

# Investigación de alimentos transgénicos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

A. Zamora Benito<sup>1</sup>, J.L. Rodríguez-Marín Roy<sup>2</sup>, P. Sarmiento Pérez<sup>2</sup>, C. Mediavilla Bravo<sup>3</sup>,  
L.A. López Tomás<sup>2</sup>

*Med Mil (Esp) 2005; 61 (4): 334-337*

## RESUMEN

**Introducción:** En la Unión Europea cualquier alimento transgénico, entendiéndose por tal aquel que contenga o consista en organismos modificados genéticamente, destinado a la alimentación humana o animal, está regulado por el Reglamento (CE) n.º 1829/2003 que establece un umbral del 0,9% como límite superior aceptable en el caso de una contaminación accidental. Cualquier alimento que sobrepase este límite deberá ser etiquetado como «genéticamente modificado». Utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, se ha realizado un estudio prospectivo cualitativo y cuantitativo respecto a la presencia de ingredientes genéticamente modificados en alimentos de consumo habitual. **Material y método:** Se utilizó un equipo ABI Prism 7000 de la marca Applied Biosystems. La extracción del ADN se realizó con PrepMan™ Ultra. La amplificación de las secuencias génicas se hizo con los Kits TaqMan® GMO Soja 35S y TaqMan® GMO Maíz 35S. Se procesaron 100 muestras adquiridas en establecimientos de diferentes ciudades españolas. **Resultados:** El 98% de las muestras resultaron libres de organismos transgénicos. El 4% presentaron cantidades de soja transgénica entre el 0,3 y 0,6%. El 2% fueron positivos a otros transgénicos distintos de la soja o el maíz. **Conclusiones:** La técnica utilizada resulta adecuada a los fines perseguidos. La cantidad de organismos transgénicos, en los alimentos positivos cuantificados, fue inferior al límite de 0,9% establecido como límite máximo. El porcentaje relativamente bajo de alimentos positivos indica que el uso de los mismos en la industria alimentaria española no está muy extendido.

**PALABRAS CLAVE:** Alimento transgénico, PCR, OMG, GMO.

## INTRODUCCIÓN

El creciente interés que suscita en los consumidores la presencia de organismos transgénicos en productos alimenticios, ha llevado al Ministerio de Defensa, siguiendo las recomendaciones de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, a realizar controles en este sentido dentro de su ámbito de actuación.

Con tal motivo, el Servicio de Bromatología e Higiene de los Alimentos del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa, implantó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real y comenzó con dichos controles llevando a cabo entre julio y octubre de 2003 una campaña de análisis de este tipo de alimentos entre los potencialmente adquiribles por las Fuerzas Armadas.

Los OMGs u organismos transgénicos, son aquellos en cuyo genoma se ha incorporado de forma estable un segmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) exógeno, mediante la utilización de técnicas de ingeniería genética. Según la Directiva 2001/18/CE<sup>1</sup> se consideran OMGs aquellos organismos cuyo material genético ha sido modificado de una manera que no se produce de forma natural durante el apareamiento y recombinación de los cromosomas. Esta

Norma ha sido traspuesta al Derecho Español a través del Real Decreto 178/2004<sup>2</sup> en el que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente.

Los cultivos transgénicos utilizan plantas modificadas genéticamente que poseen nuevas propiedades. Así, se consiguen plantas resistentes a determinadas plagas de insectos, a microorganismos fitopatógenos, se aumenta la tolerancia a herbicidas o se mejoran las características nutricionales del alimento.

Se entiende por alimento transgénico, aquel que contiene uno o más ingredientes derivados de OMGs. En la Unión Europea (UE) actualmente, se encuentran autorizadas diversas variedades de soja y maíz modificadas genéticamente (MG) entre las que cabe citar la línea de soja GTS-40-3-2 comercializada como Roundup Ready (de la empresa Monsanto) resistente al herbicida glifosato de amonio (Roundup®), o las variedades de maíz Bt-176 y Bt-11 (de la empresa Novartis), o la Mon-810 (Monsanto) resistentes a la plaga del taldro y la T-25 (Aventis CropScience), resistente al insecticida glufosinato de amonio (Liberty®). Además de las citadas anteriormente, fuera de la UE, existen diversas variedades de trigo, arroz, tomate, colza y otros productos aprobados o pendientes de aprobación.

En los Estados Unidos, la Food and Drug Administration (FDA), no tiene una norma específica para el etiquetado de los alimentos transgénicos, de tal forma que el maíz y la soja habitualmente llegan a Europa sin ningún distintivo. Sin embargo, en la UE, se encuentra regulado el etiquetado de estos productos desde 1997. La normativa actualmente en vigor<sup>3</sup> estipula que todos los productos que contengan algún ingrediente con un porcentaje igual o superior a 0,9% de OMGs debe ser etiquetado como «genéticamente modificado». Este porcentaje se reduce hasta el 0,5%, en los casos

<sup>1</sup> Cap. Veterinario.

<sup>2</sup> Cte. Veterinario.

<sup>3</sup> Tcol. Veterinario.

Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Ministerio de Defensa. Madrid.

**Dirección para correspondencia:** Dr. D. Luis Ángel López Tomás. Servicio de Bromatología e Higiene de los Alimentos. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. C/ Dario Gazo, 3 28024. MADRID. Teléfono 91 509 10 00 Ext. 2210. Fax. 91 711 01 92.

Recibido: 11 de marzo de 2005.

Aceptado: 22 de septiembre de 2005.

en que se trate de OMGs que han recibido el visto bueno de los comités científicos, pero que todavía no han sido aprobadas por la UE. Algunos autores discuten sobre la interpretación y la posibilidad de aplicación real de dicho reglamento<sup>4</sup>.

La introducción de OMGs en el sistema actual de producción ha generado una serie de interrogantes acerca de las posibles consecuencias negativas. Las objeciones e inquietudes respecto a los cultivos transgénicos se pueden dividir en los siguientes grupos:

- Daño a la salud humana:
  - Posible aparición de reacciones alérgicas.
  - Transferencia horizontal de genes y resistencia a antibióticos.
  - Ingestión de ADN extraño.
  - Posibles efectos dañinos del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor utilizado como promotor en la mayor parte de las variedades transgénicas.
- Variaciones en las cantidades de nutrientes respecto a variedades no modificadas genéticamente.
- Daño al medio ambiente:
  - Flujo de genes desde los cultivos a la maleza.
  - Transmisión de resistencia a los antibióticos a microorganismos del suelo.
  - Filtración de proteínas transgénicas en el suelo.
  - Muerte de las larvas de la mariposa Monarca (*Danaus plexipus*) por efecto del polen del maíz Bt (toxina del *Bacillus thuringiensis*).
  - Posibles efectos a largo plazo del empleo masivo del herbicida Roundup<sup>®</sup>.
- Influencia sobre las prácticas actuales de cultivo:
  - Posibilidad de flujo de genes de un cultivo a otro.
  - Posible desarrollo de resistencias a los herbicidas y a la toxina Bt.
  - Influencia sobre los países menos desarrollados.

Aunque grandes poblaciones, (300 millones de personas en América y 1.000 millones en China) expuestas durante largos periodos a dietas que contienen OMGs aprobados, no presentan ningún signo clínico reseñable, y muchas de las objeciones al uso y consumo de OMGs carecen de fundamento científico, no cabe duda de que algunos aspectos requieren estudios más exhaustivos<sup>5</sup>.

Por otra parte, la existencia de determinados grupos de presión, la posible alarma social y la creciente opinión pública contraria al uso de estos productos, hace recomendable la implantación de estrictos programas de vigilancia<sup>5</sup>.

La técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real, especialmente la basada en sondas TaqMan, es considerada por algunos autores como la más potente para la cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos<sup>6</sup>. Así mismo, la Recomendación de la Comisión 2002/66/CE<sup>7</sup> la recoge como uno de los métodos analíticos más sensibles y específicos para verificar la fiabilidad del etiquetado. En general se trata de amplificar secuencias que se encuentran en la mayoría de los OMGs, como algunos promotores (promotor P-35S del virus del mosaico de la coliflor) y terminadores (terminador nos3' del gen nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*)<sup>8</sup>. Las reacciones de PCR en tiempo real utilizan sondas o cebadores marcados con fluoróforos, de manera que se produce un aumento en el rendimiento cuántico como consecuencia de la interacción de la sonda con el ADN en algún momento del ciclo de PCR<sup>9</sup>. Como control de referencia se emplea una secuencia específica de la especie vegetal<sup>10</sup>, obteniendo así la concentración de OMGs normalizada en función de la concentración de ADN de la

especie vegetal en la muestra<sup>11</sup>, que suele expresarse como porcentaje de OMGs en peso<sup>12</sup>.

Los objetivos del presente trabajo fueron dos, por una parte, comprobar la eficacia de la técnica de PCR implantada, y por otra, realizar un estudio prospectivo cualitativo y cuantitativo respecto a la presencia de ingredientes genéticamente modificados en alimentos de consumo habitual.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizó un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 de la marca Applied Biosystems (AB) que actúa de forma simultánea como termociclador y como espectrofotómetro. La extracción del ADN se realizó con el Reactivo de Preparación PrepMan<sup>™</sup> Ultra (AB p/n 4318925) según protocolo de empleo<sup>13</sup>, conservándose posteriormente a temperatura de -20 °C en tubos Eppendorf<sup>®</sup>.

Para la amplificación de las secuencias génicas se emplearon los Kits de detección TaqMan<sup>®</sup> GMO Soja 35S (AB p/n 4327691) y TaqMan<sup>®</sup> GMO Maíz 35S (AB p/n 4327690) de acuerdo a las especificaciones de uso del fabricante<sup>14</sup>. Las condiciones de trabajo del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial y activación de la ADN polimerasa (94 °C, 9 minutos), seguida de 40 ciclos de los tres pasos siguientes, desnaturalización (95 °C, 20 segundos), unión de los cebadores (60 °C, 1 minuto) y extensión (72 °C, 30 segundos).

En una primera etapa se realizó un análisis cualitativo de todas las muestras motivo de estudio. Posteriormente aquellas que resultaron positivas, se cuantificaron por triplicado, de tal forma que se pudiera obtener un resultado medio más representativo, o en su caso eliminar alguna de las determinaciones en las que no se hubiera desarrollado la reacción de PCR de forma adecuada. Las rectas de calibración se elaboraron a partir de los valores obtenidos tras procesar por triplicado y simultáneamente con las muestras, dos conjuntos de patrones certificados de maíz y de soja de la marca Fluka Biochemika con porcentajes conocidos de material transgénico (0,1%, 0,5%, 1%, 2% y 5%) utilizando las funciones del programa EXCEL de Microsoft<sup>®</sup>.

En caso de detectar la presencia del gen 35S y resultar negativa la del gen de soja o maíz, el método permite estimar de forma cualitativa la presencia de un OMG de una especie distinta a la soja o el maíz. Por defecto cuando se produce la circunstancia anterior consideramos que la muestra presenta en su composición un ingrediente transgénico, aunque también podría indicar una contaminación por virus del mosaico de la coliflor, circunstancia muy poco probable pero no descartable de forma absoluta.

Se analizaron un total de 100 muestras adquiridas en establecimientos mayoristas y minoristas de diferentes ciudades españolas. Se seleccionaron preferentemente aquellas que contuvieran en su composición maíz, soja o derivados, tales como: caldos, sopas y cremas deshidratados, galletas y otros productos de repostería, alimentos energéticos, concentrados proteicos, etc.

## RESULTADOS

### Análisis cualitativo

El 94% de las muestras resultaron estar libres de OMGs. Un 4% contenían en su composición soja MG y ninguna contenía maíz

**Tabla I:** Resultados cualitativos y cuantitativos de OMGs en las muestras analizadas.

PRODUCTO	N.º DE MUESTRAS ANALIZADAS	N.º DE MUESTRAS POSITIVAS A SOJA GM	CANTIDAD DE SOJA GM	MUESTRAS POSITIVAS A MAÍZ GM	MUESTRAS POSITIVAS A OTROS OMGs
Harina de maíz	3	0	—	0	0
Pastas alimenticias	8	0	—	0	0
Productos de pastelería	44	0	—	0	0
Conservas	7	0	—	0	0
Preparados para caldos	19	0	—	0	1
Preparados para sopas	7	0	—	0	1
Preparados para flanes	8	0	—	0	0
Concentrados cárnicos deshidratados	2	2	0,6% ± 0,2%	0	0
			0,5% ± 0,4%		
Complementos energéticos	2	2	0,5% ± 0,1%	0	0
			0,3% ± 0,1%		

**Figura 1:** Distribución porcentual de OMGs en las muestras analizadas.

MG. Por otra parte, en un 2% de las muestras, se amplificó la secuencia del promotor P-35S, que indica la presencia de un ingrediente transgénico que no se corresponde con la soja ni con el maíz (Fig. 1).

### Análisis cuantitativo

La cuantificación de las muestras que contenían soja transgénica rindió en todos los casos porcentajes inferiores al 0,9% con desviaciones típicas comprendidas entre 0,1 y 0,4 (Tabla I). Las características del método no permitieron cuantificar los ingredientes transgénicos hallados en unos de los preparados del caldo y de sopa al tratarse de ingredientes distintos del maíz y la soja.

### DISCUSIÓN

La técnica implantada de PCR cuantitativa en tiempo real, resulta adecuada para la mayor parte de los alimentos ya que es muy sensible y permite la detección y cuantificación de OMGs de soja y maíz en los porcentajes exigidos por la normativa vigente. Únicamente aquellas matrices muy ricas en grasa, dan lugar extracciones de ADN más pobres cuestión a tener en cuenta cuando el ingrediente problema es minoritario dentro del alimento.

La mayor parte de las muestras analizadas (94%), se encuentran libres de OMGs y solo un porcentaje relativamente bajo del 6% pre-

senta en su composición algún ingrediente transgénico lo que indica que el uso de estos productos en la industria alimentaria española no está muy extendido. La cantidad de soja MG en los alimentos positivos cuantificados, fueron en todos los casos, inferiores al límite de 0,9% establecido como máximo por la legislación. Aunque, si tenemos en cuenta las desviaciones típicas, alguno de los productos podría alcanzar, ese máximo. Respecto al etiquetado de los productos, ninguno de los fabricantes hace mención a la presencia o ausencia de ingredientes derivados de OMGs.

En un estudio realizado en Alemania, cuyos datos se publicaron en el año 2000, se puso de manifiesto la presencia de soja MG en el 19% de los productos analizados. Un 23,5% de estas muestras presentaban porcentajes superiores al 1%<sup>15</sup>.

Fuera del ámbito de la UE cabe mencionar un trabajo realizado recientemente en Canadá, en el que se detectó soja MG en el 72% de los alimentos derivados de soja analizados. De ellos, el 20,5% presentaban cantidades superiores al 5% de soja MG<sup>16</sup>. En otro estudio hecho en Japón entre noviembre del 2000 y marzo del 2003 resultaron positivas a soja MG el 23,6% de las muestras de soja, (con cantidades entre el 0,1-1,4%), el 8,1% de las muestras de tofu, y del 75 al 100% de algunos productos típicos japoneses como en nama-age, la yuba o el aburage<sup>17</sup>. Finalmente, reseñar los resultados del un muestreo realizado en Moscú en el que se detectó soja MG en el 17,2% de los alimentos analizados<sup>18</sup>.

Como se puede apreciar, en nuestro caso hemos detectado la presencia de OMGs en porcentajes inferiores a los citados por otros autores y a la vista de los resultados, algunos productos dietéticos, como los complementos energéticos o los concentrados proteicos, parecen ser los más susceptibles de contener ingredientes MG.

Aunque este trabajo ha puesto de manifiesto que la presencia de alimentos transgénicos es relativamente baja en el ámbito estudiado, la incesante evolución de la industria alimentaria y la fácil circulación de las materias primas hace recomendable continuar y ampliar los sistemas de vigilancia.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de marzo de 2001 sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea n.º L 106 de 17 de abril de 2001, 1-39.
2. Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se

- establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. Boletín Oficial del Estado n.º 27 de 31 de enero de 2004, 4171-4216.
3. Reglamento (CE) 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. Diario Oficial de la Unión Europea n.º L 268 de 18 de octubre de 2003, 1-23.
  4. Werner A, Kniel B, Berg U. The new regulations for labelling and traceability of GMOs are they applicable? Deuts. Lebensm. Rundschau 2004; 100: 165-176.
  5. Papparini A, Romano-Spica V. Public health issues related with the consumption of food obtained from genetically modified organisms. Biotechnol. Annu. Rev. 2004; 10: 85-122.
  6. Weighardt F, Barbati C, Paoletti C, Querci M, Kay S, De Beuckeleer M et al. Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 Zea mays event. J. AOAC Int. 2004; 87: 1342-1355.
  7. Recomendación de la Comisión 2002/66/CE, de 25 de enero, concerniente al programa coordinado para el control oficial de productos alimentarios para 2002. Diario Oficial de la Unión Europea n.º L 26 de 25 de enero de 2002, 8-16.
  8. McCormick CA, Griffin HG, Underwood HM, Gasson JM. Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. J. Appl. Microbiol. 1998; 84: 969-980.
  9. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. BioTechniques 1997; 22: 130-138.
  10. Hernández M, Río A, Esteve T, Prat S, Pla M. A rapeseed-specific gene, acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and Real-Time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 3622-3627.
  11. Einspanier R. Quantifying genetically modified material in food: searching for a reliable certification. Eur. Food Res. Technol. 2001; 213: 415-416.
  12. Wurz A, Bluth A, Zeltz P, Pfeifer C, Willmund R. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. Food Control 1999; 10: 385-389.
  13. Applied Biosystems. Protocolo de empleo del Reactivo de Preparación de la muestra PrepMan™ Ultra. Part Number 4318925. USA. 2001.
  14. Applied Biosystems. Guía del Usuario del Kit de Detección TaqMan® GMO. Part Number 4327687 Rev A. USA. 2001.
  15. Hagen M, Beneke B. Detection of genetically modified soy (Roundup-Ready) in processed food products. Berl. Munch Tierarztl Wochenschr 2000; 113: 454-458.
  16. Rott M, Lawrence T, Wall E, Green M. Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real time polymerase chain reaction. J. Agric. Food Chem. 2004; 11: 5223-5232.
  17. Monma K, Araki R, Ichikawa H, Sato K, Tobe T, Kuribara H, et al. Detection of genetically modified organisms from food samples obtained. J. Food Hyg. Soc. of Japan 2004; 45: 184-190.
  18. Tutel'ian VA, Filatov NN, Sorokina E, Chernysheva O, Salova N, Sizykh E, et al. Monitoring of food products from genetically modified sources in Moscow. Vopr. Pitan. 2003; 72: 20-23.