

Presencia de proteína transgénica y su efecto sobre el contenido de taninos y aflatoxinas en maíz comercial*

Presence of transgenic proteins and their effect on the content of tannins and aflatoxins in commercial corn

Silvia Denise Peña Betancourt^{1§}

¹Laboratorio de Toxicología Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, México, D.F. [§]Autora para correspondencia: silvia_dpb@hotmail.com.

Resumen

En México en el estado de Oaxaca se detectó por primera vez la contaminación de maíz nativo con maíz transgénico. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado a evaluar el efecto de la contaminación transgénica sobre los taninos (insecticidas naturales) y la contaminación por aflatoxinas. En este trabajo se realizó un monitoreo de la contaminación transgénica en trece genotipos de maíz (diez híbridos y tres nativos). Las muestras fueron colectadas en los estados de Hidalgo (5), Morelos (2), Estado de México (3) y Distrito Federal (3). El ensayo de la gelatina y la espectrofotometría de luz UV-vis se utilizaron para determinar la presencia y el contenido de taninos; la técnica de inmuno ensayo enzimático para el análisis de aflatoxinas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del promotor 35S y el terminador NOS. El 44% de los maíces híbridos resultaron positivos a las secuencias transgénicas. El contenido de taninos fue variable entre los genotipos de maíz en un rango de 1 300 a 3 060 mg L expresados como equivalentes de ácido tánico y de 7.69 a 276.92 mg L expresados como equivalentes catecol. Se observó una diferencia significativa entre el contenido de taninos en los maíces híbridos dependiente de su procedencia. Todos los híbridos de maíz presentaron contaminación por aflatoxinas, en un rango de 1.2 a 12 ng g. Se concluye que 50% de los híbridos de maíz contaminados con proteína transgénica disminuyó el contenido de galotaninos (protección natural) y aumentó la contaminación por aflatoxinas.

Abstract

In Mexico, the state of Oaxaca was where contamination of native corn with genetically modified corn was first detected. However, few studies have focused on evaluating the effect of GM contamination on tannins (natural insecticides) and aflatoxin contamination. In this work, transgenic pollution was monitored in thirteen corn genotypes (ten hybrids and three natives). The samples were collected in the states of Hidalgo (5), Morelos (2), State of Mexico (3) and Federal District (3). A gel assay and UV-vis light spectrophotometry were used to determine the presence and content of tannins; the enzyme immunoassay technique for the analysis of aflatoxins and the polymerase chain reaction (PCR) were used to identify the 35S promoter and the NOS terminator. 44% of the corn hybrids tested positive for transgenic sequences. Tannin content varied among the corn genotypes within a range of 1 300 to 3 060 mg L, expressed as tannic acid equivalents, and of 7.69 to 276.92 mg L expressed as catechol equivalents. There was a significant difference of the tannin content among corn hybrids depending on its origin. All corn hybrids presented aflatoxin contamination within a range of 1.2 to 12 ng g. It is concluded that in 50% of the corn hybrids contaminated with transgenic protein the content of gallotannins decreased (natural protection) and aflatoxin contamination increased.

* Recibido: junio de 2012
Aceptado: enero de 2013

Palabras clave: aflatoxinas, maíz, taninos, transgénico.

Key words: aflatoxins, corn, tannins, transgenic.

Introducción

De acuerdo con la FAO, existen 82 países pobres; es decir, que enfrentan un déficit alimentario, y quienes aumentaron 40% el gasto de sus importaciones de alimentos en 2008, con respecto al año anterior (FAO, 2008).

El maíz transgénico ha sido introducido en varios estados mexicanos desde 2009, principalmente en los estados de Tamaulipas, Nayarit y Aguascalientes, entre los cuales destacan MON21-9 con el gen epsps, MON-603-6 con los genes Cp4 epsps y cp4 epsps 1214p, MON810-5 con Cry 1Ab, DAS1507-1 gen Cry1F cepa PS811 y gen pat, MON-863-5 gen cry 3Bb1 y gen ntp11, así como los que tienen más de una inserción como MON603-6 X MON810-6, gen Cry 1Ab, gen cp4 epsps, por haber demostrado ventajas con respecto al maíz no transgénico, como es un mayor rendimiento por ha y menor susceptibilidad al ataque de insectos y hongos y de aflatoxinas (SENASICA, 2012).

La hibridación de los maíces ha dado excelentes resultados al incrementar el contenido de proteína, y una mayor resistencia al ataque de virus, bacterias y hongos y una mayor adaptación a las condiciones de altitud de la región. En el 2001, 30 híbridos se sembraron en 70 000 ha en 20 estados de la República Mexicana.

Actualmente existen varios métodos para identificar la presencia de una proteína extraña al maíz como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o las tiras reactivas de flujo lateral, prueba inmunológica sencilla. Las dos técnicas se utilizan como un primer paso o monitoreo para la detección de secuencias transgénicas (Hull *et al.*, 2000).

El maíz es susceptible a la contaminación por micotoxinas, principalmente de las sintetizadas por hongos microscópicos patógenos del género *Aspergillus*, cuya presencia en campo se favorece en suelos con gran infestación de insectos y temperaturas cálidas < 25 °C. Las micotoxinas constituyen un riesgo a la seguridad alimentaria, ya que si se encuentran en niveles superiores a los tolerables son una amenaza para la inocuidad de los alimentos, además de reducir el valor nutritivo del alimento que contaminan.

Introduction

According to the FAO, there 82 poor countries, meaning that they face a food deficit; the spending on imported food of these countries increased 40% in 2008 compared to the previous year (FAO, 2008).

Transgenic corn has been introduced in several Mexican states since 2009, mainly in the states of Tamaulipas, Nayarit and Aguascalientes; the most notable varieties are MON21-9 with the epsps gene; MON-603-6 with the Cp4 epsps and cp4 epsps 1214p genes; MON810-5 with Cry 1AB, DAS1507-1 gene Cry1F PS811 strain and pat gene; MON-863-5 with cry 3Bb1 gene and ntp11 gene, and those with more than one insertion such as MON603-6 X MON810-6 with Cry 1AB gen and cp4 epsps gene, for having demonstrated the advantages over non-GM corn, such as higher yields per hectare and lower susceptibility to attack by insects, fungi and aflatoxins (SENASICA, 2012).

The hybridization of corn has been very successful in increasing the protein content and the resistance to viruses, bacteria and fungi, as well as making corn more adaptable to the altitude conditions of the region. In 2001, 30 hybrids were planted on 70 000 ha in 20 states of the Mexican Republic.

Currently, there are several methods to identify the presence of a protein foreign to corn, such as chain reaction (PCR) or the lateral flow test strips, an easy immunological test. The two techniques are used as a first step for the detection or monitoring of transgenic sequences (Hull *et al.*, 2000).

Corn is susceptible to contamination by mycotoxins, mainly those synthesized by microscopic pathogenic fungi of the genus *Aspergillus*, whose presence is favored in soils with heavy infestation of insects and warm temperatures < 25 °C. Mycotoxins pose a risk to food security, as when in excess of tolerable levels they are a threat to food innocuity and reduce the nutritional value of the polluted food.

La presencia de insecticidas naturales como son los taninos en el maíz pueden variar de acuerdo con las condiciones de estrés que ha sufrido la planta durante su desarrollo, debido a que una de sus múltiples funciones es actuar como defensa natural de la planta contra insectos (Peterson *et al.*, 2001) Los galotaninos son moléculas formadas por varios ácidos fenólicos que derivan del ácido shikímico, éstos compuestos pueden ser hidrolizados por enzimas de los hongos *Aspergillus* y *Penicillium* spp. Los taninos condensados o catecol taninos poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenas. El contenido de fenoles totales en el maíz ha sido descrito en un nivel de 1 250 µg/g. menor que el contenido del trigo (1700 µg g) pero mayor que el del grano de la cebada (900 µg g).

Colecta de muestras de maíz

En septiembre de 2007, se colectaron material fresco en el estado de Hidalgo, provenientes de semillas de maíz identificadas comercialmente como pantera, leopardo, 30G40, 30T26, y 30V46 de empresas transnacionales. En 2008, se colectaron del Estado de México material seco conocidos como puma, H515 y H516. En 2009 se colectaron del estado de Morelos 1 kg de los híbridos de maíz DK2060 y Cronos, y en el 2010, del Distrito Federal los maíces nativos identificados como Chalco, Sinaloa y Toluqueño; en estado seco. Todas secas fueron cribadas y molidas hasta su pulverización.

Determinación de taninos libres totales

Los taninos fueron extraídos de acuerdo con el ensayo colorimétrico de la gretina- cloruro de sodio, a partir de 5 g de cada muestra de maíz pulverizado, se le añadió una solución de hidróxido de sodio (NaOH al 0.05 M), se tomo una alícuota de 10 ml. La concentración de taninos libres totales fue determinado usando como estándar el ácido tánico y el catecol a una concentración de 20 mg L. Se realizó una curva con ambos patrones a partir de 5 diluciones de cada solución stock 0.05, 0.1, 0.2, 1.0 y 2.0 mL, en un volumen de 50 mL. Se utilizó una solución de cloruro férrico al 1% para favorecer el desarrollo del color de los compuestos fenólicos. Los estándares se leyeron a una longitud de onda de 720 nm y se construyeron ambas curvas de calibración. Las muestras se interpolaron en las curvas para determinar su concentración

Detección de aflatoxinas totales por ELISA

El total de muestras fueron analizadas para detectar aflatoxinas usando un inmuno ensayo enzimático (ELISA) comercial Ridascreen Fast aflatoxina, que se fundamenta

The presence of natural insecticides such as tannins in corn may vary according to the conditions of stress suffered by the plant during its development, as one of the many functions of tannins is to act as the plant's natural defense against insects (Peterson *et al.*, 2001). Gallotannins are molecules formed by several phenolic acids derived from shikimic acid; they can be hydrolyzed by enzymes of the *Aspergillus* and *Penicillium* spp. fungi. Condensed tannins, or catechol tannins, have antioxidant and anticancer properties. The total phenolic content in corn has been described as 1 250 µg/g, less than the phenolic content in wheat (1 700 µg/g) but more than the content in barley grains (900 µg/g).

Collection of corn samples

In September 2007 fresh material was collected in the state of Hidalgo from corn seeds from commercially identified as panther, leopard, 30G40, 30T26 and 30V46 from transnational corporations. In 2008, in the State of Mexico, dry material was collected from seeds known as puma, H515 and H516. In 2009, in the state of Morelos, 1 kg of corn hybrids DK2060 and Cronos was collected, and in 2010, in the Federal District, native corns identified as Chalco, Sinaloa and Toluqueño were collected in dry state. All dry seeds were winnowed and milled until pulverized.

Determination of total free tannins

The tannins were extracted according to a colorimetric assay of gelatin/sodium chloride; to 5 g from each sample of pulverized corn was added a sodium hydroxide solution (0.05 M NaOH), and an aliquot of 10 ml was taken. The concentration of total free tannins was determined using tannic acid and catechol as standard at a concentration of 20 mg L. A curve was performed with both patterns from 5 dilutions of each stock solution (0.05, 0.1, 0.2, 1.0 and 2.0 ml) in a volume of 50 mL. A solution of 1% ferric chloride was used to favor the development of the color of the phenolic compounds. The standards were read at a wavelength of 720 nm and both calibration curves were constructed. The samples were interpolated in the curves to determine their concentration.

Detection of total aflatoxins by ELISA

All samples were analyzed for aflatoxins using a Ridascreen Fast aflatoxin enzymatic immunoassay (ELISA), which is based on the antigen-antibody reaction.

en usan reacción antígeno-anticuerpo. Se pesaron 5 g de cada muestra por duplicado, y se realizó una extracción metanólica 70%, se aplicaron 50 μ l en cada pozo de una microplaca de titulación y se leyó la absorbancia a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas.

El 44% de los híbridos de maíz evaluados fueron positivos al promotor 35S y terminador NOS, en concentraciones menores a 1%; es decir, que se encuentran dentro de los límites permitidos por la Unión Europea para eventos transgénicos. Los maíces nativos no presentaron las secuencias transgénicas, por lo que la contaminación transgénica observada en los maíces híbridos, probablemente no haya sido accidental sino que ya eran maíces transgénicos y que fueron sembrados en los estados de Hidalgo y Estado de México.

Se observó la presencia de precipitado y vire de color en la prueba de la gelatina-cloruro de sodio, siendo positiva a taninos. Cabe mencionar, que 77% de las muestras dieron un color azul por lo que se identificaron como galotaninos y 23% fueron positivos a catecoltaninos por su color verde en presencia de cloruro férrico. Los híbridos del estado de Morelos los que presentaron mayor contenido de galotaninos con una media de 0.0029%, seguidos por los híbridos del estado de Hidalgo con 0.0019% y del Estado de México con 0.0016% y los maíces nativos con una media de 0.0013%. Los maíces híbridos con catecoltaninos presentaron una media de 0.020%

Todos los híbridos de maíz presentaron aflatoxinas en una media de 4.8 ng g, un rango de 1.2 a 12 ng g; y los maíces nativos una media de 5.6 ng g. Los híbridos contaminados con proteína transgénica con una media de 6.37 ng g y con los de mayor contenido individual (12 y 10 ng g) que de acuerdo con la legislación europea están fuera de los límites máximos permitidos, y dentro de la legislación nacional. Sin embargo, si tomamos en cuenta que el contenido de aflatoxinas en el frijol es de 6 ng g, el consumo mínimo por estos dos alimentos sería de 13.56 ng g y máximo de 25 ng g lo cual constituye un riesgo a la salud (Peña y Conde, 2012). Se pudo también observar que los la contaminación de aflatoxinas en los híbridos no contaminados con transgenes fue menor (2.4 ng g). sin embargo una muestra presento el mas alto nivel de contaminación por aflatoxinas (12 ng g), posiblemente debido al genotipo y al tiempo de cosecha de acuerdo con lo descrito por Lauren *et al.*, 2007.

5 g of each sample were weighed in duplicate and 70% methanol was extracted; 50 μ l were applied to each well of a microtiter plate, and the absorbance was read at 450 nm. The absorbance is inversely proportional to the concentration of aflatoxins.

44% of the corn hybrids evaluated were positive to the 35S promoter and to the NOS terminator at concentrations of less than 1%; in other words, they were within the limits allowed by the European Union for transgenic events. The native corns did not present the transgenic sequences, so the transgenic contamination observed in corn hybrids was probably not accidental; maybe they were transgenic corns planted in the states of Hidalgo and Mexico.

The presence of precipitate and a change of color was observed in the gelatin-sodium chloride test, which was positive for tannins. It is worth mentioning that 77% of the samples gave a blue color and so were identified as gallotannins, while 23% were positive for catechol tannins, as seen by their green color in the presence of ferric chloride. Corn hybrids from the state of Morelos were the ones that had a higher content of gallotannins, with an mean of 0.0029%, followed by the hybrids from the state of Hidalgo with 0.0019% and those from the State of Mexico with 0.0016%; the mean content of gallotannins of the native corns was 0.0013%. The corn hybrids with catechol tannins showed an mean of 0.020%

All corn hybrids presented an mean of 4.8 ng g aflatoxins within a range from 1.2 ng to 12 ng g; the native corns had an mean of 5.6 ng g. Corn hybrids contaminated with transgenic protein at an mean of 6.37 ng g, and those with higher individual content (12 and 10 ng g) are, according to the European legislation and the Mexican legislation, beyond the maximum allowable limits. However, if we consider that the aflatoxin content of beans is 6 ng g, the minimum consumption from these two foods would be 13.56 ng g and the maximum 25 ng g, posing a health risk (Peña and Conde, 2012). It could also be observed that aflatoxin contamination was lower in corn hybrids not contaminated with transgenes (2.4 ng g). However, one sample showed the highest level of aflatoxin contamination (12 ng g), possibly because of the genotype and the time of harvest, according to what was described by Lauren *et al.*, 2007 (Table 1).

Conclusiones

El 20% de los híbridos evaluados (uno procedentes del Estado de México y otro de Hidalgo disminuyeron sus defensas naturales (taninos), lo cual pudo deberse a la contaminación transgénica, además la disminución del contenido de taninos pudo afectar la protección natural de la planta durante su desarrollo en campo y que bajo condiciones estresantes como sequía no pudo defenderse quedando expuesta a la presencia de hongos. Por otro lado se ha documentado que los taninos actúan favoreciendo la hidrólisis enzimática del almidón, ya que los taninos actúan sobre la enzima alfa amilasa, lo cual no podrá llevarse a cabo completamente al disminuir su presencia, lo que provocaría una menor captación del almidón por el intestino y una menor ingesta energética por el animal.

El 100% de los híbridos evaluados presentaron contaminación por aflatoxinas, presentando los más altos niveles los híbridos comerciales contaminados con proteína transgénica.

Conclusions

20% of the hybrids evaluated (one from the State of Mexico and another from the state of Hidalgo) had their natural defenses decreased (tannins), which could have been due to transgenic contamination. The decrease in tannin content could have affected the natural protection of the plant during its development in the field, so that, under stressful conditions such as drought, it was not able to defend itself and was exposed to the presence of fungi. Furthermore, it has been documented that tannins act by promoting the enzymatic hydrolysis of starch, acting on the enzyme alpha amylase, which can not be fully carried out when the presence of tannins decrease, which would result in a reduced uptake of starch by the intestine, and a lower energy intake by the animal.

100% of the hybrids tested were contaminated with aflatoxins, with the commercial hybrids presenting the highest levels of contamination with transgenic proteins.

End of the English version



Cuadro 1. Contenido promedio de taninos y aflatoxinas en trece genotipos de maíz (*Zea mays* L.).

Table 1. Average content of tannins and aflatoxins in thirteen corn genotypes (*Zea mays* L.).

Tipo de maíz comercial	Prueba cualitativa de gnetina-cloruro de sodio	Contenido de galotaninos ppm y (%)	Contenido de catecoltaninos ppm y (%)	Contenido de aflatoxinas ng g
Híbrido puma	Positiva a galotaninos	1 186 (0.0011%)	7.69 (0.0007%)	10
Híbrido 30G40	Positiva a galotaninos	1 340 (0.0012%)	26.53 (0.0026)	4.5
Híbrido Leopardo	Positiva a galotaninos	1 892 (0.0019%)	24.15 (0.002%)	7.0
Híbrido Pantera	Positiva a galotaninos	2 715 (0.0027%)	13.69 (0.0014%)	3.0
Nativo: Chalco, Sinaloa, Toluqueño	Positiva a galotaninos	1 327 (0.0007%)	28.58 (0.0029%)	5.6
Híbrido 30T26	Positiva a catecoltaninos	1 783 (0.0017%)	135.38 (0.013%)	1.8
Híbrido 30V46	Positiva a catecoltaninos	1 713 (0.0017%)	276.92 (0.027)	1.2
Híbrido Dk2060	Positiva a galotaninos	3 060 (0.0031%)	nd	2.8
Híbrido Cronos	Positiva a galotaninos	2 580 (0.0026%)	nd	12
Híbrido H515	Positiva a galotaninos	2 500 (0.0025%)	nd	4.5
Híbrido H516	Positiva catecoltaninos	1 300 (0.0013%)	nd	1.8

ND= no detectado.

Literatura citada

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2008. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia.

Hull, R.; Covey, S. and Dale, P. 2000. Genetically modified plants and the 35S promoter assay the risk and enhancing the debate. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 12:1-5.

Bouftira, I.; Cheddly, A. and Souad, S. Antioxidant and antibacterial properties of plants extract 2012. *Adv. Chem. Eng. Sci.* 2:359-365.

- Lauren, D. R.; Smith, W. A. and Di Menna, M. E. 2007. Influence of harvest date and hybrid on the mycotoxin content of maize *Zea mays*) grain grown in New Zeland. New Zaland. J. Crop Hortic. Sci. 35(3):331-340.
- Peña, B. S. D. y Conde, V. 2012. Contenido de aflatoxinas y proteína en 13 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Rev. Mex. Cienc. Agríc. 3(1):201-206.
- Peterson, D.; Emmons, Ch. and Hibbs, A. 2001. Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. J. Cereal Sci. 33(1):97-103.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2012. Estado de solicitudes de permisos de libración al ambiente de OGM ingresados en 2009, 2010 2011. 356 pp.