

9 CIBIA

Congreso Iberoamericano
de Ingeniería de Alimentos

Valencia (España)

13 - 16 enero 2014

Libro de Actas

Vol. 2

Editado por Pedro Fito, Ana María Andrés,
Ángel Luis Argüelles y María Dolores Ortolá



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

EVALUACIÓN DE SOYA GENETICAMENTE MODIFICADA POR Q-PCR EN EL PROCESAMIENTO DE LECHE DE SOYA

Matos, A.^{1,2}, Torrezan, R.², Del Aguila, E.M.¹, Oliveira, E.M.M.² e Paschoalin, V.M.F.¹.

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, RJ – Brasil

2. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ – Brasil

INTRODUCCIÓN

La soya es una planta que pertenece a la familia Fabaceae (leguminosa) que está presente en la cadena alimentar hace 5.000 años. Única leguminosa que contiene los nueve aminoácidos esenciales en la proporción correcta para la salud humana, visto que la función básica de las proteínas en la dieta es suplir al organismo de cantidades adecuadas de aminoácidos, ya que no son sintetizados por el organismo. El mercado de soya presenta fuerte crecimiento en el sector de bebidas NANCS – no alcohólicas, no carbonatadas, cuando comparado a los productos tradicionales. ROSA & RÉVILLION, 2011 predicen que este mercado crecerá a una tasa anual del 20% hasta 2020. La leche de soya es considerada un producto de procesamiento moderado con beneficios nutricionales debido a los altos niveles de aminoácidos esenciales y ácidos grasos, vitaminas y minerales, representando también una alternativa a la leche de origen animal, especialmente para personas intolerantes a la lactosa o alérgicas a las proteínas de la leche. Sin embargo, la etiqueta de las bebidas a menudo no proporciona información suficiente sobre el origen de la soja adoptado en el proceso. A pesar de la etiqueta ser obligatorio para los alimentos en el Brasil y la Comunidad Europea se ha fijado en 1 % y 0,9 % de OGM (BRASIL, 2005; EC, 2003), respectivamente, ni siempre es posible determinar tales cantidades, dado el tipo de proceso adoptado. En el Brasil, se estima que 88,8 % de la zafra 2012/ 13 sea de cultivo de la soya genéticamente modificada (CÈLERES, 2012). Sin embargo, no hay datos reales sobre el consumo de alimentos procesados a base de esta cultivar. La cultura de soya tolerante al herbicida glifosato – Soya *Roundup Ready*® es la que ocupa las mayores extensiones agrícolas en el mundo, y el Brasil es el segundo mayor productor (JAMES, 2013). El establecimiento de las evaluaciones *farm to fork* es necesario, una vez que el mercado es regulado a través de la Resolución Normativa, n° 9, de 2 de diciembre de 2011, de la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad – CTNBio, que aprueba el plano de control de los transgénicos posteriores a la liberación comercial. Frente a esta situación, es importante implementar metodologías que

permitan la rastreabilidad del organismo genéticamente modificado a fin de asegurar el derecho del consumidor (BRASIL, 2003).

OBJETIVO

Cuantificar el porcentual de soya RR en la producción del extracto hidrosoluble de soya, en las formulaciones de 0,1 hasta 50 % de soya RR® por PCR en tiempo real usando una sonda del tipo *Taqman*® 35S GMO.

MATERIAL Y MÉTODOS

Producción de formulados con soya orgánica y soya genéticamente modificada

Granos de soya (*Glycine max*, L.) de zafra 2006/2007 de dos diferentes sistemas de cultivo: orgánica, ECOBRAS de procedencia do Rio Grande do Sul; e genéticamente modificada - BRS 247, del estado de Paraná. Se obtuvieron los extractos hidrosolubles de soya conforme Felberg *et al.*, 2003. La Tabla 1 muestra las formulaciones de granos descascados de soya orgánica y soya RR®. La soya orgánica ha sido procesada para asegurar que no había contaminación cruzada con otras legumbres o semillas de soya modificadas genéticamente.

Análisis molecular

Material

Material de Referencia Certificados – MRC con porcentual de soya RR® definidos: 0% nominal (>0,003%), 0,1 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % y 5,0 % del CRM IRMM-410 (*Fluka Chemie GmbH*); y formulaciones de los extractos de soya (Tabla 1).

Extracción del DNA genómico

El DNA genómico de los extractos hidrosolubles de soya en las formulaciones de soya RR® y de los padrones fueron extraídos usando el kit comercial - DNeasy® Plant Mini (Quiagen).

Análisis del DNA genómico total de soya

Las muestras de DNA aislados y purificados fueron analizadas por espectrofotometría (espectrofotómetro BioRad) para la evaluar la pureza por la relación de la absorbancia OD₂₆₀/ OD₂₈₀. En seguida, la cantidad de DNA genómico aislado fue determinada pelo método fluorométrico, usando el Qubit® *fluorometer* (Invitrogen). Con estas extracciones fueron realizadas PCR *simplex* para detección del gen de la lectina con la

secuencia de los oligonucleótidos iniciadores criados y validados por Germini *et al.* (2004), sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies*. Las reacciones fueran realizadas a 95 °C, por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 50 seg, 60 °C por 50 segundos y a 72 °C por 50 seg, y una extensión final a 72 °C por 10 min en un termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. La mezcla de reacción para detección de lectina consistía en 2 µL de tampón PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 1 % Triton X-100), 0,8 µL de DNTPs 10 mM, 1,4 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,6 µL de la enzima Taq polimerase, 300 ng de DNA usada como molde y 1 nM de la mezcla de oligonucleotídeos iniciadores, en un volumen total de reacción de 20 µL. Los productos de la reacción fueron separados en un gel de agarosa 2,0 % y visualizados con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), en tampón TBE 0,5x. Las condiciones de análisis de electroforesis fueron de 90 V por 90 min. Los productos de PCR fueron visualizados y foto documentados con el auxilio de un transiluminador (*E-Box 008 System; Vilbert Loumat-Biosystems*) con luz UV a 302 nm.

Cuantificación de soya RR en la leche de soya por PCR en tiempo real - qPCR

Las muestras de DNA aislados fueron analizadas en PCR tiempo real con la sonda TaqMan® *GMO 35S Soy Detection Kit (Applied BioSystems)*, en un termociclador ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las fluorescencias detectadas fueron analizadas por el programa SDS 7000. La cuantificación del porcentual OGM en las muestras fueron obtenidas en base a la diferencia entre los valores de C_T del gen estudiado y del endógeno. . Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 20 µL, donde: 17,6 µL de *TaqMan® GMO 35S Soy PCR Mix*, 0,4 µL *AmpliTaq Gold® DNA polimerasa* y 400 ng de DNA molde. La reacción consiste de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 50 seg, 60 °C por 60 seg y 72 °C por 50 seg, y una etapa final de 72 °C por 5 min. Los resultados del evento GM fueron evaluados estadísticamente usando los siguientes parámetros: especificidad, rango dinámico lineal, la pendiente, coeficiente de correlación lineal, la eficiencia de PCR, límite de cuantificación y la precisión se evaluó de acuerdo con el protocolo de la JRC - CRLVL13/05VR (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis do ADN genómico total de soya

Los aislados de los extractos formulados presentaron una relación - OD₂₆₀/ □D₂₈₀, en media igual a 1,9. Las cuantificaciones fluorométricas de los aislados de ADN total de las formulaciones del extracto soluble fueron (236 ± 87) µg/ mL. Sin embargo, los productos de

la amplificación del gen de la lectina (157 pb) mostraron intensidad similar para todas las muestras (figura 1).

qPCR - Soya *roundup ready*®

La cuantificación de todos los extractos hidrosolubles fue realizada con el kit TaqMan® 35S *GM0*. En primer lugar, fueron realizados ensayos para garantizar que la soya orgánica utilizada en el estudio estaba libre del evento RR; y el agua libre de contaminación que resultaría en resultados no específicos (Tabla 2). La soya orgánica usada en este estudio no mostró ninguna señal (valor de C_T) para el evento o de contaminación por el virus CaMV. La leche de soya se considera un producto de procesamiento moderado (ROTT *et al.* 2004). Sin embargo, el resultado en % OMG en todos los protocolos de cuantificación sugiere que el ADN presentó un alto grado de degradación, debido a la baja correspondencia a las formulaciones elaboradas. Algunos estudios que analizaron productos similares presentaron resultados siempre menores que 0,9 %, no siendo necesario cumplir lo etiquetado en cualquiera de los países que regulan este tipo de mercado (BARROS *et al.*, 2008; DINON *et al.*, 2010; BRANQUINHO *et al.*, 2010). La detección del evento RR en *leche* de soya en productos altamente procesados sólo fue reportada cuando la PCR convencional es del tipo *Nested* PCR (BROD *et al.*, 2007; ZHANG, 2007), donde son necesarias dos reacciones de amplificación con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica, con un aumento considerable del costo analítico. El análisis del extracto hidrosoluble realizado con 100 %, 50 %, 25 % de soya RR, indica que el rango lineal dinámico del detector de fluorescencia es menor que 10 %, independiente del producto de amplificación evaluado. Sin embargo, Bernal & Holst-Jesen (2001) observaron que en muestras con un mínimo grado de procesamiento y contenido conocido de soya RR de 10 y 100 %, obtuvieron resultados indicando que la cuantificación absoluta podría ser realizada. El formulado 4 que contenía 5 % de soya RR mostró resultados aproximadamente de un 75 % menor que la masa de soya RR de la partida del procesamiento, que muestra que esta cuantificación no puede ser dada como absoluta para este tipo de muestra. El procesamiento industrial, los conservantes utilizados, la mezcla con pulpa o extractos de frutas dificultan el acceso a un ADN adecuado. Por lo tanto, la aplicación de protocolos para el análisis de la cadena productiva, es necesario para rastrear el origen del grano. Una vez que, dado el tipo de procesamiento y el porcentaje de la soya en el producto final, esa información no es transmitida de forma adecuada para el consumidor del producto o acompañar su uso después de la liberación comercial como determinado en la normativa (EC, 2003; BRASIL, 2011).

CONCLUSIÓN

Los resultados reportados en la Tabla 2 mostraron que, independientemente del método de cuantificación, la mezcla intencional o no, muestras de soya RR® no fueron posibles de resolver. Sin embargo, la leche sólo será capaz de ser etiquetado si las semillas de soya RR® está con un nivel mayor que 5 % en peso de granos de este procesamiento de la leche.

REFERENCIAS

Barros, N. E. F.; Oliveira, E. M. M.; Marin, V. A., Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos., *Revista de Nutrição*, 2008, v. 21, p. 83-90.

Berdal, K.G.; Holst-Jensen, A., Roundup Ready Soybean event-specific realtime quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, v. 213, p. 432-8.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4680_03.htm>. Acesso em: 11 jan 2012.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24.03.2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Disponível em <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/1034.html>>. Acesso em: 11 jan 2012.

BRASIL. Resolução Normativa Nº 9, de 2 de dezembro de 2011. Dispõe sobre as normas de monitoramento pós-liberação comercial de organismos geneticamente modificados. A Comissão Técnica Nacional De Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições legais e regulamentares, em observância às disposições contidas no inciso III do art. 14 da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, resolve: Art. 1º. O monitoramento pós-liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados – OGM ou sua isenção são regulados pelas normas constantes desta Resolução Normativa. Acesso em: 11 jan 2012.

Brod, F.C.A.; Ferrari, C.D.; Valente, L.L.; Arisi, A.C.M., Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk., *Lwt-food Science And Technology*, 2007, Vol.40(4), pp.748-751.

CELERES *celer.es.com.br/wordpress/wp-content/.../RelBiotecBrasil_1202_por.pdf*
Acessado em:02/09/2013.

European Commission (2003). Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament

and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Official Journal of the European Union, L 268, 1–23.

European Commission (2003). Regulation (EC) No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. Official Journal of the European Union, L 268, 24–28.

Felberg, I. ; Torrezan, Renata ; CABRAL, L. C. . Estabelecimento de condições adequadas para obtenção de leite de soja integral. . Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2003 (Comunicado Técnico (n.59)).

Germini, A. *et al.*. Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p. 3958-3962, 2005.

James, C.. Isaaa Brief 44-2012: Executive summary - global status of commercialized biotech/GM crops: 2013. Disponível em <<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/37/executivesummary/default.html>>. Acesso em: 09 set 2013.

JRC - CRLVL13/05VR: JRC validation report - Event-specific method for the quantification of soybean line A2704-12 using a real time PCR, 2007. Acesso em: set de 2013

Rosa, N.P.; RÉVILLION, J.P.P., Fatores estratégicos explorados pelas empresas processadoras de lácteos para inserir-se no mercado de bebidas à base de soja. *Ciência Rural*, 2011, v.41(6), pp.1108-1113.

Rott, M.E.; Lawrence, T.S.; Wall, E.M.; Green, M.J., Detection and quantification of Roundup Ready Soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction, *J Agric Food Chem*, 2004, v. 52, p. 5223-5232.

Zhang, M.; Gao, X.; Yu, Y; Ao, J.; Qin, J.; Yao, Y; Li, Q., Detection of Roundup Ready soy in highly processed products by triplex nested PCR., *Food Control*, 2007, v.18 (10), p.1277–1281.

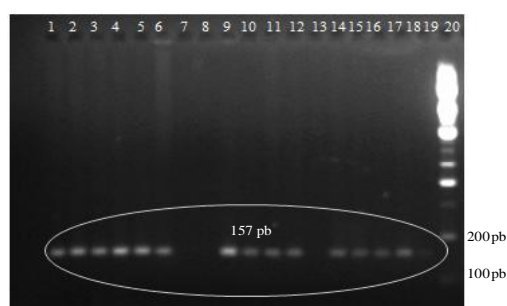


Figura 1. Productos de PCR cualitativa para detección del gen endógeno de la lectina en las leches de soja, en las formulaciones de los extractos hidrosolubles de soja y MRCs de soja RR. Línea (1). MRC 0%; (2) MRC 0,1%; (3) MRC 0,5%; (4) MRC 1,0%; (5) MRC 2,0%; (6) MRC 5,0%; (7) Padrón Fluka 0%; (8) Branco de la extracción%; (9) Agua utilizada en la preparación de la leche; (10) *leche* 0,1%; (11) *leche* 1%; (12) *leche* 2%; (13) *leche* 5%; (14) *leche* 10%; (15) *leche* 25%; (16) *leche* 50%; (17) *leche* con soja orgánica 100%; (18) *leche* con soja convencional 100%; (19) *leche* con soja RR 100%; (20) Padrón *Low mass* (Invitrogen)

Tabla 1. Formulaciones para producción de extracto hidrosoluble de soya con las concentraciones nominales conocidos de soya RR®.

Formulado	Soja RR (g)	Soja orgánica (g)	% RR®
(1)	0,1109	100,1196	0,1
(2)	1,0273	101,1340	1,0
(3)	2,0275	98,0457	2,0
(4)	5,0153	95,1163	5,0
(5)	10,1427	90,1603	10,0
(6)	25,0510	75,0321	25,0
(7)	50,0682	50,1190	50,0

Tabla 2. Cuantificación – Formulados de leche de soya RR®

	% RR
F (1): 0,1%	0,16
F (2): 1,0%	0,36
F (3): 2,0%	0,67
F (4): 5,0%	1,60
F (5): 10,0%	2,34
F (6): 25,0%	4,82
F (7): 50,0%	9,19
<i>Leche soya orgánica</i>	ND
<i>Leche soya convencional</i>	0,04
<i>Leche soya RR®</i>	41,5
Branco	ND
H2O	ND

ND – no detectable.