

## Detecção e quantificação de soja transgénica

# Detecção e quantificação de soja geneticamente modificada em géneros alimentícios, comercializados em Portugal, para consumo humano

Rita Faustino<sup>1</sup>, Ana Sousa<sup>1</sup>, Marta Loureiro<sup>1</sup>, Lino Mendes<sup>1</sup>, Miguel Brito<sup>2</sup>

1. Área Científica de Dietética, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa.

2. Área Científica de Biologia, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. miguel.brito@estesl.ipl.pt

**RESUMO:** A biotecnologia permite modificar geneticamente plantas e animais, dando origem a organismos geneticamente modificados (OGM). Os benefícios e potenciais riscos relacionados com os transgénicos são controversos, pelo que o consumidor tem direito a decidir sobre o seu consumo. A soja é a maior representante do mercado global de transgénicos, tornando-se importante a sua monitorização. O objectivo do presente trabalho é detectar e quantificar soja geneticamente modificada em géneros alimentícios. Para tal, 11 amostras de dois lotes diferentes, de uma mesma marca, de géneros alimentícios contendo soja, para consumo humano, foram analisadas pelo método de PCR em tempo real para detecção e quantificação de DNA transgénico. Do total das amostras analisadas, 7 resultaram negativas (63,6%) e 4 positivas (36,4%) para a detecção de DNA de soja transgénica, correspondentes a 3 alimentos: leite, farinha e granulado de soja. As quantidades encontradas variaram entre 0,07% (granulado de soja) e 0,22% (farinha de soja), sugestivas de contaminação ambiental por serem inferiores a 0,4%. Este trabalho evidencia a necessidade do controlo dos alimentos, mostrando ainda a possibilidade de aplicação da PCR em tempo real na detecção e quantificação de OGM mesmo em alimentos processados.

*Palavras-chave:* detecção, quantificação, soja geneticamente modificada, OGM, PCR em tempo real

## Detection and quantification of genetically modified soy in foodstuffs, commercialized in Portugal, for human consumption

**ABSTRACT:** Biotechnology allows plant and animal genetic modification, leading to genetic modified organisms (GMO). The GMO related benefits and risks are still surrounded in controversy, reason why the consumer has the right to decide about its consumption. The aim of this work is to detect and quantify genetically modified soy in foodstuffs. In that sense, 11 samples from two different lots of the same foodstuff's brand, which contain soy, for human consumption were analysed. Real time PCR method was used to detect and quantify transgenic DNA. From all the samples analysed, 7 were negative (63.6%) and 4 positive (36.4%) for the DNA detection from transgenic soy, corresponding to 3 foodstuffs: soy milk, flour and granulated. The DNA quantities from transgenic soy vary from 0.07% (granulated soy) to 0.22% (soy flour), suggesting environmental contamination because they are below 0.4%.

*Keywords:* detection, quantification, genetically modified soy, GMO, real time PCR (RT-PCR)

## Introdução

A biotecnologia é utilizada para modificar geneticamente plantas e animais, dando origem aos organismos geneticamente modificados (OGM)<sup>1</sup>.

A Organização Mundial de Saúde define OGM como organismos cujo material genético foi alterado recorrendo a “tecnologia de DNA recombinante” que combina moléculas de DNA provenientes de diferentes fontes numa mesma molécula, o que não ocorre espontaneamente na natureza<sup>2</sup>.

Os benefícios e riscos relacionados com os OGM ainda são controversos.

Quanto aos benefícios relacionados com os OGM, verifica-se que o desenvolvimento de plantas transgênicas pode ter um impacto ecológico positivo, pois requer menor necessidade de tratamentos químicos, nomeadamente no uso de pesticidas e fertilizantes. Consequentemente, diminui a exposição dos trabalhadores e consumidores aos mesmos, bem como a necessidade de recursos materiais e humanos<sup>3</sup>.

A modificação genética de produtos alimentares tem possibilitado também o seu enriquecimento em vitaminas e minerais, aumentando assim o perfil nutracêutico destes alimentos<sup>4</sup>.

No entanto, existem também potenciais riscos tais como a contaminação ambiental por transferência de genes, o que pode ter como consequência impactos não intencionais em organismos “não-alvo”<sup>5</sup>, alterando a fertilidade e qualidade dos solos e levando a efeitos indesejáveis no ecossistema e ao nível da biodiversidade<sup>6</sup>.

A transformação genética dos alimentos tanto pode levar a uma diminuição dos teores de alguns nutrientes, como a um aumento de outros, ocorrendo alterações na composição nutricional dos alimentos ao nível da(o): 1) interação entre nutrientes; 2) interação entre os nutrientes e genes; 3) biodisponibilidade dos nutrientes; 4) potência do nutriente; e 5) metabolismo dos nutrientes<sup>7</sup>.

No âmbito da produção e comercialização de produtos geneticamente modificados foi estabelecida legislação referente aos mesmos. Também o *Codex Alimentarius* e o Protocolo de Cartagena definem princípios de segurança alimentar e ambiental respectivamente<sup>8</sup>, uma vez que o consumidor tem o direito a uma decisão livre e informada acerca da aquisição de produtos alimentares transgênicos.

A rotulagem e a rastreabilidade dos produtos geneticamente modificados foram devidamente legisladas, definindo-se um limite de 0,9%, a partir do qual existe uma obrigatoriedade de rotular os mesmos (Regulamento (CE) N.º 1830/2003).

Em 2006, a soja geneticamente modificada era a espécie com maior representatividade, apresentando 57% da área global de agricultura biotecnológica<sup>9</sup>.

A modificação genética mais frequente na soja (*Glycine max L.*) refere-se a soja resistente ao glifosato da linha 40-3-2, denominada de *Roundup Ready Soy*<sup>®</sup> ou soja *RR*<sup>10</sup>, representando uma produção e consumo globais superiores a 50% do total de soja<sup>11</sup>.

A detecção de OGM é fundamental, uma vez que é frequente a presença de soja transgênica, em elevadas

**Tabela 1:** Géneros alimentícios contendo soja, analisados.

Género Alimentício	Amostra
Leite de soja	1
	2
logurte de soja	3
	4
Seitan	5
Tofu	6
	7
Óleo de soja	8
Farinha de soja	9
	10
Granulado de soja	11

percentagens, não declarada nos rótulos dos produtos<sup>12</sup>. Esta permite identificar o OGM presente e verificar a sua autorização no mercado. No entanto, também é essencial quantificá-lo para apurar a necessidade de rotulagem ou não, de acordo com a legislação vigente<sup>13</sup>.

A *Polimerase Chain Reaction* (PCR), mais especificamente a PCR em tempo real, é um método validado para a quantificação de soja geneticamente modificada em géneros alimentícios<sup>14</sup>, sendo um método altamente sensível e rápido<sup>13</sup>.

Sendo a soja o principal líder do mercado global dos geneticamente modificados, revela-se importante o objectivo deste estudo, que inclui a detecção e quantificação de DNA de soja geneticamente modificada, em géneros alimentícios comercializados em Portugal, para consumo humano, utilizando para tal uma técnica de PCR em Tempo Real.

## Metodologia

### Amostragem

A selecção dos géneros alimentícios (bebida de soja, iogurte de soja, seitan, tofu, óleo de soja, farinha de soja e granulado de soja) foi realizada considerando o seu impacto nutricional na população geral, ou seja, os mais consumidos e/ou em maior quantidade. A recolha das amostras foi efectuada numa grande superfície comercial, em Lisboa, através de um processo de amostragem aleatória simples. As amostras corresponderam a dois lotes diferentes provenientes da mesma marca, à excepção do seitan, óleo e granulado de soja, em que só foi recolhido um lote (Tabela 1).

### Extracção do DNA

A extracção do DNA foi efectuada em 100 mg de cada amostra, na sua forma comercial, através da utilização do Kit DNeasy<sup>®</sup> Plant MiniKit (Qiagen<sup>®</sup>), seguindo o protocolo do produto, tendo-se ressuspendido o DNA em 100 µl da solução de tampão AE (fornecida no Kit).

### Detecção do Gene Específico da Soja

O DNA extraído foi amplificado através da PCR convencional

**Tabela 2:** Resultados da quantificação de géneros alimentícios à base de soja, com recurso ao kit iQ-Check™ Quanti GMO Soya (Bio-Rad®)

Fragmento do p35S				Gene da Lectina			
Amostra	Ct	LogSQ	SQ	Amostra	Ct	LogSQ	SQ
ST1	36,7	1,25	27,5	ST1	33,8	1,25	37,8
ST2	34,0	2,27	186,5	ST2	33,2	1,90	55,8
ST3	31,0	3,27	1961,6	ST3	26,8	4,07	10287,4
ST4	27,0	4,34	28099,6	ST4	22,3	4,89	108547,2
9	34,9	1,97	207,9	9	23,5	4,69	51107,0
11	36,8	1,39	26,3	11	23,8	4,59	39502,3
2	40,6	0,27	1,9	2	28,8	3,07	1206,0
10	36,9	1,35	24,2	10	22,8	4,88	77306,9

Ct - Ciclo threshold

LogSQ - Logaritmo do número inicial de cópias (*Starting Quantity*)SQ - (*Starting Quantity*) número de cópias

ST - Standard

num termociclador (Biometra®), para avaliar o sucesso da extracção, detectando-se a presença do gene específico da soja, ou seja, a lectina de soja. Foi utilizada uma solução, de volume final 20 µl (2 µl de solução tampão, 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTPs, 0,66 µl de cada *primer* (lectina F e lectina R), 0,4 µl de enzima Taq DNA polimerase, 8.3 µl de água e 4 µl de DNA), para cada amostra analisada.

Os *primers* utilizados para a detecção do gene específico da soja, nomeadamente o gene da lectina de soja, foram desenhados segundo Tengell<sup>15</sup>. A sequência usada para o *primer* da lectina F foi 5' GAC GCT ATT GTG ACC TCC TC 3' e para a lectina R foi 5' GAA AGT GTC AAG CTT AAC AGC GAC G 3'. A amplificação consistiu em 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram depois submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio e visualizadas num transiluminador.

#### Detecção de Soja Geneticamente Modificada

A técnica utilizada na detecção de soja geneticamente modificada foi a PCR em tempo real, usando-se sondas *Molecular Beacon*®. As sequências alvo da marcação por fluorescência foram o p35S e o tNOS.

Para a detecção de soja geneticamente modificada foi utilizado o Kit iQ-Check™ Screen GMO (Bio-Rad®) num termociclador iCycler (Bio-Rad®).

Deste modo, foi utilizada uma solução, de volume final 20 µl (16 µl de mistura de amplificação, 2 µl de sonda (p35S e o tNOS, respectivamente) e 2 µl de DNA), para cada amostra analisada.

A amplificação consistiu inicialmente na desnaturação do DNA (3 min a 50°C); 1 ciclo (10 min a 95°C); 50 ciclos de: Desnaturação do DNA (15 s a 95°C); Hibridação (30 s a 60°C) e Alongamento/Extensão do DNA pela Taq DNA polimerase (30 s a 72°C).

#### Quantificação de soja geneticamente modificada

Para a quantificação de soja transgénica foi utilizado o

método de PCR em tempo real, sendo que as sequências alvo da marcação por fluorescência foram a lectina e o p35S.

O Kit usado foi o iQ-Check™ Quanti GMO Soya (Bio-Rad®). Deste modo, foi utilizada uma solução, de volume final 20 µl, contendo 16 µl de mistura de amplificação, 2 µl de sonda (lectina ou p35S, respectivamente) e 2 µl de DNA, para cada amostra analisada.

A amplificação consistiu inicialmente na desnaturação do DNA (3 min a 50°C); 1 ciclo (10 min a 95°C); 50 ciclos de: Desnaturação do DNA (15 s a 95°C); Hibridação (30 s a 60°C) e Alongamento/Extensão do DNA pela Taq DNA polimerase (30 s a 72°C).

Foram usadas 4 amostras padrão e os seus replicados. Foram construídas duas rectas padrão, uma para o gene da lectina e outra para o p35S. A partir de cada recta foi possível detectar o número de cópias para cada amostra. A partir deste número foi calculada a percentagem de soja geneticamente modificada aplicando a equação definida no Kit iQ-Check™ Quanti GMO Soya (Bio-Rad®):

$$\% \text{ soja geneticamente modificada} = \frac{\text{número de cópias de DNA de p35S}}{\text{número de cópias de DNA de lectina}} * 100$$

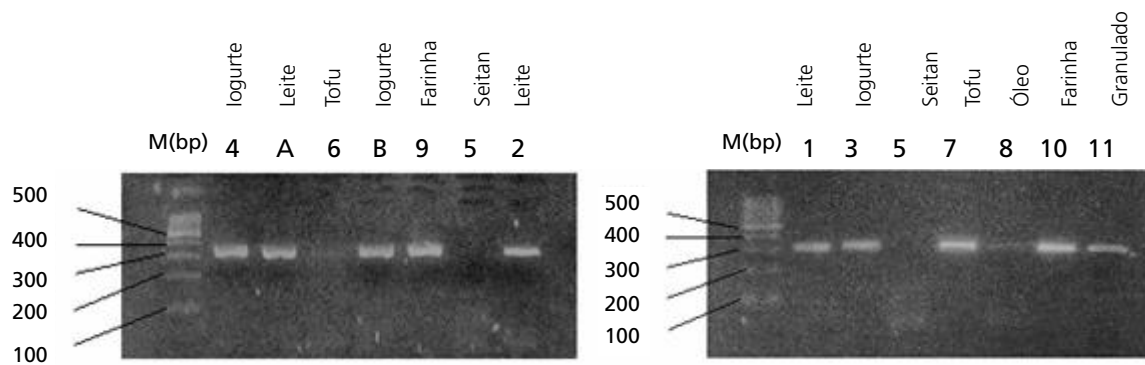
#### Resultados e Discussão

Considerando a rápida expansão da biotecnologia e dos organismos geneticamente modificados, destacando-se a soja neste contexto, e a conseqüente necessidade de rastreabilidade destes produtos, revela-se importante a sua investigação.

Este artigo apresenta resultados referentes à detecção e quantificação de soja geneticamente modificada em géneros alimentícios comercializados em Portugal, para consumo humano.

#### Extracção do DNA

O DNA de soja foi extraído com sucesso nas 11 amostras



**Figura 1:** Electroforeses em gel de agarose da amplificação de DNA do gene da lectina de soja para testar o sucesso da extração de DNA. M (bp): Marcador de peso molecular (100 bp).

analisadas (Figura 1), utilizando o Kit DNeasy® Plant MiniKit (Qiagen®), sendo que este em comparação com outros permite obter uma boa qualidade de DNA extraído em géneros alimentícios<sup>16</sup>.

O aumento do processamento dos géneros alimentícios influencia negativamente a presença e quantidade de DNA de soja, uma vez que ocorre uma degradação do mesmo durante este processo<sup>10</sup>. Este facto explica a menor quantidade de DNA amplificado do gene de lectina de soja nas amostras de tofu e óleo de soja, cujo processamento é, respectivamente, moderado e elevado, comparativamente às bandas da amostra de iogurte e farinha de soja, com processamento moderado e reduzido, nas quais se visualizou maior quantidade de DNA do gene de lectina de soja.

Relativamente à amostra de óleo de soja, os resultados desta investigação não são concordantes com os de outros estudos, referidos em algumas revisões<sup>17-18</sup>, em que se sugere a impossibilidade da extração de DNA de soja detectável neste género alimentício, a qual foi possível nesta investigação.

#### Detecção de Soja Geneticamente Modificada

O DNA de soja extraído das 11 amostras em estudo foi sujeito a uma análise qualitativa pelo método PCR em tempo real.

Das 11 amostras analisadas foram detectadas 4 amostras contendo DNA de soja geneticamente modificada, detectada pela presença do p35S (Figura 2), que correspondem às seguintes amostras: leite de soja, farinha de soja e granulado de soja. Resultados estes, semelhantes aos detectados para a presença do tNOS (Figura 3).

Actualmente a soja *RR* é a variante transgénica mais representativa e também a única autorizada pela União Europeia (Regulamento (CE) N.º 1830/2003). Deste modo, uma vez que esta incorpora a sequência promotora, p35S e a sequência terminadora, tNOS<sup>10</sup>, coloca-se a possibilidade da variante de soja geneticamente modificada encontrada neste trabalho ser soja *Roundup Ready*®.

Os dois lotes de leite de soja diferem entre si quanto à detecção do p35S e do tNOS no DNA de soja, onde na amostra 1 o DNA não foi amplificado, sendo-o na amostra 2.

Constata-se que das 11 amostras analisadas, 4 apresentam

DNA de soja geneticamente modificado, o que equivale a 36.4% da amostragem, sendo que as restantes 7 amostras não contêm DNA de soja transgénico, correspondendo a uma percentagem de 63.6%.

#### Quantificação de Soja Geneticamente Modificada

As 4 amostras em que se identificou positivamente DNA de soja geneticamente modificado foram posteriormente analisadas quantitativamente pelo método de PCR em tempo real, utilizando o Kit iQ-Check™ Quanti GMO Soya (Bio-Rad®), determinando-se a quantidade de cópias de p35S e do gene da lectina de soja.

As rectas de calibração obtidas para a lectina e para o p35S foram, respectivamente,  $y = -0,3008x + 11,76$  ( $r^2 = 0,9246$ ) e  $y = -0,299x + 12,433$  ( $r^2 = 0,9346$ ). A partir destas, obtivemos o número inicial de cópias de DNA de soja (Tabela 2).

A percentagem de DNA de soja geneticamente modificado presente na amostra de leite de soja é 0,16%; nas amostras de farinha de soja foi de 0,4% e 0,03%, sendo a média 0,22%; e na amostra de granulado de soja 0,07%.

As percentagens obtidas são concordantes com a possibilidade de ocorrência de contaminação ambiental, uma vez que são inferiores ou iguais a 0,4%<sup>10</sup>.

A crescente preocupação com o impacto ambiental por contaminação por OGM exigiu a criação de medidas de protecção das culturas convencionais, como a implementação de zonas isoladas de fontes de pólen, a segregação de zonas de colheita entre si<sup>19</sup>, com uma distância mínima recomendada de 300 metros (Decreto-Lei n.º 160/2005), o espaçamento temporal entre plantações variadas, a instalação de barreiras físicas contra o vento ou outros meios polinizadores, a utilização de solos estéreis. No entanto, tais medidas não asseguram a completa protecção das culturas convencionais, devendo ser o assumido o fluxo de genes no ambiente<sup>19</sup>.

O valor estipulado no Regulamento (CE) n.º 1830/2003 para a rotulagem de géneros alimentícios à base de transgénicos é de 0,9%. De acordo com as quantidades de soja geneticamente modificada determinadas nas amostras analisadas, verificou-se que os produtores não eram obrigados legalmente a rotular tais produtos como contendo OGM. No entanto, verificou-se que, em relação ao leite de soja e

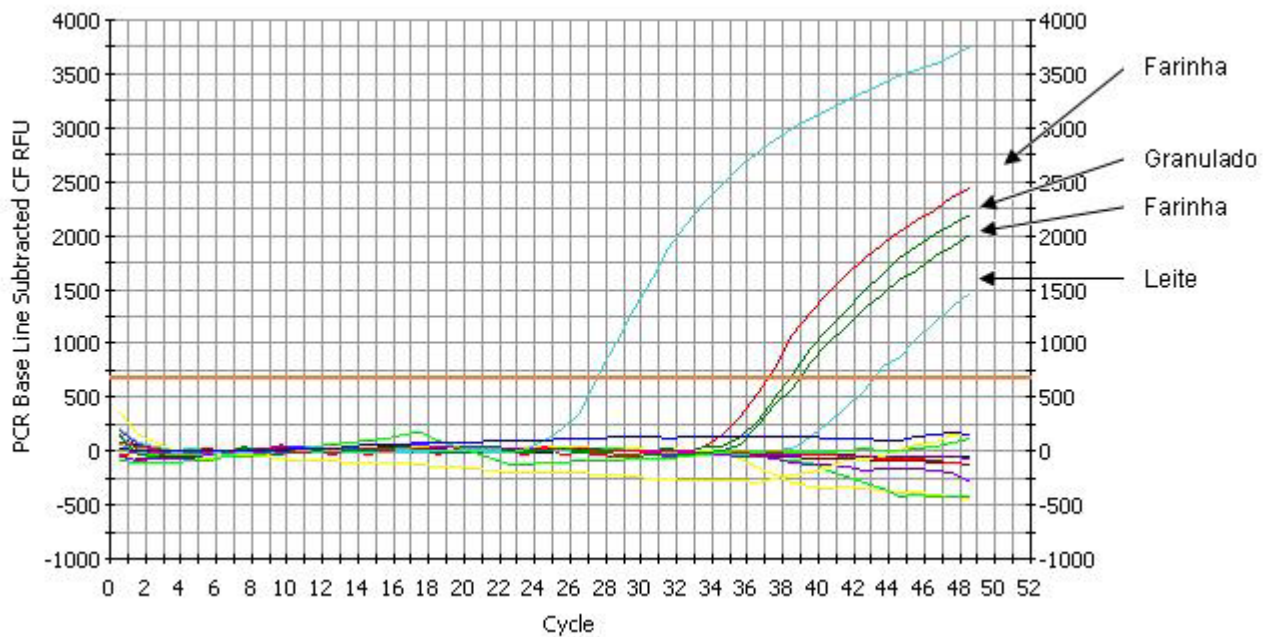


Figura 2: Curva de amplificação da PCR em tempo real para o fragmento do p35S, com recurso ao Kit iQ-Check™ Screen GMO (Bio-Rad®).

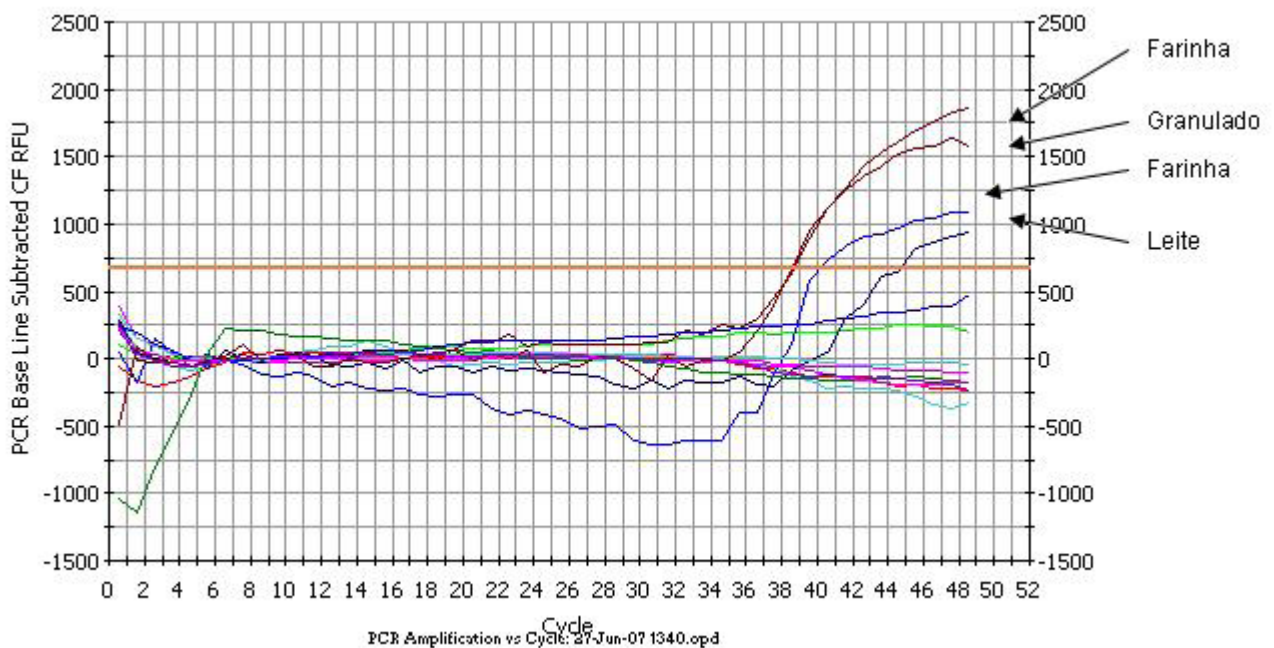


Figura 3: Curva de amplificação da PCR em tempo real para o fragmento do tNOS, com recurso ao Kit iQ-Check™ Screen GMO (Bio-Rad®).

ao granulado de soja, os produtores afirmavam que os seus produtos não continham OGM, o que se revelou contrário aos resultados obtidos.

A Comissão Científica Europeia sugere que, com o tempo, será problemática a coexistência de agriculturas “livres” de OGM. Assim, será muito difícil manter a presença de OGM abaixo do nível estabelecido e aproximado de 1%<sup>20</sup>.

Considera-se pertinente, em futuras investigações, a análise de um maior número de géneros alimentícios contendo soja,

para garantir uma maior representatividade do estudo de alimentos transgénicos, por forma a fornecer ao consumidor uma informação mais abrangente dos produtos existentes no mercado.

#### Referências bibliográficas

1. Herdt RW. Biotechnology in agriculture. *Annu Rev Environ Resour.* 2006;31:265-95.

2. World Health Organization. Biorisk management: laboratory biosecurity guidance [Internet]. Geneva: WHO; 2006 [cited 2008 Jun 20]. Available from: [www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_EPR\\_2006\\_6.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2006_6.pdf)
3. Bertoni G, Marsan PA. Safety risks for animals fed genetic modified (GM) plants. *Vet Res Commun*. 2005 Aug;29 Suppl 2:13-8.
4. Davies KM. Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. *Mutat Res*. 2007 Sep;622(1-2): 122-37.
5. Celec P, Kukučková M, Renczésová V, Natarajan S, Pálffy R, Gardlík R, et al. Biological and biomedical aspects of genetically modified food. *Biomed Pharmacother*. 2005 Dec;59(10):531-40.
6. Liu B, Zeng Q, Ya F, Xu H, Xu C. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. *Plant Soil*. 2005;271(1-2):1-13.
7. Uzogara SG. The impact of genetic modification of human foods in the 21<sup>st</sup> century: a review. *Biotechnol Adv*. 2000 May;18(3):179-206.
8. Haslberger AG. Need for an "Integrated Safety Assessment" of GMOs, linking food safety and environmental considerations. *J Agric Food Chem*. 2006 May;54(9):3173-80.
9. James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. Ithaca, NY: ISAAA-International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications; 2006. ISBN 1-892456-40-0.
10. Rott ME, Lawrence TS, Wall EM, Green MJ. Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem*. 2004 Aug;52(16):5223-32.
11. Harrigan GG, Ridley WP, Riordan SG, Nemeth MA, Sorbet R, Trujillo WA, et al. Chemical composition of glyphosate-tolerant soybean 40-3-2 grown in Europe remains equivalent with that of conventional soybean (*Glycine max* L.). *J Agric Food Chem*. 2007 Jul;55(15):6160-8.
12. Dalla Costa L, Martinelli L. Development of a real-time PCR method based on duplo target plasmids for determining an unexpected genetically modified soybean intermix with feed components. *J Agric Food Chem*. 2007 Feb;55(4):1264-73.
13. Giovannini T, Concilio L. PCR detection of genetically modified organisms: a review. *Stärke*. 2002;54(8):321-7.
14. Hübner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P. Validation of PCR methods for quantification of genetically modified plants in food. *J AOAC Int*. 2001 Nov/Dec;84(6):1855-64.
15. Tengel C, Schüssler P, Setzke E, Balles J, Sprenger-Hausells M. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *Biotechniques*. 2001 Aug;31(2):426-9.
16. Di Bernardo G, Del Gaudio S, Galderisi U, Cascino A, Cipollaro M. Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. *Biotechnol Prog*. 2007 Mar-Apr;23(2):297-301.
17. Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H, Van Den Eede G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Technol*. 2002 Jan;214(1):3-26.
18. Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol*. 2002 May;20(5):215-23.
19. Clark EA. Environmental risks of genetic engineering. *Euphytica*. 2006 Mar;148(1-2):47-60.
20. Levidow L, Boschert K. Coexistence or contradiction? GM crops versus alternative agricultures in Europe. *Geoforum*. 2008 Jan;39(1):174-90.

Artigo recebido em 04.09.2008 e aprovado em 30.04.2009.