Fahey (2001) realizaram um ensaio com amostras de soja cultivadas em 5 localidades diferentes de 3 países (Brasil, China e EUA) para comparar a quantidade de nutrientes encontrada nas amostras cultivadas sob diversas condições ambientais. Em termos de umidade, as médias encontradas para as variedades brasileiras foram 85,11 a 92,11% de matéria seca, valores que vão de

encontro aos apresentados pelas amostras analisadas neste trabalho. A quantidade de proteína foi de 39,39 a 42,32% para as variedades brasileiras, 40,69 a 43,73% para as variedades chinesas e 39,97 a 44,54% para as variedades americanas. Quanto aos lipídeos, a quantidade média encontrada foi de 18,02 a 19,75% para as variedades brasileiras, 14,51 a 17,96% para as chinesas e 18,05 a 19,65% para as americanas. Vale a pena citar que, para a análise dos lipídeos, os grãos de soja foram previamente submetidos a uma hidrólise ácida para permitir o rompimento de ligações iônicas e covalentes entre proteínas e carboidratos nas amostras. Este tipo de extração pode aumentar a eficiência do processo por provocar a liberação dos macronutrientes citados acima para a quantificação. Como os valores encontrados para os grãos de soja analisados neste trabalho foram superiores aos encontrados por Grieshop & Fahey (2001), sugere-se que o éter etílico, um solvente de extração mais ampla, possa extrair também vitaminas, esteróides, resinas e pigmentos além dos desejados triacilglicerídeos, levando a um pequeno acréscimo. Os mesmos autores encontraram valores médios de 4,97 a 5,21% de resíduo mineral fixo nas amostras brasileiras, 5,03 a 5,88% nas variedades chinesas e 5,03 a 5,81% nas americanas. As fibras foram extraídas por métodos gravimétricos químicos do tipo ácido (ADF) e neutro-detergente (NDF) e os valores médios obtidos foram de 11,5 a 17,13% de fibras insolúveis nas amostras brasileiras, 12,18 a 14,66 % nas variedades chinesas e 11,26 a 18,52 % nas americanas (tabela 7).

Karr-Lilienthal e cols. (2004) analisaram amostras de soja procedentes de países como EUA, Brasil, Argentina, China e Índia e encontraram valores médios de 90,1 a 93,6% para umidade. As amostras brasileiras apresentaram valores médios de 90,5% de matéria seca nos grãos. Para proteínas foram encontrados de 32,6 a 44,9 % em matéria seca em amostras de soja procedentes de países como EUA, Brasil, Argentina, China e Índia. As amostras brasileiras apresentaram valores médios de 39,3% nos grãos. As amostras originárias da China apresentaram os maiores teores de proteína, cerca de 44,9%, enquanto que a Argentina apresentou o menor teor (32,6%). O conteúdo de lipídeos totais encontrado foi de 12,9 a 15,1% para todas as amostras, com destaque para o teor de 13,6% apresentado pela soja brasileira. Para a extração de fibras, os métodos utilizados foram os do tipo gravimétricos químicos, com a utilização de detergentes ácidos (ADF) e neutros (NDF), o qual pode ser comparado a metodologia utilizada neste trabalho para determinação de fibra insolúvel. O percentual médio de fibras totais e insolúveis

encontrado foi de 19,7 e 22,6 para as amostras brasileiras e 18,6 a 24,1 e 22,4 a 24,9 para as variedades de outros países, respectivamente (Tabela 7).

Grieshop e cols. (2003) determinaram em 55 cultivares de soja de 7 regiões diferentes dos EUA os teores de umidade, fibras totais e insolúveis. As fibras foram determinadas utilizando métodos com detergente ácido (ADF) e neutro (NDF). Os valores médios encontrados foram de 89,6 a 90,2% de umidade, de 18,2 a 20,5% para variedades americanas de fibras totais e 11,1 a 13% para fibras insolúveis, apresentando valores um pouco mais baixos que os encontrados neste trabalho (Tabela 7).

Taylor e cols. (1999) analisaram a composição de 2 tipos sojas tolerantes ao glifosato (40-3-2 e 61-67-1) cultivadas nos anos de 1992 e 1993 nos EUA e compararam os resultados a uma variedade não transgênica plantada e cultivada no mesmo período. Os plantios foram pareados e os teores de umidade encontrados nos grãos GM foram 10,56 (40-3-2) e 8,49 (61-67-1) para aquelas cultivadas no ano de 1992 e 5,74% para a linhagem 40-3-2 cultivada em 1993. As proteínas detectadas nas amostras GMs (40-3-2 e 61-67-1) atingiram valores de 40,35 e 41,46% para aquelas cultivadas em 1992 e 41,43% para a linhagem 40-3-2 cultivada no ano de 1993. A amostra parental isogênica apresentou médias de 41,01% para as cultivadas em 1992 e 41,4 % para aquelas cultivadas em 1993 nos EUA. O percentual médio de lipídeos encontrado foi de 20,41 para a linha 40-3-2 cultivada em 1992 e 20,53 no ano seguinte, enquanto que a amostra de soja GM linha 61-67-1 cultivada em 1992 demonstrou valor de 19,39%. A parental isogênica apresentou percentuais de 19,8 para 1992 e 19,89 para 1993. Os valores médios de resíduo mineral fixo encontrados foram de 5,34 para a linhagem 40-3-2 cultivada em 1992 e 5,35 no ano seguinte, enquanto que a amostra de soja GM linha 61-67-1 cultivada em 1992 demonstrou valor de 5,31%. A parental isogênica apresentou valores de 5,18 para 1992 e 5,31 para 1993. Os carboidratos totais, determinados por diferença, atingiram de 33,86% para a linha 40-3-2 cultivada em 1992 e 32,67% no ano seguinte, enquanto que a amostra de soja GM linha 61-67-1 cultivada em 1992 demonstrou conter 33,82%. A parental isogênica apresentou valores de 34,01% para 1992 e 33,38% para 1993. O percentual médio de fibra bruta (método AOAC 1990) encontrado foi de 6,44 para a linha 40-3-2 cultivada em 1992 e 6,86 no ano seguinte, enquanto que a amostra de soja GM linha 61-67-1 cultivada em 1992 demonstrou

valor de 6,28%. A parental isogênica apresentou valores de 6,35% para 1992 e 7,36% para 1993 (Tabela 7).

Harrigan e cols.(2007) avaliaram a composição química das sojas tolerante ao glifosato (evento 40-3-2) e sua respectiva parental isogênica cultivadas em 5 locais diferentes da Romênia em 2005 e as compararam com 4 variedades comercialmente disponíveis. As sementes foram plantadas de maneira pareada, ou seja, lado a lado com as outras variedades. O teor de umidade foi determinado por perda de peso constante após secagem a vácuo em estufa a 100°C. O percentual médio de umidade encontrado após a análise dos grãos de soja foi 5,44 para a parental isogênica e 5,38 para a variedade GM, ou seja, 94,56 e 94,62% de matéria seca. O valor protéico das amostras foi determinado pelo método de Kjeldhal usando o fator de correção 6,25 e revelaram valores médios de 38,48% para a parental isogênica e 37,73% para a GM. A quantidade de gordura foi estimada através do método de Soxhlet e os resultados encontrados para os grãos de soja foram 17,39% para a parental isogênica e 17,28% para a GM. A quantificação do resíduo mineral fixo foi realizada por análise gravimétrica, usando um forno elétrico. Os percentuais médios encontrados para os grãos de soja foram 5,54 para a parental isogênica e 5,49 para a GM. Os valores de carboidratos totais encontrados foram de 38,58% para a parental isogênica e 39,5% para a GM. As extrações de fibras foram realizadas pelos métodos que utilizaram materiais ácido-detergentes obtendo a fibra bruta e neutro-detergentes obtendo a fibra insolúvel. Os percentuais médios encontrados foram de 16,94 e 18,54 para a isogênica e 16,85 e 18,57 para a GM, respectivamente (Tabela 7).

A Tabela Brasileira de composição de Alimentos – USP, após a análise de um montante de variedades diferentes adaptadas a várias regiões do país, constataram que a soja brasileira contém cerca de 9,7% de umidade, 40,5% de proteína, 22,1% de lipídeos, 5,6% de matéria inorgânica, 22,1% de carboidratos e 21,67% de fibras totais nos grãos (Tabela 7).

Giora (2004) e Cintra (2005) realizaram análises de composição química em amostras de soja parental isogênica e suas respectivas GMs também tolerante ao herbicida glifosato cultivadas no Brasil, na região de Goiás. Cintra (2005) analisou duas amostras e encontrou 8,16 e 9,05% para as variedades isogênicas e 7,51 e 7,91% para as suas respectivas GMs para umidade. Giora (2004) quantificou proteínas usando o fator 5,7 para a conversão de nitrogênio em proteína nas

amostras parental isogênica e GM e encontrou 35,15% e 35,55% em base seca, respectivamente. Pelo mesmo método e utilizando o fator de conversão 5,52, Cintra (2005) encontrou valores de 26,88 e 35,86 % para soja parental isogênica e 25,77 e 40,61% para as suas respectivas GMs, em base seca. Giora (2004) encontrou valor de 12,06% para soja parental isogênica e 12,13% para a sua respectiva GM, para lipídeos em base seca. Cintra (2005) realizou extração de extrato etéreo e encontrou valores de 17,68 e 26,61% para duas amostras de soja parental isogênica e 20,95 e 27,76% para suas respectivas GMs. Para o resíduo mineral fixo, Giora (2004) encontrou valor de 5,26% para a soja parental e 4,64% para a soja GM para em base seca e Cintra (2005) estimou na amostra parental isogênica valores de 3,94 e 3,98% e 3,96 e 4,24% nas amostras GMs. Giora (2004) através do cálculo por diferença na análise da composição química das amostras parental isogênica e sua respectiva GM apresentou valores de 47,53% e 47,68% para carboidratos totais, respectivamente. Da mesma forma, Cintra (2005) apresentou valores de 25,22 e 26,89% para isogênica parental e 18,99 e 28,03% de carboidratos nas amostras GMs. Giora (2004) realizou análises de fibras totais, solúveis e insolúveis pelo método enzimico-gravimétrico em amostras de soja parental isogênica e em suas respectivas GMs tolerantes ao herbicida glifosato e encontrou valores de 32,48% para fibras totais, 4,19% para solúvel e 28,29% para insolúvel na amostra de soja parental isogênica e 32,83% para fibras totais, 4,46% para solúvel e 28,37% para insolúvel na amostra de soja GM em base seca. Pelo mesmo método, Cintra (2005) realizou as análises em amostras de soja parental isogênica e em suas respectivas GMs tolerantes ao herbicida glifosato e encontrou valores de 15,3 e 20,02 % para fibras totais, 2,71% para solúvel e 17,31% para insolúvel para a amostra GM e 16,47 a 16,63% para fibras totais, 1,87% para fibra solúvel e 16,98% para fibras insolúveis (Tabela 7).

Ao comparar os resultados apresentados acima, observa-se que as variedades GMs apresentaram valores de umidade acima da média encontrada para as variedades brasileiras, apesar de estarem dentro da faixa encontrada para variedades cultivadas em outros países.

Quanto aos valores de proteínas, observa-se que todas as variedades analisadas neste trabalho apresentaram valores dentro da faixa encontrada para variedades isogênicas brasileiras e de outros países, porém abaixo da média encontrada para variedades GMs cultivadas em outros países. Esta diferença pode

ter sido causada por motivos diversos, levando em consideração o cultivo em locais diferentes das amostras analisadas. No entanto, como os fatores de microclima não foram mencionados pelos autores dos trabalhos acima citados (Harrigan e cols, 2007; Taylor e cols, 1999), não é possível estabelecer uma relação direta entre os resultados apresentados. É interessante ressaltar que temperaturas distintas têm efeito direto na utilização de açúcar pela planta, ou seja, em altas temperaturas (em torno de 35°C) o carbono da sacarose é incorporado à proteína, enquanto que em temperaturas mais baixas (21 a 29°C), o carbono é incorporado aos lipídeos da semente (Karr-Lilienthal e cols., 2005, Gibson & Mullen, 1996). Outro dado interessante é que, de acordo com Dornbos (1992) e Gibson & Mullen (1996), as concentrações de proteína em sementes de soja madura são geralmente inversamente correlacionadas com concentrações de açúcar e óleo, ou seja, um aumento de 1% na concentração protéica está associado a um declínio de 0,43% da concentração de óleo, dependendo do local de cultivo.

A comparação dos valores de lipídeos citados acima permite concluir que todas as variedades analisadas neste trabalho apresentaram valores de acordo com a média encontrada para lipídeos em variedades brasileiras, porém acima da média encontrada para as variedades isogênicas e GMs cultivadas em outros países (Tabela 5). Esta diferença pode ser decorrente da utilização de métodos não compatíveis com os usados neste trabalho para a determinação deste composto.

Os valores de resíduo mineral fixo apresentados acima demonstraram que somente as variedades geneticamente modificadas apresentaram valores acima da média encontrada para variedades brasileiras e abaixo para as GMs cultivadas em outros países.

Quanto aos valores de carboidratos totais percebe-se que todos os resultados estão dentro da média encontrada para variedades brasileiras e abaixo da apresentada pelas isogênicas e GMs cultivadas em outros países.

Ao comparar os resultados apresentados acima, é possível constatar que os valores de fibras totais e insolúveis estão acima daqueles encontrados para variedades isogênicas brasileiras e/ou cultivadas em outros países e GMs cultivadas em outros países.

Perfil de aminoácidos das amostras

O perfil de aminoácidos encontrado nos grãos de soja analisados neste trabalho está representado na Tabela 8, com grande heterogeneidade nos resultados entre as amostras.

Tabela 8. Composição de aminoácidos das amostras de soja parentais isogênicas e GMs em g/100 g de farinha desengordurada cultivadas em solo brasileiro.

Aminoácidos	1.0	1.1	2.0	2.1	3.0	3.1
Essenciais						
Arginina	2,73	2,90	2,80	3,09	2,60	3,33
Histidina	0,94	0,97	0,98	1,08	0,91	1,10
Isoleucina	1,48	1,60	1,55	1,68	1,40	1,75
Leucina	2,68	2,85	2,82	3,09	2,61	3,13
Valina	1,48	1,57	1,54	1,67	1,39	1,71
Metionina	0,25	0,27	0,07	0,25	0,18	0,28
Fenilalanina	1,81	1,95	1,90	2,08	1,73	2,18
Lisina	2,32	2,46	2,43	2,67	2,28	2,68
Triptofano	0,53	0,52	0,40	0,55	0,43	0,52
Treonina	1,47	1,51	1,55	1,68	1,42	1,65
Condicionalmente ou não essenciais						
Ácido aspártico	4,37	4,57	4,50	4,98	4,23	5,11
Serina	1,95	2,07	2,04	2,25	1,95	2,29
Ácido Glutâmico	7,21	7,75	7,58	8,36	7,09	8,81
Prolina	1,83	1,96	1,91	2,11	1,79	2,16
Glicina	1,59	1,68	1,68	1,82	1,57	1,85
Alanina	1,55	1,64	1,64	1,80	1,55	1,77
Cistina	0,40	0,41	0,40	0,41	0,42	0,46
Tirosina	1,23	1,25	1,27	1,34	1,15	1,35
Amônia	0,67	0,72	0,72	0,77	0,64	0,79
Totais	36,49	38,65	37,77	41,67	35,33	42,91

n=2

Garcia e cols. (1997) propõem que a atividade biológica das proteínas depende da composição de aminoácidos, uma vez que estes contêm a informação necessária para desenvolver a conformação nativa da proteína, responsável pela sua atividade biológica. Dependendo da maturidade, condições de cultivo e fatores genéticos das sementes, a soja pode acumular aminoácidos livres que exercem papéis importantes na fisiologia vegetal e no perfil nutricional da leguminosa.

No contexto geral, todas as variedades GMs obedeceram a mesma linha tendencial de outros compostos discutidos anteriormente como proteínas totais e umidade, ou seja, de aumento do conteúdo quando comparado à sua parental.

As amostras 3.0 e 3.1 apresentaram respectivamente os menores e os maiores valores, demonstrados em vermelho e negrito respectivamente na Tabela 8, de aminoácidos da maior parte das cultivares, fato comprovado com a verificação do valor total de aminoácidos das mesmas.

Numa análise das variedades isoladas, foi possível perceber mesmo sem a análise estatística dos dados que a variedade 1.0 apresentou os menores valores para alanina e cistina se comparado com todas as outras variedades.

A variedade parental isogênica 2.0 apresentou os menores valores de cistina e triptofano, enquanto que sua respectiva GM apresentou os maiores valores de triptofano, treonina e alanina, se comparadas com todas as variedades.

A parental isogênica 3.0 destaca-se entre as demais por apresentar os menores conteúdos de todos os aminoácidos, com exceção da cistina e triptofano, bem como, obviamente, os menores conteúdos de nitrogênio e de proteína total, se comparada a todas as variedades. Por outro lado, a sua respectiva cultivar GM apresentou os maiores conteúdos de aminoácidos, exceto para treonina, alanina e triptofano, além dos maiores conteúdos de nitrogênio e de proteína total, quando comparados a todas as variedades.

Em relação aos aminoácidos essenciais, as amostras geneticamente modificadas apresentaram valores superiores para a maior parte deles, quando comparadas com as suas respectivas parentais isogênicas, o que parece óbvio porque apresentaram valores maiores de proteínas totais.

Para facilitar a comparação dos resultados, dados de aminoácidos de grãos de soja isogênicas e/ou GMs cultivadas no Brasil e em outros países como China, Índia, EUA e Argentina, estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9. Composição de aminoácidos de amostras de soja isogênicas e GMs brasileiras e cultivadas em outros países em g/100 g de farinha desengordurada.

Aminoácidos	Média Parentais isogênicas (Brasil) ^f	Média GMs (Brasil) ^g	Média isogênicas (Brasil) ^{a,b}	Média isogênicas (outros países) ^{a,b,c,d,e}	Média GMs (outros países) ^{d,e}
Essenciais					
Arginina	2,60 a 2,80	2,90 a 3,33	2,61 a 3,02	2,24 a 3,42	2,76 a 2,80
Histidina	0,91 a 0,98	0,97 a 1,10	0,98 a 1,16	0,90 a 1,19	1,01 a 1,10
Isoleucina	1,40 a 1,55	1,60 a 1,75	1,47 a 1,69	1,33 a 2,08	1,69 a 1,82
Leucina	2,61 a 2,82	2,85 a 3,13	2,77 a 3,17	2,47 a 3,55	2,93 a 3,06
Valina	1,39 a 1,54	1,57 a 1,71	1,54 a 1,80	1,63 a 2,20	1,80 a 1,93
Metionina	0,07 a 0,25	0,27 a 0,28	0,22 a 0,54	0,26 a 0,64	0,54 a 0,56
Fenilalanina	1,73 a 1,90	1,95 a 2,18	1,84 a 2,11	1,63 a 2,36	1,95 a 1,98
Lisina	2,28 a 2,43	2,46 a 2,68	2,30 a 2,59	2,07 a 2,78	2,46 a 2,64
Triptofano	0,40 a 0,53	0,52 a 0,55	0,36	0,47 a 0,58	0,45 a 0,49
Treonina	1,42 a 1,55	1,51 a 1,68	1,42 a 1,62	1,25 a 2,13	1,54 a 1,57
Condicionalmente ou não essenciais					
Ácido aspártico	4,23 a 4,50	4,57 a 5,11	4,12 a 4,70	3,44 a 5,29	4,35 a 4,51
Serina	1,95 a 2,04	2,07 a 2,29	1,75 a 2,22	1,31 a 2,40	2,03
Ácido Glutâmico	7,09 a 7,58	7,75 a 8,81	6,65 a 7,58	5,35 a 8,55	6,84 a 7,48
Prolina	1,79 a 1,91	1,96 a 2,16	1,70 a 2,26	1,31 a 2,56	1,91 a 2,06
Glicina	1,57 a 1,68	1,68 a 1,85	1,52 a 1,74	1,48 a 1,93	1,64 a 1,71
Alanina	1,55 a 1,64	1,64 a 1,80	1,58 a 1,74	1,46 a 1,92	1,71 a 1,72
Cistina	0,40 a 0,42	0,41 a 0,46	0,57 a 0,87	0,40 a 1,03	0,59 a 0,60
Tirosina	1,15 a 1,27	1,25 a 1,35	1,26 a 1,46	1,12 a 1,56	1,31 a 1,38

^a Grieshop & Fahey (2001), ausente de triptofano.

^b Karr-Lilienthal e cols., (2004);

^c Grieshop e cols., (2003), ausente de triptofano.

^d Taylor e cols.(1999), evento 40-3-2;

^e Harrigan e cols. (2007)

^f Variedades 1.0, 2.0 e 3.0

^g Variedades 1.1 , 2.1 e 3.1

Ao comparar as amostras analisadas neste trabalho com as demais cultivadas em solo brasileiro, observa-se que a maior parte dos valores de aminoácidos essenciais dos grãos de soja parentais isogênicas está dentro da média apresentada, enquanto que os conteúdos de alguns aminoácidos, essenciais ou não, presentes nos grãos de soja GMs estão acima.

Em relação às amostras GMs cultivadas em outros países, os valores encontrados estão, de certa forma, em equilíbrio com aqueles apresentados pelas amostras GMs analisadas neste trabalho.

As análises de aminoácidos realizadas por Karr-Lilienthal e cols., (2004) demonstram que as amostras brasileiras contêm teores próximos, ou seja, não muito diferentes daquelas provenientes dos EUA e Índia. A soja argentina apresentou os menores conteúdos de aminoácidos, enquanto que a China os maiores.

Grieshop & Fahey (2001) compararam amostras cultivadas em solo brasileiro e detectaram diferenças nas concentrações de todos os aminoácidos presentes, exceto para a metionina e cisteína. Quando a comparação foi realizada entre os valores de sojas cultivadas nos três países (Brasil, China e EUA), foram observadas diferenças significativas nas concentrações de todos os aminoácidos com exceção da alanina e serina. As sojas provenientes dos EUA continham maiores concentrações de aminoácidos se comparados às dos outros países.

Os aminoácidos das amostras de soja evento 40-3-2 e sua respectiva parental isogênica não demonstraram diferença significativa (Taylor e cols., 1999). Esses autores, porém, trabalharam com amostras provenientes de campos experimentais mantidos pela empresa detentora da patente de transformação, garantindo um cultivo com condições controladas.

No entanto, conforme mencionado por Grieshop e cols. (2003), diferenças nas concentrações de proteína e aminoácidos na soja são possivelmente causadas por variações genotípicas e/ou condições ambientais às quais os grãos foram cultivados.

Perfil de ácidos graxos das amostras

Os resultados da composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados das seis cultivares analisadas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Composição em ácidos graxos (g/100 g de amostras) de grãos de soja GMs e suas respectivas parentais isogênicas expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Ácidos Graxos	1.0	1.1	2.0	2.1	3.0	3.1
Sat.						
C16:0 Palmítico	2,42 $\pm$ 0,09 ^a	2,37 $\pm$ 0,04 ^a	2,46$\pm$0,05^a	2,34 $\pm$ 0,10 ^a	2,31 $\pm$ 0,04 ^a	2,03$\pm$0,04^a
C18:0 Estearico	0,69 $\pm$ 0,02 ^a	0,85 $\pm$ 0,01 ^a	0,68 $\pm$ 0,01 ^a	0,82 $\pm$ 0,04 ^a	0,67$\pm$0,00^a	0,89$\pm$0,02^a
C20:0 Araquidônico	0,06$\pm$ 0,00^a	0,08 $\pm$ 0,00 ^a	0,07 $\pm$ 0,00 ^a	0,08 $\pm$ 0,00 ^a	0,06$\pm$0,00^a	0,09$\pm$0,00^a
C22:0 Behênico	0,08 $\pm$ 0,00 ^a	0,08 $\pm$ 0,00 ^a	0,09 $\pm$ 0,00 ^a	0,09 $\pm$ 0,00 ^a	0,08 $\pm$ 0,00 ^a	0,09 $\pm$ 0,00 ^a
C24:0 Lignocérico	0,03 $\pm$ 0,00 ^a	0,04 $\pm$ 0,00 ^a	0,03 $\pm$ 0,00 ^a	0,04 $\pm$ 0,00 ^a	0,03 $\pm$ 0,00 ^a	0,03 $\pm$ 0,00 ^a
Total	3,28	3,41	3,32	3,36	3,15	3,13
Monoins						
C18:1 Oléico	4,13 $\pm$ 0,19 ^a	4,54 $\pm$ 0,06 ^a	4,06 $\pm$ 0,06 ^a	4,24 $\pm$ 0,36 ^a	3,23$\pm$0,02^a	5,58$\pm$0,10^a
C20:1 Eicosaenóico	0,04 $\pm$ 0,00 ^a	0,04 $\pm$ 0,00 ^a	0,04 $\pm$ 0,00 ^a	0,04 $\pm$ 0,00 ^a	0,03$\pm$0,00^a	0,04 $\pm$ 0,0 ^a
Total	4,17	4,58	4,09	4,28	3,26	5,62
Poliins						
C18:2 Linoléico	11,37$\pm$0,39^a	10,08 $\pm$ 0,16 ^a	10,51 $\pm$ 0,21 ^a	9,53 $\pm$ 0,43 ^a	10,91 $\pm$ 0,21 ^a	8,27$\pm$0,15^a
C18:3 Linolênico	1,12 $\pm$ 0,03 ^a	1,01 $\pm$ 0,02 ^a	1,29$\pm$0,03^a	1,10 $\pm$ 0,05 ^a	1,28 $\pm$ 0,25 ^a	0,83$\pm$0,01^a
Total	12,49	11,09	11,80	10,63	12,19	9,1
Total Ins.	16,66	15,67	15,90	14,91	15,45	14,71
Total Geral	19,94	19,08	19,22	18,27	18,60	17,85

n=3

Letras iguais na mesma linha indicam amostras com conteúdos semelhantes do mesmo ácido graxo (p < 0,05).

A soja tem uma grande importância em diversos setores industriais porque pode fornecer matéria-prima, mais precisamente o óleo, para a produção de lipídeos estruturais incluindo os triacilgliceróis que contêm ácidos graxos de cadeia longa, os considerados essenciais ao organismo humano (Turan e cols., 2007; Silva & Gioielli, 2006), pigmentos, fosfolípidos e ácidos graxos livres em sua composição (Garcia e cols., 1997). Além disso, forma cristais grandes facilmente filtráveis quando o óleo é hidrogenado e fracionado; contém alto índice de iodo, que permite a sua hidrogenação produzindo grande variedade de gorduras plásticas e refino com baixas perdas (Silva & Gioielli, 2006).

De uma forma geral, os valores apresentam uma tendência inversa àquela fornecida com a análise de lipídeos totais, ou seja, as amostras GMs apresentaram

valores com tendência de decréscimo quando comparadas às suas parentais isogênicas. Além disso, os valores totais de ácidos graxos encontrados são inferiores aos encontrados após determinação de extrato etéreo. Isso pode ser explicado pela metodologia utilizada para a análise, como já foi discutido anteriormente. A extração de extrato etéreo com éter etílico pode permitir a retirada de substâncias como vitaminas, esteróides, resinas e pigmentos além dos desejados triacilglicerídeos, causando o acréscimo do valor de lipídeos.

Ao analisar o valor total de ácidos graxos de todas as variedades não foi constatada diferença estatística entre as amostras, apesar da disparidade de alguns valores apresentados para os ácidos oléico e linoléico de variedades como 3.0 e 3.1 (Tabela 10).

Percebe-se que para os valores de AG saturados, igualmente aos AG monoinsaturados, das variedades parentais isogênicas apresentaram resultados inferiores se comparados às suas respectivas GMs, contrastando com a tendência de aumento dos poliinsaturados.

Os valores mais altos e mais baixos de cada ácido graxo estão exemplificados respectivamente em vermelho e negrito na Tabela 10.

A amostra 3.0 apresentou os menores valores para AG saturados e monoinsaturados quando comparada às outras variedades, contrastando com a sua respectiva GM, variedade 3.1, a qual apresentou o maior valor para AG monoinsaturado e menor valor de AG poliinsaturados. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados no total geral de lipídeos, demonstrando que as amostras 3.0 e 3.1 apresentaram os menores valores se comparados às outras variedades, da mesma forma que os lipídeos totais.

Com a análise dos resultados pode-se dizer que provavelmente a alteração genética trouxe o benefício de aumentar não significativamente o conteúdo de AG monoinsaturados nas amostras GMs, melhorando sua qualidade nutricional, uma vez que o ácido oléico é considerado um ácido graxo desejável porque é mono-saturado, tornando-o de baixa suscetibilidade à oxidação lipídica (Gong, 2007; Broun e cols, 1999).

Além do mais, como o óleo de soja é considerado suscetível à oxidação lipídica devido ao seu alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (Turan e cols., 2007), o decréscimo dos teores destes PUFA verificado nas amostras GMs podem ser fator favorável relativamente à oxidação lipídica.

Esta susceptibilidade à oxidação lipídica explica a produção recente de algumas linhagens mutagenizadas de soja e de canola com o objetivo de apresentarem baixa atividade da enzima oleato desaturase, resultando num acúmulo de ácido oléico e diminuição de teores de ácidos graxos poliinsaturados nas sementes (Broun e cols., 1999).

Dados de ácido graxos de variedades de soja isogênica e GM cultivadas em vários países estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11. Composição em ácidos graxos (g/100 g de amostras) de grãos de soja GMs e suas respectivas parentais isogênicas cultivadas em outros países. Resultados expressos em média.

Ácidos Graxos	Média Parentais isogênicas (Brasil) ^e	Média GMs (Brasil) ^f	Média isogênicas (outros países) ^{b,c}	Média GMs (outros países) ^c
Sat.				
C16:0	2,31 a 2,46	2,03 a 2,37	1,82 a 2,11	1,79
C18:0	0,67 a 0,69	0,82 a 0,89	0,712 a 0,84	0,84
C20:0	0,06 a 0,07	0,08 a 0,09	0,063	0,063
C22:0	0,08 a 0,09	0,08 a 0,09	0,059	0,058
C24:0	0,03	0,03 a 0,04	-	-
Monoins				
C18:1	3,23 a 4,13	4,24 a 5,58	3,49 a 4,35	3,51
C20:1	0,03 a 0,04	0,04	0,031	0,030
Poliins				
C18:2	10,51 a 11,37	8,27 a 10,08	8,80 a 9,92	8,80
C18:3	1,12 a 1,29	0,83 a 1,10	1,33 a 1,52	1,49

^b USDA (2005);

^c Harrigan e cols. (2007)

^e Cultivares 1.0, 2.0 e 3.0

^f Cultivares 1.1, 2.1 e 3.1

Em termos comparativos, a maior parte dos AG saturados de ambos conjuntos de amostras isogênicas e GMs analisadas neste trabalho apresentou-se acima da média encontrada na literatura científica. Os teores de AG monoinsaturados presentes nas amostras isogênicas deste trabalho estão parcialmente dentro da média encontrada para sojas de outros países, porém os encontrados nos grãos de soja GMs estão acima do valor encontrado para soja GM cultivada em outro país. E, por fim, os valores de AG poliinsaturados apresentaram heterogeneidade com aumento para AG linoléico das amostras parentais e diminuição para amostras GMs, sendo que, para o ácido linolênico todas demonstraram valores abaixo do encontrado na literatura científica.

Em relação às condições ambientais e de cultivo, alguns trabalhos sugerem que a composição de ácidos graxos do óleo de soja é influenciada pelas condições ambientais a que a lavoura foi submetida (Gibson & Mullen, 1996; Bennett e cols., 2003), conforme discutido anteriormente.

Num estudo realizado com o cultivo de soja em locais como Carolina do Norte, Mississippi e Porto Rico, a temperatura foi a variável mais importante e influenciável na determinação da composição de ácidos graxos do óleo das sojas. Em ambientes mais quentes, foram encontradas porcentagens maiores de ácido oléico e menores de ácidos linoléico e linolênico (Gibson & Mullen, 1996). Resultado condizente com o encontrado por Bennett e cols. (2003) após a análise dos teores de proteínas e gorduras de grãos de soja extraídas de diferentes locais da planta (caule e folhas). Nesse trabalho, os vegetais cultivados em climas mais quentes apresentaram concentrações mais elevadas de ácido oléico (monoinsaturado) enquanto que aqueles cultivados em climas frios apresentaram concentrações mais elevadas de ácidos linoléico e linolênico (poliinsaturados). Concentrações de ácidos palmítico e esteárico não sofreram variação com a temperatura do ambiente nos dois trabalhos.

Embora não seja possível afirmar, os dados da literatura apresentados acima reforçam a argumentação de que diferenças ambientais existentes na mesma região geográfica, exemplo do microclima do cerrado do sul do estado de Goiás, seriam suficientes para alterações de composição química de nutrientes das amostras analisadas.

5.1.2 Análises de outros compostos do metabolismo secundário do vegetal

Ácido Fítico

Os resultados de IP3, IP4, IP5 e IP6 encontrados nas seis variedades estão expostos na Tabela 12.

O fitato, ou inositol hexafosfato (IP6), é um composto naturalmente presente em todas as sementes e possivelmente em todas as células dos vegetais, principalmente em estado de maturidade. Segundo Harrigan e cols. (2007), sementes podem acumular até 90% de fosfatos orgânicos.

Tabela 12. Conteúdo de inositol fosfato presente nos grãos das variedades de soja GMs e suas respectivas parentais isogênicas ($\mu\text{mol/g b.s.}$).

Amostras	InsP6	InsP5	InsP4	InsP3
1.0	$18,76 \pm 0,95^a$	traços	-	-
1.1	$20,88 \pm 1,03^b$	traços	-	-
2.0	$18,82 \pm 0,84^a$	$0,72 \pm 0,08$	traços	-
2.1	$23,88 \pm 0,96^c$	$0,7 \pm 0,07$	traços	-
3.0	$21,71 \pm 0,68^b$	$0,56 \pm 0,05$	traços	-
3.1	$29,94 \pm 1,12^d$	$0,85 \pm 0,08$	$0,12 \pm 0,02$	-

n=4

Letras iguais na mesma coluna indicam amostras com conteúdos semelhantes do fitato ($p < 0,05$).

É derivado do inositol e existe principalmente nas sojas como um complexo insolúvel composto por cálcio-magnésio-potássio que não é nutricionalmente disponível (Padgett e cols, 1996). Em seu estado nativo, se complexa com proteínas ou com cátions mono e divalentes, formando um complexo forte que induz a uma maior resistência à proteólise (Vucenik & Shamsuddin, 2006; Stephens e cols, 1993). Porém, alguns autores sugerem que possui propriedades antioxidantes e anticancerígenas em animais (Lee e cols., 2007^A).

Os resultados de IP6 encontrados demonstram a mesma tendência encontrada em algumas análises anteriores, apresentando um teor aumentado de fitatos nas amostras GMs (20,88 a 29,94 $\mu\text{mol/g}$) quando comparados às suas respectivas parentais isogênicas (18,76 a 21,71 $\mu\text{mol/g}$).

As cultivares isogênicas 1.0 e 2.0 não demonstraram diferenças estatísticas entre si, a exceção ficou apenas para a amostra 3.0, que apresentou resultado similar à soja GM 1.1. Já as GMs, não apresentaram similaridade estatística entre si.

Segundo Garcia e cols. (1997), a soja pode conter em média 1 a 2,3% de ácido fítico. Stephens e cols (1993) apresentaram dados de quantificação dos conteúdos de inositol fosfato em vegetais frescos demonstrando 0,13 $\mu\text{mol/g}$ de IP4, 0,70 $\mu\text{mol/g}$ de IP5 e 12,5 $\mu\text{mol/g}$ de IP6 em grãos de soja.

Horner e cols. (2005) analisaram os teores de fitatos de 116 cultivares de soja cultivadas em 4 locais diferentes dos EUA e encontraram uma média de 0,77 a 2,22 % (11,66 a 33,63 $\mu\text{mol/g}$) do composto nos grãos. A análise foi realizada por cromatografia de troca iônica e análise de fósforo por calorimetria.

Harrigan e cols. (2007) determinaram ácido fítico (IP6) em amostras de soja tolerantes ao herbicida glifosato em amostras cultivadas nos EUA e encontraram 1,17 % (17,72 $\mu\text{mol/g}$) de matéria seca e 1,13 % (17,12 $\mu\text{mol/g}$) para a variedade parental isogênica.

Yuan e cols (2007) realizaram ensaios com grãos de soja parentais e respectivas linhagens mutantes, sendo homozigotas e heterozigotas cruzadas entre si, para determinar os teores de fitatos presentes após cultivo em diferentes locais do país, safras (anos subseqüentes) e estações (primavera/ outono/inverno) do ano. Os resultados demonstraram valores estatisticamente diferentes de fitatos para variedades produzidas em diferentes locais e estações do ano, além de apresentarem diferenças não esperadas entre linhagens mutagenizadas que sofreram mais de dois cruzamentos com linhas parentais isogênicas.

Os resultados de fitatos encontrados nas amostras estão dentro da variação encontrada na literatura científica, porém estão diferentes significativamente entre si, quando comparadas variedades parental isogênica e respectivas GMs.

Isoflavonas

Os resultados de isoflavonas e suas formas conjugadas ou agliconas estão expressos na Tabela encontrados nas seis variedades estão expostos na Tabela 13.

Tabela 13: Teor de isoflavonas (agliconas) totais (mg/100 g de amostra b.u.) e seu perfil em diferentes variedades de soja cultivadas em Goiás (safra 2004-2005).

Cultivar	Isoflavonas totais	% conjugadas			
		β -glicosídeos	Malonilglicosídeos	Acetilglicosídeos	Agliconas
	Média $\pm$ dp				
1.0	101,8 $\pm$ 2,5 ^c	40,7	59,4	0,0	0,0
1.1	48,3 $\pm$ 1,2 ^b	39,4	60,7	0,0	0,0
2.0	143 $\pm$ 4,3 ^d	36,4	60,0	0,0	3,6
2.1	57,0 $\pm$ 0,3 ^e	35,4	64,6	0,0	0,0
3.0	127,9 $\pm$ 2,3 ^a	30,8	62,6	0,0	6,6
3.1	48,3 $\pm$ 0,8 ^b	32,9	67,2	0,0	0,0

n=3

As formas das isoflavonas (conjugados ou agliconas) foram expressas em % do total (p/p).

Letras iguais na mesma coluna indicam amostras com conteúdos similares do mesmo composto (p < 0,05).

As isoflavonas encontradas nas seis variedades de soja demonstraram diferenças significativas entre as parentais isogênicas e as geneticamente modificadas. As primeiras apresentaram teores que variaram entre 101,8 mg para 147 mg / 100 g de amostra em base úmida, o que é considerado dentro da variação normal encontrada em variedades de soja brasileiras, enquanto que as variedades GMs (48,3 a 57 mg/ 100 g) demonstraram quantidades em torno de 50% inferiores (Tabela 13).

De acordo com Genovese e cols (2005) e Carrão-Panizzi e cols. (1998), variedades brasileiras apresentaram teores de isoflavonas totais dentro de uma faixa ampla de 54 a 188 mg/ 100 g amostra. Park e cols. (2002) analisaram cinco variedades de soja concedidas pelo Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) e realizaram a extração de isoflavonas em temperatura ambiente (25°C) com metanol 80% por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Os resultados de isoflavonas totais obtidos foram valores entre 140 a 300 mg/ 100 g amostra.

Segundo Carrão-Panizzi e cols. (1998) a concentração de isoflavonas em soja é geneticamente determinada e afetada por fatores ambientais, principalmente pela temperatura local. Quando a soja é submetida a altas temperaturas (26°C) durante todo ou parte do período de acúmulo das mesmas, que tem início após 35 dias do florescimento, o teor destes compostos pode diminuir.

Além disso, os níveis de isoflavonas na soja podem variar em mais que o triplo, dependendo da parte morfológica de onde é extraída (cotilédone, hipocótilo e casca), da variedade (fatores genéticos) e das condições ambientais (temperatura, umidade) de cultivo (Tsukamoto e cols., 1995).

Quanto à variação observada nas variedades geneticamente modificadas do presente trabalho, sugerimos duas hipóteses.

A primeira se refere à possibilidade da ocorrência de uma tolerância incompleta por parte do cultivar originado para ser resistente ao glifosato e, com isso, ser afetado por doses subletais do herbicida, o que poderia atingir indiretamente a via de síntese das isoflavonas, uma vez que são produtos da rota do ácido chiquímico (Duke e cols., 2003). No entanto, isso implicaria em redução do crescimento da planta e de outras alterações, pois toda a via de síntese de aminoácidos aromáticos estaria comprometida.

Por bloquear a enzima EPSPsintase, o glifosato causa aumento dos níveis de chiquimato da soja resultando na diminuição dos níveis de compostos derivados da rota do chiquimato como as antocianinas, responsáveis pelo sabor e cor das sementes, porém, a EPSPS mutante presente no grão, faz uso deste chiquimato para dar continuidade à rota. Desta forma, não é de se esperar nenhum efeito nos produtos da rota do ácido chiquímico como as isoflavonas e seus glicosídeos (Duke e cols., 2003).

Como segunda hipótese, sabendo-se que estes efeitos não atingiriam a rota de compostos derivados do ácido chiquímico (Duke e cols., 2003), esta alteração nos níveis de isoflavona seria provavelmente por via indireta, pois; já que funcionam como antibióticos, sinalizadores para interação com simbiontes, pigmentos e protetores contra a luz; outros metabólitos produzidos pelo aumento dos níveis do ácido hidroxibenzóico realizariam a tarefa das isoflavonas, não sendo necessário para o vegetal GM a produção da mesma quantidade que uma não GM.

Quanto à comparação dos teores de isoflavonas totais presentes em sojas GMs analisadas em outros trabalhos, foi observado uma redução nas variedades

GMs se comparado às suas respectivas parentais isogênicas por Lappé e cols. (1999), porém, Padgett e cols. (1996), Duke e cols. (2003), Taylor e cols. (1999) e Dellanay e cols. (1995) realizaram determinações de isoflavonas em sementes de soja GM para tolerar o glifosato e em sua parental isogênica e não encontraram diferença significativa nos resultados.

A distribuição das três isoflavonas das seis variedades está exposta na tabela 14.

Tabela 14: Distribuição das formas totais de isoflavonas presentes em variedades de soja cultivadas em Goiás (safra 2004-2005).

Cultivar	% total		
	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
1.0	22,2	12,9	65,0
1.1	25,8	26,7	47,5
2.0	44,3	7,5	48,2
2.1	39,5	15,4	45,1
3.0	32,6	19,4	48,0
3.1	32,5	35,6	31,9

A porcentagem total de cada aglicona representa a soma das formas livres e conjugadas, expressas como agliconas, em relação ao total (p/p).

Em relação à distribuição das três isoflavonas, as cultivares apresentaram diferenças significativas que variaram entre 32 e 65% (genisteína), 22 e 44% (daidzeína), e 8 e 36% (gliciteína) do total. A variedade 3.1 destacou-se pela baixa porcentagem de genisteína total e extremamente elevada de gliciteína total (Tabela 14).

Harrigan e cols. (2007) quantificaram as formas totais de isoflavonas presentes em grãos de soja isogênicas e GMs cultivadas nos EUA e encontraram valores médios de 116,18 mg de daidzeína /100 g de matéria seca, 164,18 g de genisteína /100g e 8,68 mg de gliciteína /100g. O processo de extração, diferente do utilizado neste trabalho, consistiu numa extração a quente com uso de solução de ácido hidrocloreídrico e reagente alcoólico. Após refluxo de pelo menos 4 horas e preparo da amostra, a mesma foi aplicada em coluna C18 e as isoflavonas foram eluídas com metanol 80%. A análise foi realizada em sistema de HPLC Perkin-Elmer 200 com detecção em 260 nm (UV). Mesmo considerando a diferença da

metodologia utilizada para extração, esses valores estão extremamente altos, se comparados aos valores encontrados no presente trabalho.

Porém, para Park e cols. (2002), cultivares de soja de uma mesma região podem apresentar grande variação na concentração de isoflavonas. Fato comprovado por Genovese e cols. (2005) que analisaram 12 variedades brasileiras e encontraram duas linhagens com proporções elevadas de gliciteína (15,8 e 17,4%, respectivamente), quando comparadas a outras estudadas.

Setchell e cols. (2001) comentam que a biodisponibilidade de genisteína em seres humanos é maior que a da daidzeína. Apesar da gliciteína ser a isoflavona normalmente presente em menor proporção, sabe-se que a sua atividade estrogênica é três vezes maior que a da genisteína (Song e cols., 1999). Dessa forma, estes resultados podem trazer novas perspectivas com relação aos efeitos fisiológicos diferenciados que estas variedades poderiam causar em ensaios *in vivo*.

Considerando a ampla gama de variáveis necessárias para uma análise comparativa entre grãos de leguminosa cultivados, os resultados encontrados para macronutrientes e componentes secundários deste trabalho demonstraram que, as amostras apresentaram algumas diferenças significativas, conforme apontadas pelos métodos estatísticos empregados. Porém, essas diferenças não tornam estas variedades de soja mais ou menos recomendadas para consumo, uma vez que os dados de macronutrientes e compostos de metabolismo secundário apresentaram-se dentro de uma faixa normal de variação encontrada em trabalhos científicos realizados no Brasil e no exterior. Assim, tomados os resultados das cultivares isogênicas e GM de soja como alimento, para consumo humano ou para ração animal, as diferenças apresentadas entre elas são menores do que aquelas dispostas em tabelas de composição química de nutrientes, nas quais geralmente não há menção de linhagem do vegetal.

5.2 Potencial alergênico das amostras geneticamente modificadas

5.2.1 Extração e caracterização dos extratos protéicos brutos (EPB) e aqueles potencialmente alergênicos como as globulinas 7S e 11S das seis cultivares de soja.

O perfil protéico das cultivares de soja está demonstrado na Figura 13.

Figura 13: Eletroforegrama SDS-PAGE dos EPB das seis cultivares de soja com cerca de 5 µg de proteína por amostra em gel de 12 % de acrilamida.

Ao analisar a figura percebe-se que os perfis protéicos demonstram pequenas diferenças de posicionamento e intensidade das bandas peptídicas. Vale a pena ressaltar que a cultivar 3.0 não apresenta duas bandas (30 e 10 KDa) encontradas em todas as outras amostras (setas na Figura 13).

Nota-se que os principais peptídeos conhecidamente alergênicos, como as subunidades da β -conglícinina ou 7S (α' PM 57000 – 72000, α 57000 – 68000 e β 42000 – 52000 Da) e da glicínina ou 11S (ácida PM~12000/ ~32000 – 45000 Da e básica PM ~ 20000 – 22500 Da) encontram-se em altas concentrações e aparentemente não são alteradas entre as cultivares convencionais ou mesmo pela expressão da enzima EPSPS (~45 KDa) (Harrison e cols., 1996) nas cultivares tolerantes ao herbicida glifosato.

A Figura 14 (A) apresenta o EP rico em β -conglícinina das seis cultivares, uma glicoproteína composta por três subunidades. A Figura 14 (B) apresenta o EP rico

em glicinina das seis cultivares, uma proteína de estrutura quaternária composta de 12 subunidades, formando um dímero de 2 hexâmeros idênticos.

Figura 14. Eletroforegramas SDS-PAGE dos EP ricos em β -conglícinina e glicinina das seis cultivares de soja com cerca de 5 μ g de proteína por amostra em gel de 12% de acrilamida, corada com nitrato de prata. “A” apresenta o EP rico em 7S e “B” o EP rico em 11S.

A glicinina é uma proteína com aproximadamente 360 KDa, composta por subunidades não-idênticas inicialmente unidas por interações não covalentes e transportadas através do sistema secretório como trímeros intermediários. No vacúolo, cada subunidade do trímero é proteoliticamente clivada para formar um polipeptídeo ácido de 30-40 KDa ligado por uma ponte dissulfeto a um polipeptídeo básico de ~20KDa. Esta clivagem é a responsável pela transformação de 2 trímeros em uma globulina 11S hexamérica madura. As subunidades são sintetizadas a partir de polímeros expressos por 5 genes, sendo que cada subunidade é sintetizada como um precursor (Mills e cols., 2003; Breiteneder & Radauer, 2004). Estes polipeptídeos podem ser obtidos após a desnaturação e dissociação da proteína.

A extração das frações foi realizada por alterações contínuas de pH e centrifugação, ou seja, ao acidificar o meio, alguns grupos protéicos se precipitam e se separam da solução. Com esta separação, foi possível isolar o grupo complexo de proteínas 11S e 7S do extrato bruto protéico da soja. Porém, estes grupos são complexos e contêm proteínas de vários tipos e tamanhos, como pode ser observado nas figuras 14 A e B.

De acordo com Breiteneder & Mills (2005), somente 50% da fração 7S consiste em β -conglícinina, enquanto que a fração 11S é composta quase que inteiramente de glicinina dividida em 5 combinações diferentes (G_1 a G_5) de subunidades ácida e básica ligadas.

A glicinina tem a propensão de formar grandes agregados que permanecem em equilíbrio quando suspensas em soluções de baixa força iônica (0,01). No entanto, estes complexos, formados de dodecâmeros, hexâmeros, trímeros e monômeros, podem ser alterados formando grandes oligômeros quando suspensos em soluções de alta força iônica (0,5) e se dissociando quando submetidos à situação inversa (Mills e cols., 2003; Breiteneder & Mills, 2005). Sob esta ótica, a extração foi realizada com tampão Tris HCl 20 mM, o qual determinaria uma força iônica de 0,5 para a solução protéica, mantendo-a em grandes oligômeros e as protegendo de possíveis forças de dissociação das mesmas, por meio do uso de 0,5 M de NaCl, o que segundo Than & Shibasaki (1976) aumenta a solubilidade das proteínas.

Purificação e caracterização da fração 11S das seis cultivares de soja analisadas

O cromatograma apresentado é o relativo ao desempenho de uma cultivar (2.1) e utilizado como modelo para todas as outras (Figura 15).

Após a aplicação em coluna cromatográfica de bioafinidade, os EP ricos em glicinina das variedades apresentaram desempenhos cromatográficos com poucas diferenças entre si, porém similares se comparados parentais isogênicas com respectivas GMs (Figura 15).

Figura 15: Cromatograma de extração da fração 11S de todas as cultivares de soja.

A glicinina está representada no primeiro pico do cromatograma e foi extraída com o tampão 20 mM Tris HCl + 0,5 M de NaCl, pH 7,5.

O eletroforegrama unidimensional com a 11S extraída de cada cultivar está representada na figura 16.

Figura 16. Eletroforegramas SDS-PAGE das frações 11S isoladas das seis cultivares de soja com cerca de 2 µg de proteína por amostra em gel de 12 % de acrilamida, corada com nitrato de prata.

Em geral, as cultivares GMs apresentaram mais bandas protéicas e de maior tamanho e intensidade se comparadas às suas respectivas parentais isogênicas. Todas as cultivares apresentaram quantidades maiores de polímeros de subunidades básicas que as ácidas e também outros polímeros nos grãos.

As amostras 3.0 e 3.1 se destacam por apresentarem pequenas quantidades de polímeros de subunidade ácida da glicinina (~40KDa), sendo que a cultivar 3.1 demonstrou a presença de quantidades muito grandes de peptídeos com ~17 KDa (Figura 16).

Hou & Chang (2004) descrevem também a presença de uma banda de ~12KDa, de um polipeptídeo pequeno com aproximadamente 97 aminoácidos, que compõe o complexo hexâmero da glicinina. Os mesmos autores (Hou & Chang, 2004) comentam que o pH e a força iônica de soluções influenciam na estrutura molecular da glicinina. Em pH 7,6 e força iônica 0,5, a glicinina é um hexâmero complexo (11S) que, quando submetida ao pH 3,8 e força iônica de 0,03, se dissocia em um trímero (7S), tornando-se mais sensível ao aquecimento devido à queda da temperatura desnaturante.

Nos casos das cultivares 3.0 e 3.1, provavelmente houve quebra de estrutura da glicinina com o tipo de processamento utilizado, tornando-a mais frágil e se

quebrando em peptídeos menores, o quais se acumularam nos patamares inferiores do gel. A presença da banda de ~17KDa na amostra 3.1 diminuiu o grau de pureza da preparação.

É provável que os processos de congelamento e descongelamento freqüentes das amostras tenham causado alteração da estrutura das proteínas, uma vez que a agregação da glicinina é também afetada pela temperatura, induzindo-a ao desdobramento e formando precipitados tanto no resfriamento a 4°C, quando em concentrações maiores que 1% (p/v), como no aquecimento formando géis em concentrações protéicas entre 2,5-10% (p/v), dependendo do pH e da força iônica (Mills e cols.,2003).

Foram realizadas eletroforeses bidimensionais das frações 11S purificadas de duas cultivares de soja, como modelo para as 6 cultivares, sendo uma isogênica (1.0) e a outra geneticamente modificada (1.1), para melhor visualização do seu mapa protéico (Figura 17). O critério de escolha da fração recém coletada da coluna de bioafinidade foi aquela que apresentasse, em gel de SDS-PAGE, o número de bandas correspondentes ao tamanho da proteína nativa, ou seja, bandas cujos pesos variassem entre 37-40 KDa (ácida) e 19-20 KDa (básica), além de uma banda de peso molecular em torno de 12 KDa, pertencente ao grupo das proteínas ácidas.

Figura 17: Eletroforegrama bidimensional SDS-PAGE das frações isoladas 11S (glicinina) das amostras 1.0 e 1.1 com cerca de 100 µg de proteína em gel de 12 % de acrilamida, corado com Coomassie G-250.

O mapa protéico das cultivares parental isogênica e sua respectiva GM demonstrou similaridade entre os spots, com exceção de um spot de 10 KDa e com PI 6,0 na amostra 1.1.

A eletroforese bidimensional tem sido uma das ferramentas mais poderosas da proteômica para a separação e quantificação de proteínas. Esta técnica separa proteínas de acordo com 2 propriedades independentes em 2 etapas. Na primeira ocorre a focalização isoeletrica (primeira dimensão), ou seja, separação das proteínas presentes na amostra conforme seu ponto isoeletrico (pI). Na segunda etapa (segunda dimensão) as proteínas são separadas conforme seu peso molecular num gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE). Cada mancha presente no gel corresponde a uma única proteína. Milhares de proteínas diferentes podem ser isoladas e, a partir daí, conhecidas com mais precisão informações sobre seu peso molecular e ponto isoeletrico (Görg, 2004; Batista e cols. (2007).

Para o presente trabalho, a realização desta eletroforese permite confirmar que o método escolhido para realizar a obtenção das proteínas desejadas, como é o caso da glicinina, é efetivo. A separação por peso molecular e ponto isoeletrico são fatores que garantem a veracidade do resultado. Devido a este caráter confirmativo, foi optado por fazer somente para duas cultivares.

Purificação e caracterização das frações 7S das seis cultivares de soja analisadas

O cromatograma apresentado é o relativo ao desempenho de uma cultivar (2.0) e utilizado como modelo para todas as outras (Figura 18).

Figura 18: Cromatograma de extração da fração 7S da cultivar 2.0.

A β -conglícinina está representada no segundo pico do cromatograma e foi eluída com uma solução contendo 0,2 M α -D-mannopyranoside dissolvida em tampão 20 mM Tris HCl + 0,5 M de NaCl, pH 7,5.

A figura 19 apresenta a proteína β -conglucininina purificada a partir do EB rico em 7S, demonstrado acima.

Figura 19. Eletroforegrama SDS-PAGE das frações isoladas 7S (β - conglucininina) de todas as cultivares com cerca de 2 μ g de proteína em gel de 12 % de acrilamida, corada com nitrato de prata.

Bandas entre 50 a 80 KDa foram obtidas após a eluição da proteína de todas as amostras do meio cromatográfico, com exceção da cultivar 3.0, a qual não apresentou a banda de 80 KDa.

A presença de mais de três bandas sugere que o método de purificação não foi suficiente para separar algumas proteínas ligadas à β -conglucininina como a α ou a γ -conglucininina, proteínas que fazem parte do complexo de proteínas 7S e que também são glicosiladas (Lee e cols, 2007^B). Sugere-se que algumas das bandas apresentadas na figura acima provavelmente representem a β -conglucininina porque, na literatura científica consta que o trímero da mesma pode conter subunidades com pesos entre 57 – 72 KDa (α'), 57 – 68 KDa (α) e 42 – 52 KDa (β). Mais precisamente, para Breiteneder & Radauer (2004) a subunidade α possui 60 KDa. Além disso, vale ressaltar que a β -conglucininina é uma glicoproteína que contém moléculas de glicídeos (manose e N-acetil-glucosamina) agregadas em quantidades próximas a 5% de sua cadeia, tornando-a mais pesada que as não conjugadas (Cheftel e cols, 1989).

As eletroforeses bidimensionais das β -conglucinininas purificadas de duas cultivares de soja foram realizadas para verificação do grau de pureza das amostras. Estão representadas na figura 20. As mesmas foram usadas como modelo para as 6 cultivares, sendo uma isogênica (1.0) e a outra geneticamente modificada (1.1). O critério de escolha da fração recém coletada da coluna de bioafinidade foi aquela

que apresentasse, em gel de SDS-PAGE, o número de bandas correspondentes ao tamanho da proteína nativa, ou seja, bandas cujos pesos variassem entre 57 – 72 KDa (α'), 57 – 68 KDa (α) e 42 – 52 KDa (β).

Figura 20: Eletroforegrama bidimensional SDS-PAGE das frações isoladas 7S (β - conglucina) das amostras 1.0 e 1.1 com cerca de 150 μ g de proteína em gel de 12 % de acrilamida, corado com Coomassie G-250.

O mapa protéico das cultivares parental isogênica e sua respectiva GM demonstrou similaridade entre os spots, apesar de alguns spots entre 20 e 30 KDa com PI 4 a 5 e outros com PM inferior a 20 KDa com PI 7 a 9 na amostra 1.0. Os monômeros α , α' e β da β -conglucina estão demonstrados pelas setas. Os spots encontrados na cultivar 1.0 são provavelmente resquícios de glicina, diminuindo a pureza da amostra.

5.2.2 Ensaio de proteólise *in vitro* para testar a resistência ao aquecimento dos extratos protéicos bruto, glicina e β - conglucina.

Informações sobre a digestibilidade das proteínas alimentares, a antigenicidade residual de fragmentos alimentares absorvidos e epítomos de IgE são importantes na determinação do potencial de alergenicidade de um alimento, uma vez que as proteínas são submetidas a condições adversas, como ação de proteases, e mudanças de pH, durante sua passagem pelo trato gastrointestinal que podem alterar sua composição (FAO/WHO, 2001; Lee e cols., 2007). Caso esta proteína toda ou parte dela mantenha-se intacta quando submetida a estas condições durante uma digestão, a probabilidade de atingir a mucosa intestinal é

muito grande. Esta estabilidade a torna capaz de cruzar a membrana da mucosa do intestino e ativar o sistema imunológico aí presente (Fuchs & Astwood, 1996).

Proteínas purificadas não aquecidas e não processadas devem ser submetidas às condições de degradação, com pepsina usando um processo padrão determinado pela FAO/WHO (2001), para atestar a sua resistência e com isso obter dados para a avaliação do seu potencial de alergenicidade.

Os testes de digestibilidade com pepsina seguiram as recomendações de metodologias encontradas na literatura científica (The United States Pharmacopiea) para a concentração de 13:1 (FAO/WHO, 2001) e foram adaptados às condições do laboratório. Também foi considerado interessante avaliar a resistência à proteólise numa concentração que simulasse as condições fisiológicas como na proporção de 2,5:100.

Neste trabalho a hidrólise foi realizada com 3 extratos protéicos diferentes: EPB (extrato protéico bruto), extrato contendo glicinina e extrato contendo β -conglucininina. Para o EBP foram utilizadas duas concentrações de enzima/substrato (2,5:100 e 13:1 p/p) enquanto que as proteínas purificadas foram submetidas somente à concentração de 13:1.

A hidrólise do EBP e das proteínas purificadas foi realizada devido à possibilidade de certos fragmentos de proteínas potencialmente alergênicas isoladas de sua matriz demonstrarem ausência de antigenicidade e, quando utilizadas em sua forma nativa em um teste imunogênico com IgE específica, o potencial alergênico é detectado, como é o caso da *Gly m Bd 30 K* encontrada na soja (Vieths e cols, 1999; Metcalfe e cols., 1996). Além disso, é importante acessar o comportamento da proteína logo após algumas etapas de seu processamento, como no caso das amostras purificadas que foram submetidas a processos químicos e físicos diferenciados como alteração de pH, centrifugação, separação de proteínas, dessalinização e outros.

Para a análise dos géis apresentados abaixo o termo estabilidade será muito freqüente porque é usado para descrever uma habilidade da proteína de manter sua estrutura original tridimensional nativa após tratamentos (químicos como uréia e proteases ou físicos como a temperatura), induzindo-a a resistir à degradação (Breiteneder & Mills, 2005). Contudo, o que será avaliado nos géis será a estabilidade de fragmentos de proteínas remanescentes a essas condições, uma vez que após a hidrólise, as amostras foram submetidas ao tampão de amostra

(Laemmli, 1970) contendo o reagente redutor β -mercaptoetanol, usado para cindir as ligações dissulfeto, principais componentes de manutenção da conformação original de proteínas.

Outro dado importante a ser considerado é que existem 3 padrões gerais para a verificação do tipo de estabilidade apresentada por uma proteína após ser submetida a uma hidrólise enzimática. São eles: a completa estabilidade por 60 minutos com pouco ou nenhum fragmento proteolítico; a estabilidade intermediária (30 segundos até 60 minutos) para a proteína íntegra com fragmentos observados que foram estáveis para períodos adicionais de tempo e nenhuma estabilidade para a proteína íntegra com fragmentos estáveis observados até pelo menos 8 minutos (FAO/WHO, 2001).

As figuras 21 (A/B), 22 (A/B), 23 (A/B) demonstram a proteólise das variedades parentais isogênicas e suas respectivas GMs na concentração de 2,5:100 com pepsina.

Figura 21: Eletroforese SDS-PAGE (gel poliacrilamida 15%) da digestão *in vitro* de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 1.0 (A) e GM 1.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60, 90, 120, 150, 180 e 210 min com pepsina em concentração 2,5:100.

Figura 22: Eletroforese SDS-PAGE (gel 15% poliacrilamida) da digestão *in vitro* de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 2.0 (A) e GM 2.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60, 90, 120, 150, 180 e 210 min com pepsina em concentração 2,5:100.

Figura 23: Eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15%) da digestão *in vitro* de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 3.0 (A) e GM 3.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 min com pepsina em concentração 2,5:100.

Observa-se que as amostras parentais e GMs apresentaram perfil de resistência semelhante entre si e se comparadas com as demais. A partir do momento 30 minutos é possível perceber o acúmulo de peptídeos na faixa de peso molecular de 50 KDa provenientes da hidrólise enzimática de proteínas de 70 a 80 KDa durante o período de incubação, resultando no aumento desta fração. A resistência à proteólise com pepsina torna-se evidente pela permanência dos resíduos de pesos moleculares médios de 50, 25 e 12 KDa nos géis até 210, 60 e 210 minutos respectivamente.

A presença contínua das bandas de peso molecular de 50 KDa até 60 minutos nas amostras parentais convencionais e GMs pode evidenciar o resultado da hidrólise das porções protéicas de maior peso molecular que se acumulam neste patamar demonstrando ou não estabilidade, já que a pepsina age em vários pontos da cadeia polipeptídica, hidrolisando as ligações entre vários aminoácidos.

Vale lembrar que o extrato bruto protéico de soja contém várias outras proteínas que não as estudadas neste trabalho (7S e 11S). Dentre estas destacam-se alérgenos importantes como o inibidor de tripsina (entre 15-21 KDa), albumina 2S (entre 12 e 17 KDa), a cisteína protease (*Gly m* Bd 28 K, *Gly m* Bd 30 K e *Gly m* 1 – entre 26 e 34 KDa), profilinas (~14KDa), entre outras (Mills e cols., 2004; L'Hocine & Boye, 2007; Sathe e cols., 2005).

Dos alérgenos apontados acima, alguns são conhecidos por apresentar estabilidade às condições de proteólise e a temperaturas elevadas, como as subunidades α e β da β -conglícinina, inibidor de tripsina, a lectina de soja, a *Gly m* Bd 30 K e as subunidades básicas da glicinina.

As figuras 24 (A/B), 25 (A/B), 26 (A/B) demonstram a proteólise dos EBP das variedades parentais isogênicas e suas respectivas GMs quando submetidas ao fluido gástrico simulado (FGS) na concentração 13:1 (FAO/WHO, 2001) .

Figura 24: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 1.0 (A) e GM 1.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

Figura 25: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 2.0 (A) e GM 2.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

Figura 26: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de extrato bruto protéico de soja parental isogênica 3.0 (A) e GM 3.1 (B) nos momentos 0; 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

Na digestão com concentração 13 (enzima): 1 (substrato), foi observada a presença constante de proteína de 50 KDa e outros peptídeos de mais baixo peso molecular como entre 30 a 10 KDa, da mesma forma que na hidrólise com 2,5:100 de pepsina/substrato. Estes peptídeos estão presentes devido à ausência de sítio específicos de clivagem após as primeiras hidrólises, quebrando a cadeia em vários polipeptídeos menores. A ação enzimática é interrompida, pois a pepsina age preferencialmente em ligações tyr-leu, his-leu, ala-leu e phe-phe em pH ácido. Este comportamento foi observado em todas as amostras de sojas parentais estudadas e em suas respectivas GMs.

Vale lembrar que a pepsina está representada pela banda maciça presente em todos os géis de peso molecular 35 KDa.

Em termos comparativos, pode-se dizer que as amostras parental e GM apresentaram resistência à proteólise semelhante entre si e se comparadas com as demais. Os géis apresentaram bandas intactas de pesos moleculares em torno de 10, 20, 30 e 50 KDa, sugerindo a presença das seguintes proteínas: inibidor de tripsina (15 – 21 KDa), glicinina básica (17-21KDa), *Gly m Bd 30K* (34 KDa) e a subunidade β da β -conglucininina (45 – 52 KDa).

Percebe-se que a maior parte dos fragmentos de proteínas sofre hidrólise até 30 segundos enquanto que outras, que podem ser pequenos alérgenos, em até 2 minutos. Grandes alérgenos, como são considerados peptídeos resistentes ao modelo de digestão padrão, mantêm-se intactos por mais de 2 minutos quando proteínas íntegras e até 8 minutos quando fragmentos de proteínas (Fuchs & Astwood, 1996).

Uma das subunidades da β -conglucininina, cujo peso molecular varia entre 50-70 KDa e considerada alérgeno importante, apresentou estabilidade nos dois sistemas de FGS de 30 a 60 minutos, da mesma forma que Fu e cols. (2002) encontraram num ensaio realizado com FGS na proporção de 1:10.

Já a subunidade da glicinina considerada resistente (~20 KDa), também considerada grande alérgeno, não apresentou resistência maior que 2 minutos nas variedades 2.0/2.1 e 3.0/3.1 (13:1) e 1.0/1.1 (2,5:100). Metcalfe e cols., (1996) encontraram mesmo resultado em ensaio com condições similares a este trabalho.

As proteólises apresentadas por ambos os sistemas de FGS deste trabalho apresentaram bandas em torno de 25 KDa que resistiram de 90 a 210 minutos na digestão de 2,5:100 e 30 segundos a 5 minutos na de 13:1. Esta banda pode ser

representada pela *Gly m 1* (26 – 34 KDa), cuja estabilidade é conhecida atingir até 2 minutos em FGS 10:1 (Fu e cols.,2002).

Um dado interessante é que na hidrólise enzimática de 13:1, foi encontrada em todos os géis uma banda de ~18 KDa que resistiu de 15 a 60 minutos, representada provavelmente pelo inibidor de tripsina (15 – 21 KDa), que não apareceu na hidrólise de 2,5:100.

Com relação à comparação entre as variedades parentais isogênicas e as suas respectivas GMs, pode-se dizer que a variedade 1.1 apresentou em ambas as hidrólises uma permanência maior no gel de bandas com aproximadamente 25-30 KDa, se comparada à sua parental 1.0. Apesar da resistência à hidrólise não ser um fator decisivo para a proteína ser considerada um grande ou potente alérgeno, é uma informação importante para a análise da mesma (Fu e cols, 2002). Caso esta variedade seja mais alergênica que sua parental, isto será evidenciado nos testes de reatividade contra soros de pacientes alérgicos à soja, abordados no próximo tópico.

Fu e cols (2002) realizaram um ensaio de hidrólise enzimática em duas concentrações de FGS (10:1 e 1:10) e constataram que enquanto na primeira uma proteína levava 5 minutos para a hidrólise completa, na segunda o tempo necessário foi de 120 minutos. Quando este dado é transportado para as hidrólises realizadas neste trabalho, isto pode ser percebido quando a hidrólise da proteína de ~25 KDa presente em quase todas as variedades no momento 5' com FGS 13:1, e leva ~120 minutos para ser hidrolisada na solução de FGS 2,5:100.

Porém, nesse estudo, os mesmos autores sugerem que a digestibilidade da proteína é altamente influenciada pela razão pepsina/proteína utilizada no ensaio, ou seja, em alguns casos ela pode parecer resistente ou lábil à digestão com FGS, dependendo da quantidade de FGS usada. Essa conclusão foi elaborada a partir de uma proteína que não apresentou resistência quando submetida a um FGS de 10:1, mas fragmentos remanescentes permaneceram até 120 minutos em FGS na concentração de 1:10.

Algumas das características estruturais que podem garantir a estabilidade é a ligação dissulfídica e a glicosilação (Breiteneder & Mills, 2005;). Isto explica a maior resistência da banda de 50 KDa, provavelmente representada por uma das subunidades da β -conglucina, que é glicosilada.

Apesar dos autores Breiteneder & Mills, (2005) afirmarem que proteínas de reserva não possuem uma estrutura globular compacta e não sofrerem uma

transição convencional do estado nativo para o desnaturado quando sujeitas a tratamentos térmicos, sendo assim consideradas (ambas as 11S e 7S) termo-estáveis, neste trabalho elas foram submetidas ao tampão de amostra (Laemmli, 1970) com a presença de β -mercaptoetanol e submetidas à fervura por 5 minutos antes da corrida da eletroforese unidimensional, o que causou a desnaturação das proteínas.

As figuras 27 (A/B), 28 (A/B), 29 (A/B) demonstram a proteólise dos extratos de glicininas purificadas de todas as variedades parentais isogênicas e suas respectivas GMs quando submetidas ao fluido gástrico simulado (FGS) na concentração 13:1 (FAO/WHO, 2001) .

Figura 27: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de glicinina (11S) de soja parental isogênica 1.0 (A) e GM 1.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

Figura 28: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de glicinina (11S) de soja parental isogênica 2.0 (A) e GM 2.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

Figura 29: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de glicinina (11S) de soja parental isogênica 3.0 (A) e GM 3.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

De modo geral, a hidrólise enzimática da glicinina de todas as variedades apresentou um perfil semelhante entre as parentais e respectivas geneticamente modificadas. Bandas com pesos moleculares em torno de 12, 18 e 22 KDa, resistiram até 60 min de aquecimento em todas as variedades e na terceira condição nas variedades 2.0/2.1. Outras, como de 20 (1.0/1.1 e 3.0/3.1), resistiram menos tempo (entre 30 seg a 2 min), considerando a presença da pepsina em todos os géis (~35 KDa). Com esta constatação sugere-se a presença das seguintes proteínas: inibidor de tripsina (15 – 21 KDa), glicinina ácida (12 KDa) e básica (~20 KDa) ou mesmo resquícios de hidrólise enzimática de baixo peso molecular.

Ao comparar o perfil eletroforético das amostras 1.0 e 1.1, observa-se a presença de bandas com pesos moleculares variantes entre ~18 e ~22 KDa que apresentaram resistência à hidrólise até 5 a 15 min. Amostras das cultivares 2.0 e 2.1, apresentaram bandas com pesos moleculares de ~18 e ~22 KDa resistentes até 5 e 60 min, respectivamente. Entretanto, nas cultivares 3.0 e 3.1, percebe-se que bandas com PM de ~18 KDa mantiveram-se resistentes até 15 min na GM e até 5 min na parental, apesar de bandas de aproximadamente 10KDa apresentarem resistência semelhante.

Metcalfe e cols., (1996) relatam que a glicinina inteira (~360KDa) mantém-se por 30 segundos após uma hidrólise de concentração 10:1, porém se fragmentada (12-45 KDa) mantém-se por 15 minutos, sem mencionar qual subunidade que tal fato foi observado.

Lee e cols (2007^B) realizaram um ensaio de hidrólise enzimática com pepsina, de acordo com as condições propostas pela FAO/WHO (2001) e observaram que a duas bandas de cerca de 23 e 20 KDa pertencentes ao grupo das subunidades

básicas da glicinina resistiram à hidrólise enzimática, semelhante ao resultado encontrado neste trabalho nas seis variedades. E ainda propõem que a susceptibilidade diferencial para a hidrólise das subunidades ácida e básica ocorre devido à hidrofobicidade intensa e a compactabilidade dos polipeptídeos básicos.

A seguir, as Figuras 30, 31 e 32 demonstram a proteína β -conglícinina purificada de todas as variedades submetida à hidrólise enzimática sob as mesmas condições da glicinina.

Figura 30: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de β -conglícinina (7S) de soja parental isogênica 1.0 (A) e GM 1.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

Figura 31: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de β -conglícinina (7S) de soja parental isogênica 2.0 (A) e GM 2.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

Figura 32: Eletroforese SDS-PAGE da digestão *in vitro* de β -conglycinina (7S) de soja parental isogênica 3.0 (A) e GM 3.1 (B) nos momentos 0; 5 e 30 seg; 2; 5; 15; 30,60 min com pepsina em concentração 13:1.

De modo geral, a hidrólise enzimática da β -conglycinina de todas as variedades também apresentou um perfil semelhante entre as parentais e respectivas geneticamente modificadas. Em todas, a banda de 50 KDa predominou até 15', permanecendo intacta até 60' nas variedades 3.0 e 2.1.

Com o resultado demonstrado pode-se supor que a banda remanescente representa a subunidade β da β -conglycinina, cujo peso molecular varia entre 42-52 KDa, e que demonstrou o mesmo comportamento de resistência no ensaio realizado por Fu e cols., 2002, mantendo-se intacta por 120 minutos. Porém, Metcalfe e cols (1996) relataram que a subunidade β da mesma proteína não apresenta resistência, ao contrário da subunidade α .

A presença de moléculas de açúcar (manose e N-acetil-glucosamina) agregadas à proteína torna a β -conglycinina mais resistente e estável às condições diferenciadas como temperatura alta e alterações de pH.

De modo geral, a hidrólise enzimática do EBP, 11S e 7S de todas as variedades apresentou um perfil semelhante entre as parentais e respectivas geneticamente modificadas, não sendo possível perceber aspectos de maior poder alergênico nas variedades GMs.

5.2.3 – Testes de reatividade da IgE presente nos soros de pacientes sensibilizados à soja com frações de EBP das seis cultivares da leguminosa.

Os ensaios de imunoreatividade têm por principal objetivo a constatação do potencial alergênico de todas as variedades de soja testadas neste trabalho, através da comparação dos resultados obtidos das variedades parental isogênica e sua respectiva GM em valores de absorbância para os originados pelo ELISA e por simples constatação de bandas pelo Western Blotting.

Teste imunoquímico do tipo ELISA para a obtenção do título do anticorpo IgE presente em soros de pacientes alérgicos e não alérgicos à leguminosa

O primeiro passo para a realização deste ensaio foi a padronização da melhor concentração ideal de soro a ser utilizada nas reações. A reatividade dos EBPs de cada cultivar foi testada em triplicata e os resultados estão expostos nas figuras 33, 34 e 35.

Figura 33: Curva de titulação dos soros de pacientes alérgicos (P1 e P2), atópico (C1) e não alérgico (C2) aos EBP das cultivares de soja 1.0/1.1

Figura 34: Curva de titulação dos soros de pacientes alérgicos (P1 e P2), atópico (C1) e não alérgico (C2) aos EBP das cultivares de soja 2.0/2.1

Figura 35: Curva de titulação dos soros de pacientes alérgicos (P1 e P2), atópico (C1) e não alérgico (C2) aos EBP das cultivares de soja 3.0/3.1.

Após a realização deste ensaio, concluiu-se que a melhor concentração a ser usada seria a de 1/20 para todos os soros. Além disso, apesar de não ter sido feita a quantificação das imunoglobulinas E presentes em todos os soros, foi possível perceber que o conteúdo da imunoglobulina E específica para frações protéicas da soja presente em soros de pacientes alérgicos não demonstrou diferença acentuada daquele encontrado no soro dos pacientes não-alérgicos (atópico e controle).

Apesar de ter sido elaborado um modelo experimental ELISA com o intuito de acionar a IgE específica contra proteínas da soja, sugere-se a hipótese da ocorrência de ligações inespecíficas destas IgEs com compostos reativos como glicoproteínas da amostra ou de outras fontes (Fotisch & Vieths, 2001). Além disso, é importante considerar que um paciente atópico contém altos níveis de IgE total no soro e isto pode contribuir para as ligações inespecíficas encontradas (Van Ree & Aalberse, 1999).

Uma das possibilidades de ocorrência de reação não específica é a utilização do sistema de revelação contendo a proteína HRP (horse radish peroxidase), por se tratar de uma glicoproteína.

De acordo com Altman (2007), os determinantes de carboidratos são certamente os epítomos estruturais individuais mais frequentemente encontrados para a IgE. Eles têm sido denominados como CCDS (determinantes de reações cruzadas com carboidratos) e são comumente conhecidos como causadores de resultados falsos positivos em ensaios experimentais *in vitro*. Isto se dá pela presença da asparagina ligada a porções da molécula de carboidrato, mais precisamente a xilose e a fucose, as quais formam a parte essencial dos epítomos independentes. As glicoproteínas vegetais contêm ambos os epítomos, porém não desencadeiam sintomas clínicos na maior parte dos casos, sendo considerado um alérgeno clínico irrelevante.

Considerando a alta sensibilidade (66%) e especificidade (80%) do RAST, cujo valor preditivo negativo é de 79% e positivo de 10% (Bittencourt, 2002), as reações positivas observadas com os controles alérgicos permitem considerar os resultados como fidedignos, apesar de não desconsiderar os falso-positivos detectados. Além do mais, os resultados apresentados com o teste ELISA serão confirmados com o teste Western blotting.

Avaliação da reatividade de anticorpos IgE presente em soros de pacientes alérgicos ao EBP das seis cultivares de soja por teste imunológico do tipo ELISA

A seguir, a figura 36 demonstra a análise sérica de anticorpos IgE de pacientes alérgicos (P1 e P2), atópico (C1) e não alérgico (C2) dirigidos contra EBP de soja de todas as variedades.

Figura 36: Gráfico do ensaio de reatividade (ELISA) do extrato bruto protéico de todas as cultivares de soja parental e respectivas GMs contra soros de pacientes comprovadamente alérgicos P1 e P2, atópico C1 e não alérgico C2 à leguminosa. A análise estatística foi realizada entre todas as cultivares de soja e letras iguais demonstram similaridade de resultados de um mesmo dado para as cultivares diferentes, sendo $p < 0,05$.

A análise estatística dos dados não demonstrou diferença significativa entre os resultados das cultivares parentais e respectivas GMs, quando comparadas em relação à reatividade ao soro de paciente alérgico ou não alérgico. Porém, a soja 3.1 reagiu mais intensamente com o soro P2 se comparado à variedade 2.0, sem demonstrar a mesma diferença com a sua parental isogênica (3.0). Portanto, observa-se similaridade na resposta antigênica de ambas as cultivares parentais isogênicas e respectivas GMs aos soros de pacientes alérgicos, evidenciando que as cultivares de soja estudadas neste trabalho não podem ser consideradas mais alergênicas que as suas parentais isogênicas, apesar do número pequeno de pacientes estudados e dos falsos positivos apresentados.

Considerando que a soja tem cerca de 16 proteínas alergênicas (Batista e cols. 2007; L'Hocine & Boye, 2007; Gizzarelli e cols., 2006; Lee e cols, 2007^B) e que para o ensaio foi utilizado o EBP de cada cultivar, pode-se dizer que algumas delas foram os potenciais alérgenos responsáveis pela reatividade apresentada na Figura 36 com os soros de pacientes alérgicos à leguminosa.

É interessante lembrar que as proteínas presentes no EB estavam na sua forma nativa, sem alteração da conformação de suas estruturas tridimensionais, sendo possível sugerir que as ligações ocorridas obedeceram ao reconhecimento de um epítipo conformacional e/ou linear (Aalberse, 2000).

Dentre as proteínas cujos epítipos são conformacionais destacam-se a *Gly m Bd 28K*, cuja ligação ocorre no carboidrato (Hiemori e cols, 2000), inibidor do tipo

Kunitz (Quirce e cols, 2002), *Gly m 1.0101*, *Gly m 1.0102*, *Gly m 2* e *Gly m 3* (Rihs e cols, 1999).

O gráfico 37 demonstra o comportamento antigênico de frações dos EBP de todas as cultivares que foram submetidas à hidrólise enzimática. As alíquotas escolhidas para serem aplicadas no ensaio de reatividade foram as resultantes do momento inicial (momento zero), após trinta segundos e cinco minutos do processo de hidrólise com pepsina na concentração 13:1 (e:s), cujo processo foi discutido no item 5.2.2. Estes momentos da hidrólise foram escolhidos com o intuito de atingir não só os grandes alérgenos como também os de estabilidade intermediária.

Figura 37: Gráfico do ensaio de reatividade (ELISA) de frações remanescentes dos momentos zero, 30 segundos e 5 minutos da hidrólise enzimática com pepsina (13:1) do extrato bruto protéico das cultivares de soja parental 1.0 e 1.1 contra soros de pacientes comprovadamente alérgicos P1 e P2, atópico C1 e não alérgico C2 à leguminosa.

A análise estatística foi realizada entre as variedades de soja e momentos da hidrólise, sendo que letras iguais demonstram similaridade de resultados de um mesmo dado para as cultivares diferentes, sendo $p < 0,05$.

A análise estatística dos dados não demonstrou diferença significativa entre os resultados das cultivares 1.0 e 1.1 no que se refere ao momento inicial da hidrólise. Já nos momentos 30 segundos e 5 minutos as cultivares de soja diferiram quando submetidas aos soros P2, C1 e C2 no primeiro tempo e aos soros C1 e C2 no segundo.

Ao analisar o gráfico, é possível perceber que a diferença encontrada no momento trinta segundos aponta uma maior reatividade do soro P2 com a cultivar 1.0. No entanto, ao observar o eletroforegrama destas amostras (figura 24) não é

possível perceber nenhuma diferença significativa entre os géis que justifique esta resposta.

Com relação às diferenças ocorridas com os soros negativos, pode-se supor que as reações foram de carácter inespecífico.

Figura 38: Gráfico do ensaio de reatividade (ELISA) de frações remanescentes dos momentos zero, 30 segundos e 5 minutos da hidrólise enzimática com pepsina (13:1) do extrato bruto protéico das cultivares de soja parental 2.0 e 2.1 contra soros de pacientes comprovadamente alérgicos P1 e P2, atópico C1 e não alérgico C2 à leguminosa.

A análise estatística foi realizada entre as variedades de soja e momentos da hidrólise, sendo que letras iguais demonstram similaridade de resultados de um mesmo dado para as cultivares diferentes, sendo $p < 0,05$.

A análise estatística dos dados não demonstrou diferença significativa entre os resultados das cultivares 2.0 e 2.1 no que se refere aos momentos inicial e aos 5 minutos da hidrólise, porém, no momento 30 segundos as variedades de soja diferiram quando submetidas ao soro P2. Esta diferença ocorreu devido à ligação menos intensa da IgE presente no soro com a cultivar GM, se comparada à respectiva convencional. O eletroforegrama destas amostras (figura 25) demonstra bandas entre 10 e 14 KDa aparentemente mais intensas na cultivar parental isogênica (2.0) que podem ser as responsáveis por esta diferença da resposta do anticorpo às frações de soja. Além destas, é possível perceber uma banda de 20 KDa mais acentuada no momento 30 segundos do eletroforegrama da amostra parental isogênica, provavelmente representada pela porção básica da glicinina, considerada um grande alérgeno.

Figura 39: Gráfico do ensaio de reatividade (ELISA) de frações remanescentes dos momentos zero, 30 segundos e 5 minutos da hidrólise enzimática com pepsina (13:1) do extrato bruto protéico das cultivares de soja parental 3.0 e 3.1 contra soros de pacientes comprovadamente alérgicos P1 e P2, atópico C1 e não alérgico C2 à leguminosa. A análise estatística foi realizada entre as variedades de soja e momentos da hidrólise, sendo que letras iguais demonstram similaridade de resultados de um mesmo dado para as cultivares diferentes, sendo $p < 0,05$.

A análise estatística dos dados não demonstrou diferença significativa entre os resultados das variedades 3.0 e 3.1 no que se refere aos momentos 30 segundos e aos 5 minutos da hidrólise, porém, no momento inicial (Zero), as cultivares de soja diferiram quando submetidas ao soro P1. Esta diferença ocorreu devido à ligação menos intensa da IgE presente no soro com a cultivar GM se comparada à cultivar convencional.

O eletroforegrama da hidrólise enzimática do EBP da cultivar parental isogênica 3.0 (figura 26) demonstra uma banda de ~25 KDa que não está presente no gel da sua respectiva GM 3.1. Pode-se supor que esta banda esteja causando o aumento da reatividade do anticorpo presente no soro do paciente P1. Esta banda pode ser representada pela proteína *Gly m Bd 28 K*, *Gly m Bd 30 K* ou *Gly m 1*, que possuem bandas com pesos moleculares entre 26 e 34 KDa.

Os resultados obtidos com as hidrólises dos EBP de todas as cultivares GMs não apresentaram diferenças significativas que demonstrassem maior potencial alergênico quando comparadas às suas respectivas parentais isogênicas.

No entanto, a indicação de que frações remanescentes da hidrólise do EBP de cultivares de soja sejam reativas a soros de pacientes alérgicos à leguminosa demonstradas nos resultados do ELISA apresentados acima não foi encontrada em dados apresentados em artigos científicos encontrados na literatura, uma vez que os

mesmos utilizaram as frações protéicas já purificadas. A única referência encontrada foi a de FAO/WHO (2001), que relatou que as condições de digestão padronizadas para avaliar a estabilidade dos alérgenos presentes no EBP da soja produzem fragmentos que não são detectáveis por anticorpos monoclonais.

A escolha da utilização do EBP foi realizada, como foi dito anteriormente, devido à possibilidade das proteínas demonstrarem alterações de comportamento antigênico quando utilizadas sob condições diferentes de estrutura químico-física, ou seja, uma mesma proteína pode demonstrar alergenicidade quando submetida a soros de pacientes alérgicos se apresentada na forma nativa, mas não na forma purificada, ou vice-versa (Vieths e cols, 1999; Metcalfe e cols., 1996). Além disso, a análise da digestibilidade do EBP permite o acesso ao comportamento de hidrólise enzimática deste complexo protéico em sua forma mais próxima àquela presente na matriz.

É interessante atentar ao detalhe de que neste ensaio as proteínas foram hidrolisadas e sua estrutura tridimensional foi alterada, sendo possível sugerir que as ligações ocorridas obedeceram ao reconhecimento de epítomos lineares (Aalberse, 2000), uma vez que foram submetidas à fervura e a uma condição dissociante com SDS presente no tampão de amostra (Laemmli, 1970).

De acordo com Yamauchi e cols. (1991), o aquecimento afeta as propriedades imunológicas da glicinina, de modo que, quando é aquecida em temperatura de 65°C por 30 minutos mantém sua capacidade antigênica, porém entre 70 e 90°C ocorre a destruição da estrutura quaternária e possivelmente a alteração das estruturas terciária e secundária das subunidades individuais, levando à perda desta propriedade. No entanto, Ywabuchi & Shibasaki (1981) demonstraram através de métodos imunológicos que mesmo após 5 minutos em temperatura de fervura, as propriedades antigênicas se mantiveram.

Lee e cols (2007^B) realizaram teste de imunoreatividade (ELISA) com fragmentos remanescentes de hidrólise enzimática de glicinina purificada e encontraram interação muito fraca de uma fração de 20 KDa com soro de 6 pacientes comprovadamente alérgicos à soja, porém não constatarem interação com fragmentos de peptídeos menores de 10 KDa. Concluíram então que a imunoreatividade da glicinina íntegra da soja se deve provavelmente à presença de epítomos conformacionais (descontínuos) na molécula porque reações com epítomos lineares como os citados acima não foi significativa.

Avaliação da reatividade de anticorpos IgE presente em soros de pacientes alérgicos ao EBP das seis cultivares de soja por teste imunológico do tipo Western Blotting

Um ensaio de imunoreatividade *in vitro* do tipo western blotting foi realizado com o intuito de confirmar os dados obtidos com o teste ELISA.

O ensaio *in vitro* foi realizado em duplicata com os soros dos pacientes P3, C1 e C2, sendo que não foi possível a visualização de bandas nos testes com os pacientes controles atópico (C1) e não alérgico (C2).

O eletroforegrama identificando as seis cultivares de soja parentais e suas respectivas GMs juntamente com a membrana contendo os *blots* reativos ao soro de paciente alérgico estão representados na Figura 40.

Figura 40: **A** - Eletroforegrama SDS-PAGE dos EBP das seis cultivares de soja com cerca de 30 µg de proteína por amostra em gel de 12 % de acrilamida. 1,0. Jataí; 1,1. Silvânia RR; 2,0. MG Conquista; 2,1. Valiosa RR; 3,0. Celeste; 3,1. Baliza RR. **B** - Imunoblotting de cultivares de soja reconhecidas por soro de paciente alérgico à soja revelado por anticorpo monoclonal secundário anti IgE humana em rato conjugado com fosfatase alcalina.

A reatividade do soro ao EBP de todas as cultivares demonstra ligação da IgE com bandas com PM de ~50 Kda e ~34Kda, sugerindo o reconhecimento de dois grandes alérgenos presentes na soja conhecidos como a subunidade β - da β -conglucina com pesos entre 42-52 KDa e a *Gly Bd* 30K, que possui banda com PM de 34 KDa.

Neste ensaio as proteínas são submetidas previamente a uma eletroforese unidimensional em condição desnaturante pela presença de dodecil sulfato de sódio

(Laemmli, 1970), viabilizando a alteração da conformação de suas estruturas tridimensionais. Desta forma, é possível sugerir que as ligações ocorridas obedeceram ao reconhecimento de epítopos lineares (Aalberse, 2000).

Apesar da ausência do teste estatístico, os resultados demonstrados não indicam diferença de reatividade do soro de paciente alérgico entre as cultivares relacionadas.

O resultado encontrado neste ensaio vai de encontro ao obtido por Batista e cols (2005). Estes autores realizaram testes de imunoreatividade (western blotting) utilizando EBP de soja e milho parentais isogênicos e suas respectivas GMs dirigidos contra soros de crianças e adultos comprovadamente alérgicos. Os resultados não expressaram diferença da reatividade entre as amostras parentais isogênicas e respectivas GMs.

Yum e cols (2005) realizaram ensaio imunológico do tipo western blotting com pool de soros de crianças sensibilizadas às proteínas da soja dirigidos contra EBP e frações globulínicas da leguminosa convencional e outra GM e encontraram reatividade diferente entre as amostras. Ambas as amostras apresentaram reatividade com bandas de ~20-25, ~30-36 e ~50-65 KDAs. A convencional mostrou forte ligação da IgE com uma banda cujo PM é cerca de ~30-36 KDa, provavelmente identificada como a *Gly m 1*, cujo PM é de ~34 KDa. Já a soja GM apresentou forte ligação da IgE com uma proteína de ~25 KDa. No entanto, os próprios autores mencionam que as amostras de soja utilizadas foram cultivadas sob diferentes condições ambientais.

Neste estudo de comparação de grãos de soja GMs com suas respectivas parentais isogênicas não foi possível identificar dados que permitissem considerar os produtos transgênicos como inseguros para o consumo humano e animal, sob o aspecto de alergenicidade. No entanto, apesar dos resultados apresentados, é de suma importância a busca por novas possibilidades de investigação na área de alergenicidade com a utilização de um número maior de pacientes e com os soros destes dirigido às frações purificadas potencialmente alergênicas da leguminosa como a 7S e 11S, além dos remanescentes de hidrólise enzimática das mesmas.

6 – Conclusões

A elaboração deste trabalho forneceu subsídios para o argumento sobre a segurança da soja para o consumo humano e animal e permitiu a obtenção das seguintes conclusões:

1. a comparação dos dados encontrados com as análises de composição química dos grãos das três cultivares de soja GM em relação às suas respectivas parentais isogênicas demonstrou valores significativamente diferentes para os teores de proteínas, fibras insolúveis, ácido fítico e isoflavonas, porém não indica alteração de equivalência substancial entre as amostras;

2. os dados de macronutrientes encontrados com as análises de composição química dos grãos das seis cultivares de soja apresentaram-se, em geral, dentro de uma faixa normal de variação encontrada em trabalhos científicos realizados no Brasil e no exterior;

3. as diferenças encontradas nas amostras GMs em relação às suas parentais isogênicas não as tornam inseguras para o consumo humano e animal;

4. os períodos de estabilidade *in vitro* demonstrados por bandas protéicas de cultivares GMs resultante do processo de hidrólises enzimática não apresentaram diferenças significativas que representassem maior potencial alergênico quando comparadas às suas respectivas parentais isogênicas;

5. a reatividade dos soros de pacientes alérgicos a extratos brutos das cultivares GM foram similares às suas respectivas parentais isogênicas, reforçando a manutenção da capacidade alergênica entre as cultivares de soja analisadas.

7. Referências Bibliográficas

- AALBERSE, R.C. Structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p.228-238, 2000.
- ADACHI, M.; YASUYUKI, T.; GIDAMIS, A B.; MIKAMI, B.; UTSUMI, S. Cristal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. **Journal of molecular biology**, v. 305, p.291 – 305, 2001.
- ALTMANN, F. The role of protein glycosilation in Allergy. **International Archives of allergy and Immunology**, v. 142, p.99-115, 2007.
- ANTO, J.M.; SUNYER, J.; RODRIGUEZ-ROISIN, R.; SUAREZ-CERVERA, M.; VAZQUEZ, L. Community outbreaks of asthma associated with inhalation of soybean dust. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p.1097-102, 1989.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 13. Ed., Washington, AOAC, 1995.
- AOAC. Official Methods of Analysis, chapter 31, p.1, 1995; **Journal of AOAC** 14, 529,1931.
- AULRICH, K.; BOHME,H.; DAENICKE, R.; HALLE, I.; FLACHOWSKY, G. Novel feeds – a review of experiments at our Institute. **Food Research International**, v. 35, p. 285-293, 2002.
- VERY, Dennis T. Why we need food biotechnology. **Food Technology**, v.54, p. 132, 2000.
- AWAZUHARA H, KAWAI H, MARUCHI N. Major allergens in soybean and clinical significance of IgG4 antibodies investigated by IgE- and IgG4-immunoblotting with sera from soybean-sensitive patients. **Clinical and Experimental Allergy** , v. 27, p. 325–32, 1997.

- BATISTA, R.; NUNES, N.; CARMO, M.; CARDOSO, C.; SÃO JOSE',H.; ALMEIDA, A B.; MANIQUE, A; BENTO, L.; RICARDO, C.P.; OLIVEIRA, M.M. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, p. 403-10, 2005.
- BATISTA, R.; MARTINS,I.; JENÖ,P.; RICARDO, C.P.; OLIVEIRA, M.M. A proteomic study to identify soya allergens- The human response to transgenic versus non-transgenic soya samples. **International archives at allergy and immunology**, v. 38, p. 29-38, 2007.
- ^ABELÉM, M. A F.; FELBERG, E.W.I.; GONÇALVES, E.B.; CABRAL, L.C.; CARVALHO, J.L.V. de; SUNDFELD, E.; NUTTI; M.R. Equivalência substancial da composição de alimentos derivados de plantas geneticamente modificadas (PGM) – Procedimentos propostos para o Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.14, p.140-150, 2000.
- ^BBELÉM, M. A F.; FELBERG, E.W.I.; SAMPAIO, ; NUTTI; M.R. Biossegurança de alimentos derivados da biotecnologia rDNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** , v.18, p.34-40, 2000.
- BENNET, J.O.; KRISHNAN, A H.; WIEBOLD, W.J.; KRISHNAN, H. B. Positional effect on protein and oil content and composition of soybeans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6882-6886, 2003.
- BENNINK, M.R. Fiber analysis. *In*: Nielsen, S.S. - **Introdution of the chemical analysis of foods**. Jones and Bartlett Publishers. Boston. p.169-180,1994.
- BEYER, K.; GRISHINA, G.; BARDINA, L. GRISHIN, A.; SAMPSON, A.H. Identification o fan 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.110, p. 517-523, 2002.

- BITTENCOURT, A L. **Determinação dos componentes alergênicos da proteína isolada de soja.** São Paulo, 2002. 99p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- BOCK, S.A; SAMPSON, H.A; ATKINS, F.M.; ZEIGER, R.S.; LEHRER, S.; SACHS, M. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. **Journal of Allergy of Clinical Immunology**, v. 82 (6), p. 986-97, 1988.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BREITENEDER, H.; MILLS, E.N.C. Plant food allergen- structural and functional aspects of allergenicity. **Biotechnology advances**, v. 23, p. 395-399, 2005.
- BREITENEDER, H.; RADAUER, C. A classification of plant food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, p.821-830, 2004.
- BROOKES, G. & BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: socio-economic and environmental effects in the first ten years of commercial use. **AgBioForum** v. 9, supl. 3, p. 139 – 151, 2005.
- BROUN, P.; GETTNER, S.; SOMERVILLE, C. genetic engineering of plant lipids. **Annual review of nutrition** , v.19, p.197–216, 1999.
- BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; ORTOLANI, C.; AAS, K.; BINDSLEV-JENSEN, C.; BJORKSTEN, B.; MONERET-VAUTRIN, D. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. **Allergy**, v. 50 (8), p. 623-35, 1995.

- BUENO, L.C.S.; MENDES, A. N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento Genético de Plantas: princípios e procedimentos.**, Lavras, Editora UFLA, 282p., 2001.
- BURKS, AW; BROOKS, JR; SAMPSON, HÁ. Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 81, p. 1135-1142, 1988.
- CARRAO-PANIZZI, M.C.; KITAMURA, K.; BELEIA, A.D.; OLIVEIRA, M.C.N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybeans cultivars. **Breeding Science**, v. 48, p. 409-413, 1998.
- CHAKRABORTY, S.; CHAKRABORTY, N.; DATTA A Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. **Proc National Academic Science of USA**, v. 97 (7), p. 3724-3729, 2000.
- CHASSY, B.M. Food safety evaluation of crops produced through biotechnology. **Journal of American Collective Nutrition**, v. 21 (suppl.), n. 3, p.166-173, 2002.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Editora Acribia, Espanha, 1989.
- CINTRA, P. **Parâmetros nutricionais e hematológicos de ratos alimentados com soja (*Glycine max* L.) geneticamente modificada**. São Paulo, 2005. 115p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- CLUGSTON, G & SMITH, T.E. Global nutrition problems and novel foods. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.11, n. 6(suppl.), p. 100-111, 2002.
- COCKBURN, A. Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. **Journal of Biotechnology**, v. 98, p. 79-106, 2002.
- COSTA, João. **Dicionário Rural do Brasil**. Editora Campus, Rio de Janeiro, p. 427, 2003.
- CORUZZI, G.; LAST, R. Amino acids. *In* BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. EUA: Ed. American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 8, p. 358 – 410.
- CROMWELL, G.L; LINDEMANN, M.D.; RANDOLPH, J.H.; PARKER, G.R.; COFFEY, R.D.; LAURENT, K.M.; ARMSTRONG, C.L.; MIKEL, W.B.; STANISIEWSKI, E.P.; HARTNELL, G.F. Soybean meal from Roundup Ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing swine. **Journal of Animal Science** , v.80, p.708-715, 2002.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites) *in* BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. EUA: Ed. American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 24, p. 1250 – 1318.
- CROWELL, D.N.; JOHN, N.E.; RUSSEL, D.; AMASINO, R.M. Characterization of a stress induced, developmentally regulated gene family from soybean. **Plant molecular Biology**, v. 18 (3), p. 459-66, 1992.
- DE LEO, F.; GALLERANI, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 489-496, 2002.

- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DELANNAY, X.; BAUMAN, T.T; BEIGHLEY, D.H.; BUETTNER, M.J.; COBLE, H.D.; DE FELICE, M.S.; DERTING, C.W.; DIEDRICK, T.J.; GRIFFIN, J.L.; HAGOOD, E.S.; HANCOCK, F.G.; HART, S.E.; LaVALLEE, B.J.; LOUX, M.M.; LUESCHEN, W.E.; MATSON, K.W.; MOOTS, C.K.; MURDOCK, E.; NICKELL, A D.; OWEN, M.D.K.; PASCHAL II, E.H.; PROCHASKA, L.M.; RAYMOND, P.J.; REYNOLDS, D.B.; RHODES, W.K.; ROETH, F.W.; SPRANKLE, P.L.; TAROCHIONE, L.J.; TINIUS, C.N.; WALKER, R.H.; WAX, L.M.; WEIGELT, H.D.; PADGETTE, S.R. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate. **Crop Science**, v.35, p. 1461-1467, 1995.
- DELLAPENNA, D. Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health. **Science**, v. 285, p.375-379, 1999.
- DORNBOS, J.R.; MULLEN, R.E. Soybean Seed Protein and Oil Contents and Fatty Acid Composition Adjustments by Drought and Temperature, **Journal of American Oil Chemical Society**, v.69, p.228, 1992.
- DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q.; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D.; WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. **Nature Biotechnology** v. 14, p. 494 – 498, 1996.
- 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** V. 51, p. 340-344, 2003.

- EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. **Food and Chemical Toxicology** , v. 46, p.2-70, 2008.
- FAO/WHO – FOOD, NUTRITION AND AGRICULTURE. **Evaluation of allergenicity of genetically modified foods *in*: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultaion on allergenicity of foods derived from biotechnology**, Roma, 2001.
- FALK, M.C; CHASSY, M.B.; HARLANDER, S.K.; HOBAN, T.J.; McGLOUGHLIN, M.N.; AKHLAGHI, A R. Food Biotechnology: Benefits and Concerns. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1384 – 1390, 2002.
- FILISSETTE-COZZI, T.M.C.C. & LAJOLO, F.M. - Fibra alimentar insolúvel, solúvel em alimentos braisleiros. **Revista Farm. Bioquim. Universidade de São Paulo**, v. 27, supl. 1, p.83-99,1991.
- FILISSETTE-COZZI, T.M.C.C. Fibra alimentar: definição e métodos analíticos *in*: LAJOLO, F.M.& MENEZES, E.W. **Carboidratos em alimentos Regionales Iberoamericanos**. Editora da Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.
- FÖTISCH, K.; VIETHS, S. N- and O- linked oligossacharides of allergenic glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, v. 18 (5); p.373-90, 2001.
- FU, T.J; ABBOTT, U.R.; HATZOS, C. Digestibility Of Food Allergens And Nonallergenic Proteins In Simulated Gastric Fluid And Simulated Intestinal Fluid – A Comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.7154-7160, 2002.
- FUCHS, R.L.; ASTWOOD, J.D. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. **Food Technology**, p.83-88, 1996.

- GARCIA, M.C.; TORRE, M.; MARINA, M.L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 4, p. 361-391, 1997.
- GATEHOUSE, A. M.R.; NORTON, E.; DAVISON, G.M.; BABBÉ, S.M.; NEWELL, C.A; GATEHOUSE, J.A Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of insect Physiology**, v. 45, p.545-558, 1999.
- GENOVESE, M.I. HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties. **Food Science Technology International**, v.11, p.205-211, 2005.
- GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.86-93, 2001.
- GIBSON, L.R; MULLEN, R.E. Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. **Journal of AOCS** ,v. 73, p. 733-737, 1996.
- GIORA, C.G.B. **Avaliação *in vivo* da qualidade protéica da soja geneticamente modificada**. São Paulo, 2004. 71p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- GIZZARELLI, F.; CORINTI, S.; BARLETTA, B.; IACOVACCI, P.; BRUNETTO, B.; BUTTERONI, C.; AFFERNI,C.; ONORI, R.; MIRAGLIA,M.; PANZINI,G.; FELICE, G.; TINGHINO,R. Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. **Clinical and experimental allergy**, v. 36, p.238-248, 2005.

- GONG, Y.; WEBER, P.F. RICHARDS, M.P. Characterizing quality of rendered duck fat compared to others fats and oils. **Journal of Food Quality**, v. 30, p. 169-186, 2007.
- GOODMAN, R.E.; LEACH, J. N. Assessing the allergenicity of proteins introduced into genetically modified crops using specific human IgE Assays. **Journal of AOAC international**, v. 87, supl. 6, p.1423-1432, 2004.
- GÖRG, A. **2-D Electrophoresis: principles and methods**. Edition AC (80-6429-60). Uppsala, UK : Amersham Biosciences Ltd GE Healthcare, 2004. Manual do fabricante. 162p.
- GRIESHOP, C.M.; FAHEY, G.C., Jr. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China and the United States. **Journal of agricultural and Food chemistry**, v. 49 p. 2669-2673, 2001.
- GRIESHOP, C.M.; KADZERE, C.T.; CLAPPER, G.M.; FLICKINGER, E.A; BAUER, L.L.; FRAZIER, R.L.; FAHEY, G.C., Jr. Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. **Journal of agricultural and Food chemistry**, v. 51 p. 7684-7691, 2003.
- HAMMOND, B. G.; VICINI, J.L.; HARTNELL, G.F; NAYLOR, M.W.; KNIGHT, C.D.; ROBINSON, E.H.; FUCHS, R.L.; PADGETTE, S.R. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. **Journal of Nutrition** , v. 126, p. 717-727, 1996.
- HANASH, S.M. Two-dimensional gel electrophoresis *in* **Gel Electrophoresis of proteins** . 3^aed. Oxford University Press, 1998.
- HARRIGAN, G.G.; RIDLEY, W.P.; RIORDAN, S.G.; NEMETH, M.A ; SORBET, R.; TRUJILLO, W.A; BREEZE, M.; SCHNEIDER, R.W. Chemical

- Composition of Glyphosate-Tolerant Soybean 40-3-2 Grown in Europe Remains Equivalent with That of Conventional Soybean (*Glycine max* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6160-6168, 2007.
- HARRISON, L.A; BAILEY, M.R.; NAYLOR, M.W.; REAM, J.E.; HAMMOND, B.G.; NIDA, D.L.; BURNETTE, B.L.; NICKSON, T.E.; MITSKY, T.A; TAYLOR, M.L.; FUCHS, R.L.; PADGETTE, S.R. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5 enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium sp.* strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. **Journal of Nutrition**, v. 126, p.728-740, 1996.
- HASHIMOTO, W.; MOMMA, K.; YOON, H.J.; OZAWA, S.; OHKAWA, Y.; ISHIGE, T.; KITO, M.; UTSUMI, S.; MURATA, K. Safety Assessment Of Transgenic Potatoes With Soybean Glycinin By Feeding Studies In Rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 63 (11), 1942-1946, 1999.
- HELDT, H.W. **Plant biochemistry & molecular biology**. Institute of plant biochemistry, Ed. Oxford, Inglaterra, 1997.
- HELM, R.M.; COCKRELL, G.; CONNAUGHTON, C.; SAMPSON, H.A; BANNON, G.A; BEILINSON, V.; LIVINGSTONE, D.; NIELSEN, N.C.; BURKS, A W. A soybean G2 glycinin allergen. Identification and characterization. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, p. 205-12, 2000.
- HELM, R.M.; FURUTA, G.T.; STANLEY, S.; YE, J.; COCKRELL, G.; CONNAUGHTON, C.; SIMPSON, P.; BANNON, G.A; BURKS, W. A

- neonatal swine model for peanut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. 136-142, 2002.
- HERMAN, E.M.; HELM, R.M.; JUNG, R.; KINNEY, A.J. Genetic Modification Removes an Immuno dominant Allergy from Soybean. **Plant Physiology** 132, 36-43, 2003
- HIEMORI, M.; BANDO, N.; OGAWA, T.; SHIMADA, H.; TSUJI, H.; YAMANISHI, R.; TERAOKA, J. Occurrence of IgE antibody-recognizing N-linked glycan moiety of a soybean allergen, Gly m Bd 28 K. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 122, p. 238-45, 2000.
- HOLM, P.B.; KRISTIANSEN, K.N.; PEDERSEN, H.B. Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. **Journal of Nutrition**, v. 132, p.514S-516S, 2002.
- HORNER, H.T.; CERVANTES-MARTINEZ, T.; HEALY, R.; REDDY, M.B.; DEARDORFF, B.L.; BAILEY, T.B.; AL-WAHSH, I.; MASSEY, L.K.; PALMER, R.G. Oxalate and Phytate Concentrations in Seeds of Soybean Cultivars [Glycine max (L.) Merr.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7870-7877, 2005.
- HOTTA, M. The sustainable contribution of fisheries to food security in the Asia and Pacific Regions: Regional synthesis *in*: Sustainable contribution of fisheries to food security, **Food and Agriculture Organization**, 2000.
- HOU, D. H. & CHANG, S.K. Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 52, 3792-3800, 2004.
- IWABUCHI, S; SHIBASAKI, K. **Agricultural Biology Chemistry**., v. 45, p. 1365, 1981.

- ^AIWABUCHI, S.; YAMAUCHI, F. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 200-205, 1987.
- ^BIWABUCHI, S.; YAMAUCHI, F. Eletrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 205-209, 1987.
- JAMES, C. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2003. ISAAA Briefs No. 33. ISAAA: Ithaca, NY. <http://www.isaaa.org/> Acessado em 27/04/2008.
- JONES, J.L. Genetic engineering of crops: its relevance to the food industry. **Trends in Food Science Technology**, v.3, p. 54-9, 1992.
- KARR-LILIENTHAL, L.K.; GRIESHOP, C.M.; MERCHEN, N.R.; MAHAN, D.C.; FAHEY, G.C. Chemical composition and protein quality comparisons of soybeans and soybean meals from five leading soybean-producing countries. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p.6193-6199, 2004.
- KARR-LILIENTHAL, L.K.; GRIESHOP, C.M.; SPEARS, J.K.; FAHEY, G.C. Amino Acid, Carbohydrate, and Fat Composition of Soybean Meals Prepared at 55 Commercial U.S. Soybean Processing Plants. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p.2146-2150, 2005.
- KAO, T.H.; WU, W.M.; HUNG, C.F.; WU, W.B.; CHEN, B.H. Anti-inflammatory Effects of Isoflavone Powder Produced from Soybean Cake, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 55, p. 11068–11079, 2007.

- KHUSH, G.S. Challenges for meeting the global food and nutrient needs in the new millennium. **Proceedings of the Nutrition Society** , v. 60, p.15-26, 2001.
- KING, T.P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D.G.; PLATTS-MILLS, T.A E.; THOMAS, W. Allergen Nomenclature. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 105, p. 224-233, 1994.
- KRISHNAN, H.B. Characterization of a soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science**, v. 160, p.979-986, 2001.
- 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.503-532, 2001.
- KUIPER, H.A; KLETER, G.A; NOTEBORN, H.P.J.M.; KOK, E.J. Substantial equivalence – an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? **Toxicology** , v. 181-182, p. 427-431, 2002.
- LACK,G. New developments in food allergy: old questions remain. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 114, p.127-130, 2004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, p.680-685, 1970.
- LAPPÉ, M.A; BAILEY, B.; CHILDRESS, C.; SETCHELL, K. Alterations in Clinically Important Phytoestrogens in Genetically Modified, Herbicide-Tolerant Soybeans. **Journal of Medicinal Food**, v.1, n. 4, 1999.
- ^A LEE, S.H; PARK, H.J; CHUN, H.K; CHO, S.Y; JUNG, H.J; CHO, S.M; KIM, D.Y; KANG, M.S.; LILLEHOJ, H.S. Dietary phytic acid improves serum and

- hepatic lipid levels in age ICR mice fed a high-cholesterol diet. **Nutrition Research**, v. 27, p. 505-510, 2007.
- ^B LEE, W; KEUM, H.; LEE, J.; SUNG, E.; CHUNG, H.; LEE, I. OH, S. Allergenicity of proteolytic hydrolysates of the soybean 11S globulin. **Journal of food science**, v. 72, n.3, p.168-172, 2007.
- L'HOCINE, L.; BOYE, J.I. Allergenicity of soybean: New developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, p.127-143, 2007.
- LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 34, p. 31-67, 1994.
- LIPTON, M. Challenges to meet: food and nutrition security in the new millennium. **Proceedings of the Nutrition Society** , v. 60, p.203-214, 2001.
- LÖNNERDAL, B. Genetically modified plants for improves trace element nutrition. **Journal of Nutrition** v. 133, p. 1490S – 1493S, 2003.
- LOZA-RUBIO, E.; GÓMEZ-LIM, M.A Producción de vacunas y otros Compuestos biológicos en plantas transgénicas, **Veterinaria México**, v. 37 (4), p.441-455, 2006.
- LYDON, J.; DUKE, S.O. Glyphosate Induction of Elevated Levels of Hydroxybenzoic Acids in Higher Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 813-818, 1988.
- MAO, L.; LEE, K.; ERBERSDOBLER, H.F. Effects of heat treatment on lysine in soya protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 307-309, 1993.

- MADDEN, D. **Food biotechnology and introduction**. International Life Institute and ILSI Europe, Bélgica, p.38, 1995.
- MARTIN, C.A ; VISENTAINER, J.V.; OLIVEIRA, A N.; OLIVEIRA, C.C.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Fatty acid contents of Brazilian soybean oils with emphasis com *trans* fatty acids. **Journal of Brazilian Chemical Society** , v. 19,n.1, p.117-122, 2008.
- METCALFE, D.D.; ASTWOOD, J.D.; TOWNSEND, R.; SAMPSON, H.Á.; TAYLOR, S.L.; FUCHS, R.L.. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v.36 (suppl.), p. 5165-5186, 1996.
- MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70 (suppl.), p. 439-450, 1999.
- MILLS, E.N.C; MARIGHETO, N.A; WELLNER, N.; FAIRHURST, S.A; JENKINS, J.A; MANNA, R. BELTON, P.S. Thermally induced structural changes in glycinin, the 11S globulin of soya bean (*Glycine max*)—an in situ spectroscopic study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1648, p. 105– 114, 2003.
- MILLS, E.N.C.; JENKINS, J.A; ALCOCK, M.J.C.; SHEWRY, P.R. Structural, biological and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, p. 379-407, 2004.
- MIURA, E.M.Y.; BINOTTI, M.A.R.; CAMARGO, D.S.; MIZUBUTI, I.Y.; IDA, E.I. Avaliação biológica de linhagem de soja com baixa atividade de inibidores de tripsina. **Ver. Bras. Zootec.** , Viçosa, v.29, n.6, p.2000.

- MOFFAT, A. S. Finding New ways to Protect Drought-Stricken Plants. **Science**, v. 296, p. 1226-1229, 2002.
- MOREIRA, N.X.; CURI, R.; PADOVESE, R.; MANCINI FILHO, J. Incorporation of dietary trans mono-insaturated fatty acids into tissues of Wiker 256 tumor-bearing rats. **Brazilian Journal of molecular Biology Research**, v.34, n.4, p.501-508, 2001.
- MÜNTZ, K. Globulins from legume seeds: structure and function during storage and reactivation *in*: **Plant proteins from European crops**, Ed. Springer, INRA, FECS, Alemanha, 1998.
- NORDLEE, Julie; et al. Identification of a Brazil-Nut Allergen in transgenic soybeans. **New England Journal of Medicine**, vol.334, n.11,p.688-692, 1996.
- NOVAK, W.K.; HASLBERGER, A. G. Substantial Equivalence of Antinutrients and Inherent Plant Toxins in Genetically Modified Novel Foods. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p.473-483, 2000.
- OECD – ORGANISATION ECONOMIC CO-OPERATION OF DEVELOPMENT. **Safety evaluation of foods derived from modern biotechnology, concepts and principles**. Paris, p. 74, 1993. Disponível em: <http://www.oecd.org/subject/biotech/>. Consultado em 11/04/2008.
- OGAWA, T.; BANDO, N.; TSUJI, H.; OKAJIMA, H.; NISHIKAWA, K.; SASAOKA, K. Investigation Of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. **Journal of Nutrition and Science Vitaminology**, v. 37, p.555-65, 1991.

- OGAWA, T.; BANDO, N.; TSUJI, H.; NISHIKAWA, K.; KITAMURA, K. Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59 (5), p.831-3, 1995.
- PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LaVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science** , v. 35, p.1451-1461, 1995.
- 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**, v.126, n.3, p.702-716, 1996.
- PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A A ; SCAMPARINI, A R.P. Conversão de Malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 22, n° 2, p.130-135, 2002.
- PENG, J.; RICHARDS, D.E.; HARTLEY, N.M.; MURPHY, G.P.; DEVOS, K.M.; FLINTHAM, J.E.; BEALES, J.; FISH, L.J.; WORLAND, A.J.; PELICA, F.; SUDHAKART, D.; CHRISTOU, P.; SNAPE, J.W.; GALE, M.D.; HARBERD, N.P. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. **Nature**, v. 400, p.256-261, 1999.
- PLINE, W.A; WU, J.; HATZIOS, K. Effects of Temperature and Chemical Additives on the Response of Transgenic Herbicide-Resistant Soybeans to

- Glufosinate and Glyphosate Applications. **Pesticide Biochemistry and Physiology** , v. 65, p.119–131, 1999.
- PLINE, W.A; WILCUT, J.W.; DUKE, S.O.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, R.
Tolerance and Accumulation of Shikimic Acid in Response to Glyphosate Applications in Glyphosate-Resistant and Nonglyphosate-Resistant Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 506-512, 2002.
- POULSEN, L.K. In vivo and in vitro techniques to determine the biological activity of food allergens. **Journal of Chromatography B**, v. 756, p. 41-55, 2001.
- PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F. DEVRIES, J.W.; FURDA, I.
Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and products. Collaborative study. **Journal of AOAC**, 75(2)360-367,1992.
- PROSKY, L.; ASP, N.G.; FURDA, I.; DEVRIES, J.W.; SCHWEIZER, T.S.; HARLAND, B.F. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods, and food products. Interlaboratory study. **Journal of AOAC**, v. 71, p.1017-1023,1988.
- QUIRCE, S.; POLO, F.; FIGUEREDO, E.; GONZALEZ, R.; SASTRE, J.
Occupational asthma caused by soybean flour in bakers-differences with soybean-induced epidemic asthma. **Clinical Experimental Allergy** , v. 30 (6), p.839-46, 2000.
- QUIRCE, S.; FERNANDEZ-NIETO, M.; POLO, F.; SASTRE, J. Soybean trypsin inhibitor is an occupational inhalant allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** , v. 109 (1), p.178, 2002.

- RACKIS, J.J. Biological and physiological factors in soybeans. **Journal of American Oil chemistry Society**, v. 51, p.161, 1974.
- REDDY, K.N. Glyphosate-resistant soybean as a weed management tool: opportunities and challenges. **Weed Biology and management**, v. 1, p. 193 – 202, 2001.
- RIHS, H.P.; CHEN, Z.; RUEFF, E.; PETERSEN, A; ROZYNEK, P.; HEIMANN, H.; BAUR, X. IgE binding of the recombinant allergen soybean profiling (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, p.1293-301, 1999.
- ROBINSON, S; SCOTT, N.; GACKLE, A. Gene technology and future foods. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.9 (suppl.), p.113-121, 2000.
- ROGERS, S.G. Biotechnology and the soybean. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68 (suppl.), p.1330-2, 1998.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**, editora Mosby, 6ª edição, 479 p., 2001.
- SANDBERG, A. S.; AHDERINNE, R. – HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates in foods and intestinal contents. **Journal of Food Science**, v. 51, p.547-50, 1986.
- SATHE, S.K.; KSHIRSAGAR, H.H.; KENNETH, H.R. Advances in seed protein research: a perspective on seed allergens, **Journal of food science**, v. 70, n°6, p.93-120, 2005.
- SELL, S.; BERKOWER, I.; MAX, E.E. **immunology, Immunopathology & Immunity**. 5ª edição. Editora Appleton & Lange, Connecticut, USA, 1014 p., 1996.

- SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B.E.; BRASHEAR, W.T.; KIRSCHNER, A.S.; CASSIDY, A. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **Journal of Nutrition**, v. 131, 1362S-1375S, 2001.
- SHANER, D.L. Herbicide resistance: where are we? How did we get here? Where are we going? **Weed Technology**, v. 9, p.850-856, 1995.
- SHARMA, H.C.; CROUCH, J.H.; SHARMA, K.K.; SEETHARAMA, N.; HASH, C.T. Applications of biotechnology for crop improvement: aspects and constraints. **Plant Science**, v.163, p.381-395, 2002.
- SHEWRY, P.R.; NAPLER, J.A.; TATHAM, A S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The plant cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.
- SHIBASAKI, M.; SUZUKI, S.; TAJIMA, S.; NEMOTO, H.; KUROUME, T. Alergenicity of major component proteins of soybean. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 61, p. 441-448, 1980.
- SINAGAWA-GARCIA, S.R.; RASCÓN-CRUZ, Q.; VALDEZ-ORTIZ, A.; MEDINA-GODOY, S.; ESCOBAR-GUTIÉRREZ, A.; PAREDES-LÓPEZ O. Safety assessment by in vitro digestibility and allergenicity of genetically modified maize with na amaranth 11S globulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.2709-2714, 2004.
- SILVA, R.C.; GIOIELLI, L.A Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.
- SILVANOVICH, A ; NEMETH, M.A ;SONG, P.; HERMAN, R.; TAGLIANI, L.; BANNON, G.A .The value of short amino acid sequence matches for

- prediction of protein allergenicity. **Toxicological sciences**, v. 90, nº 1, p. 252-258, 2006.
- SONG, T.T; HENDRICH, S.; MURPHY, P.A. Estrogenic activity of glycitein a soy isoflavone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.1607–1610, 1999.
- SOUZA JUNIOR, M.T.; MARTINS, N.F. Predição do potencial de alergenicidade em OGMs – estudo de caso. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p.10-15, 2003.
- SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v.39, p.1412-1415, 1967.
- STEINRÜCKEN, H.C.; AMRHEIN. N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid – 3- phosphate synthase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 94, nº4, p. 1207-1212, 1980.
- STEPHENS, L.; RADENBERG, T.; THIEL, U.; VOGEL, G.; KHOO, K-H; JACKSON, TR.; HAWKINS, PT.; MAYR, GW. The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate (s) and biddiphosphoinositol tetrakisphosphate (s). **Journal of Biological Chemistry**, 268, p.4009-4015, 1993.
- TAYLOR, N.B.; FUCHS, R.L.; McDONALD, J.; SHARIFF, A R.; PADGETTE, S.R. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p.4469-4473, 1999.

- THANH, VH; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds: a straightforward fractionation and their characterization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 24, p. 1117-1121, 1976.
- THANH, VH; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds: subunit structure of β -conglycinin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.26, 1979.
- THOMAS, K; AALBERS, M; BANNON, GA; BARTELS, M; DEARMAN, RJ; ESDAILE, DJ; FU, TJ; GLATT, CM; HADFIELD, N; HATZOS, C; HEFLE, SL; HEYLINGS, JR; GOODMAN, RE; MACINTOSH, SC; RICE, EA; PRIVALLE, LS; ; STEINER, HY; TESHIMA, R; VAN REE, R; WOOLHISER, M; ZAWODNY, J A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.39, p.87-98, 2004.
- TSUKAMOTO, C., SHIMADA, S., IGITA, K., KUDOU, S., KOKUBUN, M., OKUBO, K., KITAMURA, K. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds: Changes in Isoflavones, Saponins, and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p.1184-1192, 1995.
- TURAN, S.; KARABULUT, I.; VURAL, H. Influence of *sn*-1,3-lipase-catalysed interesterification on the oxidative stability of soybean oil-based structured lipids. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 87, p. 90 -97, 2007.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos:** projeto integrado de composição de alimentos. Disponível em <http://www.fcf.usp.br/tabela> acessado em 24/04/2008.

- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação. **Tabela Brasileira de composição de alimentos.** Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco> acessado em 26/04/2008. Acessado em 10/03/2009.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference, release 18, 2005. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR18/sr18.html> Acessado em 18/03/2009.
- VAN REE, R.; AALBERSE, R.C. Specific IgE without clinical allergy. **Journal of Allergy and clinical Immunology**, v. 103 (6), p. 1000-1, 1999.
- VAZ, A J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações.** Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 372p., 2007.
- VENCATO, A **ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA 2005.** Ed. Gazeta Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Brasil, 2005.
- VIETHS, S; REINDL, J.; MÜLLER, U.; HOFFMAN, A; Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple *in vitro* procedure. **Européan Food research Technology**, v. 209, p.379-388, 1999.
- VUCENIK, I. & SHAMSUDDIN, A.M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. **Nutrition and cancer**, v.55 (2), p. 109-125, 2006.
- WENSING, M.; AKKERDAAS, J.H.; VAN LEEUWEN, W.A; STAPEL, S.O; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A; AALBERSE, R.C. IgE to Bet v 1 and profilin: Cross-reactivity patterns and clinical relevance. **Journal oa Allergy and Clinical Immunology**, v. 110 (3), p. 435-42, 2002.
- WETTLAUFER, S.H.; LEOPOLD, A.C. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. **Plant Physiology**, v. 97, p. 165-169, 1991.

- XIANG, P.; BEARDSLEE, T.A; ZEECE, M.G.; MARKWELL, J.; SARATH, G. Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope on soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 408 (1), p. 51-7, 2002.
- YAMAUCHI, F.; YAMAGISHI, T.; IWABUCHI, S. Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. **Food reviews international**, v. 7,n. 3, p. 283-322, 1991.
- YOUNG, E.; STONEHAM, M.D.; PETRUCKEVITCH, A.; BARTON, J.; RONA, R. A population study of food intolerance . **Lancet** , v. 343, p.1127, 1994.
- YUAN, F.J.; ZHAO, H.J.; REN, X.L.; ZHU, S.L.; FU, X.J.; SHU, Q.Y. Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Theoretical Applied Genetic**, v. 115, p. 945-57, 2007.
- YUM, H.Y.; LEE, S.Y.; LEE, K.E.; SOHN, M.H.; KIM, K.E. Genetically modified and wild soybeans: an immunologic comparison. **Allergy and Asthma Proceedings**, v.26, n.3, 210-216, 2005.
- ZARKADAS, C.G.; VOLDENG, H.D.; YU, Z.R.; CHOI, V.K. Assessment of the Protein Quality of Nine Northern Adapted Yellow and Brown Seed Coated Soybean Cultivars by Amino Acid Analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, V. 47, P. 5009-5018, 1999.

ANEXOS

Tabela 15: Dados do teste ELISA para titulação do anticorpo IgE dirigido contra frações de EBP das amostras 1.0/1.1, 2.0/2.1 e 3.0/3.1.

	1.0 P1	1.0 P2	1.0 C1	1.0 C2	1.1 P1	1.1 P2	1.1 C1	1.1 C2
Branco (média)	0,178	0,177	0,116	0,143	0,156	0,202	0,193	0,213
1/10	0,128	0,111	0,086	0,133	0,299	0,259917	0,120	0,093
1/20	0,047	0,089	0,049	0,028	0,089	0,060139	0,139	0,098
1/40	0,029	0,026	0,003	-0,012	0,038	0,012167	-0,003	0,006
1/80	-0,034	-0,047	-0,043	-0,031	-0,050	-0,05136	-0,060	-0,052
1/160	-0,037	-0,057	-0,046	-0,044	-0,066	-0,05469	-0,042	-0,068
1/320	-0,050	-0,036	-0,037	-0,047	-0,054	-0,05569	-0,049	-0,066
1/640	-0,044	-0,055	-0,042	-0,067	-0,067	-0,06469	-0,048	-0,059
	2.0 P1	2.0 P2	2.0 C1	2.0 C2	2.1 P1	2.1 P2	2.1 C1	2.1 C2
Branco (média)	0,194	0,191	0,139	0,172	0,177	0,221	0,217	0,220
1/10	0,272	0,324	0,155	0,081	0,269	0,161	0,314	0,185
1/20	0,072	0,039	0,075	0,120	0,206	0,125	0,136	0,141
1/40	-0,010	-0,005	0,002	-0,013	0,070	0,064	0,026	0,015
1/80	-0,054	-0,049	-0,065	-0,040	-0,004	-0,020	-0,030	-0,016
1/160	-0,059	-0,051	-0,036	-0,057	-0,011	-0,028	-0,033	-0,040
1/320	-0,070	-0,061	-0,062	-0,036	-0,030	-0,045	-0,050	-0,053
1/640	-0,073	-0,075	-0,037	-0,047	-0,046	-0,056	-0,065	-0,070
	3.0 P1	3.0 P2	3.0 C1	3.0 C2	3.1 P1	3.1 P2	3.1 C1	3.1 C2
Branco (média)	0,174	0,180	0,124	0,136	0,155	0,193	0,206	0,219
1/10	0,238	0,275	0,126	0,142	0,251	0,415	0,226	0,112
1/20	0,138	0,150	0,156	0,081	0,088	0,194	0,152	0,150
1/40	0,028	0,064	0,015	0,054	0,019	0,012	0,041	0,013
1/80	-0,063	-0,018	-0,037	-0,025	-0,023	-0,003	-0,006	-0,022
1/160	-0,048	-0,037	-0,020	-0,056	-0,039	0,010	0,085	0,003
1/320	-0,039	-0,040	-0,047	-0,056	-0,040	-0,029	-0,027	-0,018
1/640	-0,046	-0,048	-0,033	-0,067	-0,047	-0,044	-0,089	-0,047

n = 3

Os valores em negrito representados na fração 1/20 de todas as cultivares estão demonstrados na figura 35.

Tabela 16: Dados do teste ELISA para investigar a reatividade dos anticorpos IgE presentes nos soros de pacientes alérgicos (P1 e P2) e controles (C1 e C2) dirigidos contra frações de EBP das amostras 1.0/1.1, 2.0/2.1 e 3.0/3.1.

Amostras	Momentos da hidrólise	P1	P2	C1	C2
Branco					
1.0	zero	0,495667	0,779333	0,364333	0,3006667
	30 seg.	0,254333	0,356	0,227333	0,226
	5 min.	0,300333	0,292667	0,111667	0,23
1.1	zero	0,291667	0,418667	0,206	0,4846667
	30 seg.	0,448667	0,608667	0,442667	0,8586667
	5 min.	0,436667	0,481	0,575	0,6533333
		P1	P2	C1	C2
Branco					
2.0	zero	0,198667	0,417	0,274333	0,151
	30 seg.	0,135	0,292333	0,145667	0,113333
	5 min.	0,302	0,303	0,295333	0,354333
2.1	zero	0,243333	0,549667	0,318667	0,301333
	30 seg.	0,082667	0,114667	0,050667	0,107
	5 min.	0,35	0,206667	0,183667	0,324
		P1	P2	C1	C2
Branco					
3.0	zero	0,390333	0,649333	0,311	0,258667
	30 seg.	0,193667	0,236333	0,121667	0,106667
	5 min.	0,294667	0,198667	0,215	0,174
3.1	zero	0,148667	0,271667	0,205333	0,256333
	30 seg.	0,166	0,198667	0,112	0,142667
	5 min.	0,331333	0,355	0,212667	0,262333