

Detección y Cuantificación del Promotor 35S en productos alimenticios de maíz mediante PCR en tiempo real en Lima, Perú

Detection and quantification of the 35S promoter in maize food products by real time PCR in Lima, Perú

Recibido: 30 de noviembre de 2022 | Revisado: 21 de febrero de 2023 | Aceptado: 5 de junio de 2023

Carmen Rosa Méndez Farro¹
Germán Vergaray Ulffe²

Abstract

There is significant scant reliable information on mass consumption food products that contain transgenic components and on the number of copies of transgenic DNA present in each one; Therefore, the objective of the research was to detect and quantify the sequence of the 35S Promoter and demonstrate the efficiency and practicality of the Real-Time Polymerase Chain Reaction method (Real-Time PCR), in corn food products that are marketed in the city of Lima. Fifty samples of mass-consumption corn food products were molecularly analyzed in 2019. The DNeasy mericon Food kit was used for DNA extraction, the Real-Time PCR method using the mericon Screen 35S kit for P35S detection, and the mericon Screen 35S kit for P35S detection. quantification of copies using the mericon QUANT MON 810 kit. It was found that 62% of the samples analyzed contain copies of the P35S sequence, 32.26% correspond to products made abroad; the sample with the highest concentration of copies is that of corn flakes with 4.12E+4 copies/g of sample and those with the lowest are those of corn flour and pop corn with 5.0E+2 copies/g. It is concluded: in Lima - Peru the commercialization and intake of corn food products is high and that Real-Time PCR is an efficient and practical method to detect and quantify the 35S Promoter sequence in corn food products.

Keywords: Corn food, transgenic food, real-time PCR, P35S, commercialization.

Resumen

Es significativa la escasa información confiable sobre los productos alimenticios de consumo masivo que contienen componentes transgénicos y sobre la cantidad de copias de ADN transgénico presente en cada uno; por lo que el objetivo de la investigación fue detectar y cuantificar la secuencia del Promotor 35S y demostrar la eficiencia y practicidad del método Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR), en productos alimenticios de maíz que se comercializan en la ciudad de Lima. Se analizaron molecularmente 50 muestras de productos alimenticios de maíz de consumo masivo en el 2019. Para la extracción del ADN se utilizó el kit DNeasy mericon Food, para la detección del P35S el método Real-Time PCR empleando el kit mericon Screen 35S y para la cuantificación de copias el kit mericon QUANT MON 810. Se encontró que el 62% de las muestras analizadas contienen copias de la secuencia del P35S, el 32,26% corresponde a productos elaborados en el extranjero; la muestra con mayor concentración de copias es la de hojuelas de maíz con 4,12E+4 copias/g de muestra y las que tienen menor, son las de harina de maíz y maíz pop corn con 5,0E+2 copias/g. Se concluye: en Lima - Perú es elevada la comercialización e ingesta de productos alimenticios de maíz y que la Real-Time PCR es un método eficiente y práctico para detectar y cuantificar la secuencia del Promotor 35S en productos alimenticios de maíz.

Palabras Clave: Alimentos de maíz, alimentos transgénicos, real-time PCR, P35S, comercialización.

Este artículo es de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International



¹ Escuela Universitaria de Posgrado – UNFV. Lima, Perú
Correo: cmendezf@unmsm.edu.pe
<https://orcid.org/0000-0002-8982-9127>

² Universidad Nacional Mayor de San Marcos – UNMSM. Lima, Perú
Correo: gvergaray@unmsm.edu.pe
<https://orcid.org/0000-0003-1245-159X>

<https://doi.org/10.24039/rcvp2023211676>

Introducción

Desde la introducción de los alimentos transgénicos en el mercado mundial en 1996, existe una preocupación creciente por los cultivos de organismos genéticamente modificados (OGM) debido a los riesgos y beneficios que pueden ocasionar, surgiendo así la necesidad de investigarlos; por ello, Zhang et al. (2016) y Kumar et al. (2020) recomiendan tomar en consideración 6 problemas principales: crecimiento de la población mundial, necesidad de alimentos, costo, disminución de la tierra cultivable, limitaciones del cultivo convencional y cambio climático.

Esta situación ha motivado la necesidad de que, en el mundo académico y comercial, la producción e ingesta de alimentos transgénicos haya desencadenado un intenso debate en las últimas décadas, tanto a nivel internacional como al interior de muchos países, generando dos posiciones opuestas (Arcieri, 2016; Coelho-Costa, 2021; Krinsky, 2019, Moreira y Rampazzo, 2021; Uslu, 2021; Zhang et al., 2016). Los que consideran que son beneficiosos porque proveen mayor cantidad de alimentos y mejora su calidad nutritiva favoreciendo la salud física y mental, aumenta la productividad de los cultivos, favorece al medio ambiente y mejora la economía de los países (Leguizamón et al., 2018; Potrykus, 2017); y los que consideran que son perjudiciales, por ser de elevado riesgo para la salud humana (Ibrahim y Okasha, 2016; Shen et al., 2022), la sostenibilidad del medio ambiente y la economía de las poblaciones.

Respecto a los efectos perjudiciales de la producción e ingesta de alimentos transgénicos se presentan los tres casos. En el primero, debido a que pueden ocasionar alergias, cáncer, disminución de la capacidad de aprendizaje y anomalías en diferentes órganos; además, resistencia a los antibióticos y alteraciones en los niveles de nutrientes del producto alimenticio (Acosta, 2016; Aris y Leblanc, 2011; Cleveland et al., 2005; Ewen y Pusztai, 1999; Ibrahim y Okasha, 2016; Seralini et al., 2014; Shen et al., 2022; Traversa, 2021; Vásquez-Padrón et al., 2000). Debido a que los estudios al respecto se han realizado principalmente en animales y no son lo suficientemente convincentes, y a que los realizados en humanos no son concluyentes; se requiere de más ensayos clínicos y estudios de cohortes a mediano y largo plazo en poblaciones humanas. En el segundo, la aparición o aumento de plantas invasoras y malezas, resistencia de plagas de insectos, producción de sustancias tóxicas (Andow, 2001; Baumgarte y Tebbe, 2005; Heap, 2018; Mota-Sánchez, 2013), y contaminación genética de plantas nativas; en este último caso debido a que una vez que los cultivos transgénicos son liberados en un territorio en donde existen especies parientes silvestres

y variedades criollas, la contaminación genética de sus semillas es prácticamente inevitable e irreversible, puesto que los genes modificados se pueden incorporar al genoma de las variedades no transgénicas, alterando irreparablemente la reserva tradicional de semillas que tienen los pueblos y las comunidades nativas y campesinas (Ellstrand, 2003; Intriago y Bravo, 2015; Pusztai, 2006; Trejo-Pastor et al., 2021). En el tercero, debido a que puede afectar la economía, en especial de los países en vías de desarrollo, siendo necesario agregar el peligro social que entraña el oligopolio sobre las semillas transgénicas e insecticidas, ejercido por megaempresas transnacionales (Acosta y Guerrero, 2007; Ardisana et al., 2019; Gouttefanjat, 2021).

La detección de alimentos que contienen OGM se puede lograr mediante métodos específicos como la detección de moléculas de ADN y con menor frecuencia de moléculas de ARN, utilizando las técnicas de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR), reacción en cadena de la polimerasa digital (dPCR), PCR multiplex, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), microarreglos, secuenciación de nueva generación (NGS), multiplex fluorescent (Ertugrul et al., 2008; Leguizamón et al., 2018; Park et al., 2020); y mediante la detección de proteínas utilizando las pruebas de Western blot, inmunoelectroforesis, espectrofotometría, inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), inmunotinción e inmunoprecipitación (Bektas, 2018; Daniel y Alcochete, 2011; Erkan y Dastan, 2017). Para seleccionar una técnica es necesario considerar su especificidad, sensibilidad, exactitud, reproducibilidad, practicidad, rapidez y costo. Algunos especialistas consideran que la técnica Real-Time PCR es la más conveniente para detectar organismos genéticamente modificados y cuantificar la concentración de copias de ADN transgénico, por su aplicabilidad, especificidad y sensibilidad (Branquinho et al., 2012; Leguizamón et al., 2018); inclusive ha permitido detectar trazas de alimentos transgénicos (Leao-Buchir, 2018; Santa-María et al., 2014).

La detección del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) mediante la técnica Real-Time PCR ha demostrado ser útil en la detección de componentes derivados de plantas transgénicas que se encuentran en productos alimenticios industrializados; también se utiliza con frecuencia en la detección de secuencias de ADN transgénico en la mayoría de los cultivos (Chibuzor et al., 2018; Louanchi et al., 2017); inclusive Wu et al. (2014) desarrollaron un método general para detectar y cuantificar específicamente el Promotor 35S, tomando como base los métodos existentes.

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta gramínea originaria de Perú, aunque también se asigna su origen a México (Grobman et al., 2012), que se extendió por

todo el mundo debido a su producción anual y a su capacidad de desarrollarse en diversos climas; es el cereal con mayor volumen de producción a nivel mundial, superando al trigo y al arroz. Es un alimento que tiene granos ricos en nutrientes; actualmente el maíz se siembra principalmente con semillas híbridas y semillas genéticamente mejoradas; su genoma tiene de 50,000 a 60,000 genes. Mediante técnicas de ingeniería genética, el maíz natural o convencional ha sido modificado genéticamente, se le ha adicionado tres características principales, tolerancia a los herbicidas, resistencia a los insectos y tolerancia a la sequía; las cuales han permitido elevar notablemente su productividad. Tiene 218 eventos genéticamente modificados aprobados y disponibles a nivel comercial para cultivos biotecnológicos, que son utilizados directamente o procesados como alimento o forraje en numerosos países (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - ISAAA, 2016).

Se estima que la producción mundial de maíz amarillo duro para el periodo 2021-2022 sería de 1,189,854 millones de Toneladas, de acuerdo con el Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA, 2021).

El Perú no se autoabastece de maíz; en 2021 importó 3,650,194,020 K de maíz amarillo duro por un valor de 1,072,053,296 dólares (CIF US), principalmente de Argentina y Estados Unidos de América, dos de los principales países productores de maíz transgénico en el mundo (AGRODATA Perú, 2022).

Estudios realizados en Angola, Uruguay, Turquía, Irán, Portugal y Corea del Sur demostraron la presencia de secuencias transgénicas en muestras de productos alimenticios industrializados que tienen como componente principal al maíz (Baran y Özcelik, 2018; Daniel y Alcochete, 2011; Fernandes et al., 2014; Fernández et al., 2012; Kim et al., 2014; Ozgen et al., 2013; Rabiei et al., 2013).

La cuantificación de copias de ADN extraño en productos alimenticios industrializados aumentó su importancia desde que la Comisión Europea, en base al principio de precaución, consideró que la inserción de numerosas copias podría estar relacionada con riesgo para la salud humana (World Travel Organization - WTO, 2004). Por ello, se hacen necesarios los análisis cuantitativos que indican la proporción de OGM en la muestra, además de los cualitativos que sólo indican la presencia o ausencia de OGM. La aplicación de Real-Time PCR cuantitativa permite determinar si la muestra está dentro del umbral de OGM establecido por la norma de cada país; que puede ser más o menos flexible y que varía usualmente entre 0,1% a 0,9% (Agro-Bio, 2021).

El objetivo del presente estudio fue detectar y cuantificar la secuencia génica del Promotor 35S

en productos alimenticios procesados de maíz que se comercializan e ingieren masivamente en la ciudad de Lima, y demostrar la eficiencia y practicidad del método Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR) para ello.

Materiales y métodos

Para el estudio se procedió a adquirir productos alimenticios de maíz herméticamente envasados y de marcas conocidas, en diferentes locales de expendio de la Ciudad de Lima Metropolitana; en cada muestra se realizó la extracción del ADN utilizando el Kit DNeasy mericon Food. Para la detección y cuantificación del Promotor 35S se empleó el método Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR). Finalmente, se efectuó el control y análisis de datos aplicando la optimización de la ganancia y las pruebas de repetibilidad.

Recolección de Muestras

En mercados y supermercados de distintos sectores de la ciudad de Lima Metropolitana se recolectaron muestras de 50 (tres de cada uno) productos alimenticios industrializados elaborados con maíz, de consumo masivo, de diferentes marcas. 36 elaborados en el Perú, cinco en Chile, tres en Estados Unidos de América (EUA), dos en México, uno en Bolivia, uno en Colombia, uno en Italia y uno en Suiza. 35 fueron de maíz extruido, 6 de harinas y sémolas de maíz y 9 de granos enteros de maíz.

Procedimientos

Extracción de ADN

Previo a la extracción se lavó el material a usar en la molienda con el detergente dextran, luego se le esterilizó y se le trató con solución de Rnasa Away para eliminar interferencias. En cada mortero de pulverización se colocó 10 gramos de la muestra y se le agregó nitrógeno líquido para enfriarla. Esta actividad se realizó en una cabina de flujo laminar, garantizando la desinfección del área en la molienda de cada muestra y utilizando contenedores individuales para evitar la contaminación.

La extracción del ADN se realizó de acuerdo con lo establecido en el Kit DNeasy mericon Food Código 69514 (Qiagen, 2014). Se verificó que todos los reactivos del DNeasy mericon Food estén debidamente preparados. Se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL, 200 mg de la muestra del alimento pulverizado y homogeneizado, se adicionó 1 mL del tampón de lisis (Food Lysis Buffer) y 2.5 µL de la solución de proteinasa K, la mezcla se homogeneizó en un vortex para asegurar la disrupción completa y el humedecido total del material.

Se incubó por 30 min en un termomezclador a 60 °C en agitación constante (1000 rpm). Para facilitar la precipitación de inhibidores, se enfrió la muestra a temperatura ambiente (15°C – 25°C) o con hielo, y se centrifugó por 5 min a 2500 gravedades. Se transfirió 700 µL del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 2 mL que contenía 500 µL de cloroformo, se combinó cuidadosamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo para lograr una solución homogénea. Se agitó en el vortex por 15 segundos y se centrifugó por 15 min a 14000 gravedades.

Luego se transfirió 350 µL del sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL que contenía 350 µL del tampón BF y se mezcló por agitación en el vortex. Se pasó 600 µL de la mezcla a través de la columna de centrifugación QIAquick spin colocada en un tubo de recolección de 2 mL, se centrifugó por 1 min a 17900 g y se descartó el líquido. Se repitió el paso, reusando el tubo de recolección hasta centrifugar toda la mezcla, se añadió 500 µL del tampón AW2 a la columna de centrifugación QIAquick spin, y se centrifugó por 1 min a 17900 g, se eliminó el líquido, y se repitió el paso anterior para secar la membrana.

Luego se colocó la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se adicionó 100 µL de tampón EB sobre la membrana QIAquick spin, se incubó por 1 min a temperatura ambiente (15°C– 25°C) y finalmente se centrifugó por 1 min a 17900 g para la elusión.

La extracción se realizó por duplicado para mejorar la calidad de los resultados; se trabajó con 50 ng de ADN de cada muestra. Se midió la calidad de la extracción de ácidos nucleicos con el kit de detección (mericon Screen 35S), que permite la extracción de ácidos nucleicos de alta calidad de una variedad de alimentos crudos y procesados, mediante primers y sondas para la amplificación de un control interno, que permite detectar de manera directa la contaminación o inhibición de la PCR. Adicionalmente, se siguieron los protocolos estándares para la cuantificación de ADN; para ello, se procedió a realizar la corrida de electroforesis con cada una de las muestras frente a un marcador de peso del fago λ (10ng, 30 ng, 50 ng, 70 ng), la que nos permitió verificar la concentración del material inicial previo a la amplificación por la PCR.

Detección de la secuencia transgénica P35S (Análisis Cualitativo)

Se aplicó la metodología de Real-Time PCR utilizando el Rotor Gene Q, según el kit mericon Screen 35S Catálogo N° 291013 de QIAGEN (2011).

Para detectar la región promotora 35S, previamente se realizó la preparación del master mix + mericon Assay con las concentraciones adecuadas

de Taq ADN polimerasa, dNTPs, primers, MgCl₂ y sondas; para ello se adicionó 130 µL del Master Mix PCR Multiplex que contiene hotStarTaq Plus ADN Polimerasa, buffer o tampón específico para PCR multiplex en tiempo real y una mezcla de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) al frasco de mericon Assay que contiene sondas y cebadores específicos para la fracción transgénica 35S, así como el control interno (IC); que fue homogenizado por agitación en vortex.

Para la preparación de la muestra se siguió el siguiente protocolo: 10 µL de mezcla: Mericon Master Mix + Mericon Assays y 10 µL de la muestra de DNA. Asimismo, se preparó un control positivo que fue previamente hidratado con 200 µL de Tampon de Dilución de ADN Quantitec, homogenizado por pipeteo 5 veces y centrifugado (10 µL mezcla: Master Mix + Mericon Assay y 10 µL control positivo) y un control negativo (10 µL mezcla: Master Mix + Mericon Assay y 10 µL de agua libre de ARNasas NTC) mediante agitación en vortex. El volumen total fue de 20 µL en todos los casos.

Después de cerrar los tubos o strips, se les colocó en la cámara del termociclador Rotor Gene y se les aseguro; luego, se aplicó el protocolo de programación de ciclos de temperatura del equipo, de acuerdo con las instrucciones específicas del fabricante Qiagen (Qiagen 2011). Para el paso de activación de la Taq DNA Polimerasa: 95° C x 5 minutos y para los 3 pasos de ciclos; denaturalización: 95° C x 15 s, alineamiento: 60°C x 15 s y extension: 72° C x 10 s), número de ciclos: 45. El DNA objetivo se reportó en FAM a 495/520 nm en el canal verde y el control interno en MAX a 524/557 nm canal amarillo.

La prueba Real-Time PCR se realizó por duplicado para cada muestra y como control negativo ambiental en las corridas de amplificación se utilizó un control interno que se agregó en cada muestra, así como un control positivo y otro negativo del kit, debido a que si hubiese contaminación y/o inhibición, afectaría a la amplificación del control interno.

Número de copias de la secuencia transgénica P35S (Análisis Cuantitativo)

Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración preparada con 3 valores de referencia conocidos de copias de DNA: 2,000, 20,000 y 200,000 copias del gen, finalmente se evaluaron las muestras positivas. Para la preparación de la curva estándar se empleó un control positivo de cuantificación del kit mericon (mericon QUANT MON 810, Catálogo N°291524) y como blanco de corrección de muestras y estándares agua deionizada libre del analito y de interferencias, luego se realizaron las diluciones correspondientes. Posteriormente se procedió a agregar la muestra de acuerdo a la Tabla 1.

Tabla 1*Esquema de Preparación de Reactivos - Análisis Cuantitativo*

Componente	Estándar de cuantificación	Control Positivo	Muestra	Control Negativo
Mezcla Master Mix + mericon assay	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Curva de calibración*	10 µL			
ADN control Positivo		10 µL	-	-
Muestra de ADN		-	10 µL	-
Agua libre de RNAsas NTC		-	-	10 µL
Volumen Total		20 µL	20 µL	20 µL

Nota. * = Correspondiente a cada dilución de la curva estándar respectiva: cuatro viales.

Se cerraron los tubos de PCR o strips, se colocaron en la cámara del Termociclador Rotor Gene y se les aseguró. Posteriormente se aplicó el protocolo de paso de activación de la Taq ADN Polimerasa y los 3 pasos de ciclos (similar al análisis cualitativo).

Para calcular el número de copias de la secuencia del P35S por gramo de muestra se procesaron los resultados obtenidos como N° de copias, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Resultado (copias/g)} = \frac{\text{Resultado (N° copias)} \times \text{Volumen de elución (µL)}}{\text{Peso de la Muestra (g)}}$$

Datos:
 Volumen de elución: 50 µL
 Peso de la Muestra: 0,200 g
 N° de copias: El que se indica

Control y Análisis de datos

En todos los procesos se utilizaron controles positivos y negativos; al proceso Real-Time PCR se le aplicó la optimización de la ganancia desde la primera adquisición.

Para evaluar la consistencia de los resultados se realizaron pruebas de repetibilidad y se midió la desviación estándar relativa de la repetibilidad; y para garantizar la exactitud se trabajó con el control positivo que demostró estabilidad, homogeneidad y trazabilidad. Se tomó en consideración como criterio de la desviación estándar relativa el límite de 25%, de acuerdo con lo referido por Kralik y Ricchi (2017) y Broeders et al. (2014).

El Límite de Detección fue determinado por el fabricante del kit y es de 10 copias /reacción y el límite de cuantificación por definición, es aquel intervalo en el cual se determina la precisión con cierto grado de variabilidad aceptable (Broeders et al., 2014; European Commission, 2015); que es la cantidad más baja con

la que se obtiene resultados cuantitativos con una exactitud aceptable; que se determinó de acuerdo con los resultados obtenidos.

Resultados

Detección de la secuencia transgénica P35S, en productos alimenticios de maíz

El estudio demostró la presencia de la secuencia transgénica P35S en el 62% (31) de 50 muestras analizadas de productos alimenticios industrializados de maíz, que se comercializan masivamente al detalle en mercados y supermercados de la ciudad de Lima. Los productos se expendían en bolsas especiales de plástico y en cajas de cartón que contenían entre 24 g y 1,000 g, y entre 350 g y 500 g respectivamente.

Del total de muestras positivas, el mayor porcentaje 67,74% (21) fue fabricado en el Perú, el 12,9% (4) en Chile, el 9,68% (3) en Estados Unidos de América, el 6,45% (2) en México y el 3,23% (1) en Colombia. Tabla 2.

Tabla 2*Esquema de Preparación de Reactivos - Análisis Cuantitativo*

Código	Producto	País	Presentación
C01	Cereal de maíz	Colombia	Caja de 500 g
C02	Hojuelas de maíz con azúcar	México	Caja de 350 g
C03	Hojuelas de maíz	Chile	Caja de 400 g
C04	Cereal integral a base de maíz	Chile	Caja de 480 g
C06	Hojuelas azucaradas	Chile	Caja de 400 g
C08	Cereal de maíz	Chile	Caja de 500 g
C12	Hojuelas de maíz azucarada	Perú	Bolsa de 200 g
C13	Hojuelas de maíz	México	Bolsa de 200 g
C14	Hojuelas de maíz	Perú	Bolsa de 500 g
S01	Maíz gigante el cuzco frito	Perú	Bolsa de 100 g
S02	Palomitas de maíz	EUA	Bolsa de 100 g
S05	Maíz chulpi	Perú	Bolsa de 200 g
S06	Maíz salado	Perú	Bolsa de 100 g
S07	Cancha chulpi	Perú	Bolsa de 180 g
S08	Tortilla de maíz	Perú	Bolsa de 65 g
S09	Nachos de maíz morado	Perú	Bolsa de 90 g
S13	Palitos de maíz sab. queso mantequilla	Perú	Bolsa de 43 g
S14	Palitos de maíz	Perú	Bolsa de 20 g
S15	Palitos de maíz sab. queso mantequilla	Perú	Bolsa de 24 g
S20	Maíz gigante original	Perú	Bolsa de 200 g
S22	Maíz expandido con miel	Perú	Bolsa de 140 g
S23	Hojuelas de maíz con sal	Perú	Bolsa de 200 g
S24	Palomitas de maíz crocantes dulcecitos	Perú	Bolsa de 70 g
SE01	Sémola de maíz sin germen	Perú	Bolsa de 350 g
H01	Harina de maíz precocido	EUA	Bolsa de 1 kg
H02	Harina de fécula de maíz	Perú	Bolsa de 500 g
H03	Harina de fécula de maíz	Perú	Bolsa de 180 g
H04	Harina de fécula de maíz	Perú	Bolsa de 180 g
M01	Maíz pop corn	Perú	Bolsa de 350 g
M04	Maíz cancha desgranado	Perú	Bolsa de 425 g
M06	Palomitas de maíz para microondas	EUA	Bolsa de 91 g

Nota. C, S = maíz extruido; SE = sémola de maíz; H = harina de maíz; M = maíz grano entero.

Cuantificación de la secuencia transgénica P35S, en productos alimenticios de maíz

Cuando se cuantificó el ADN transgénico de cada muestra positiva, la evaluación transversal indicó que las copias de la secuencia transgénica P35S correspondían a valores que oscilaban entre 5.00E+2 copias/g de muestra y 4,12E+4 copias/g de muestra.

Los tres grupos de productos alimenticios analizados presentaron muestras positivas, el 65,71% (23) de maíz extruido, el 83,33% (5) de harinas y sémolas de maíz y el 33,33% (3) de granos enteros de maíz. Tabla 3.

Tabla 3

Cuantificación de copias del P-35S en 3 productos alimenticios de maíz

Número	Código	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var	P-35S Copias/g
1.	C01	39.21		118		2.95E+04
2.	C02	39.14		25		6.25E+03
3.	C03	38.72		165		4.12E+04
4.	C04	39.73		84		2.10E+04
5.	C06	39.82		78		1.95E+04
6.	C08	39.91		74		1.85E+04
7.	C12	41.13		32		8.00E+03
8.	C13	39.67		15		3.75E+03
9.	C14	39.61		79		1.80E+04
10.	S01	40.24		27		6.75E+03
11.	S02	39.82		75		1.87E+04
12.	S05	41.18		31		7.75E+03
13.	S06	42.43		10		2.50E+03
14.	S07	42.51		9		2.25E+03
15.	S08	42.78		8		2.00E+03
16.	S09	42.98		5		1.25E+03
17.	S13	42.76		8		2.00E+03
18.	S14	42.53		9		2.25E+03
19.	S15	43.3		7		1.75E+03
20.	S20	43.15		8		2.00E+03
21.	S22	43.48		6		1.50E+03
22.	S23	43.84		5		1.25E+03
23.	S24	43.88		5		1.25E+03
24.	SE01	44.34		6		1.50E+03
25.	H01	45.31		2		5.00E+02
26.	H02	43.33		7		1.75E+03
27.	H03	43.82		5		1.25E+03
28.	H04	44.72		3		7.50E+02
29.	M01	45.11		2		5.00E+02
30.	M04	45.05		7		1.75E+03
31.	M06	43.42		4		1.00E+03
qs1	Standard	28.34	200,000	185,244	7.40%	
qs2	Standard	31.4	20,000	23,313	16.60%	
qs3	Standard	35.15	2,000	1,852	7.40%	
Control	C. Positivo	38.62		177		
	NTC	NTC				

Nota. C, S = maíz extruido; SE = sémola de maíz; H = harina de maíz; M = maíz grano entero; C. = Control.

Demostración de la eficiencia y practicidad del método RT-PCR

Los resultados del estudio permitieron comprobar la eficiencia y practicidad del método Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR) empleando el kit mericon Screen 35S con rotor Q, para detectar y cuantificar el promotor 35S en muestras de productos alimenticios industrializados que contienen maíz.

Discusión

Detección de la secuencia transgénica P35S, en productos alimenticios de maíz

El porcentaje de productos alimenticios de

maíz de consumo masivo que contiene la secuencia transgénica P35S es elevado (62%) en comparación con otros países como: Angola 40% (Daniel y Alcochete, 2011), Turquía 32,6% (Ozgen et al., 2013), Irán 20% (Rabiei et al., 2013), Argelia 24,17% (Louanchi et al., 2017), Nigeria 26,70% (Chibuzor et al., 2018), e inferior a una minoría, como el obtenido por Carvajal et al. (2017) en Costa Rica 86,10%. Estos reportes revelan el diferente porcentaje de productos alimenticios de maíz con componente transgénico que se comercializan en países de diferentes continentes. Estos datos demuestran la presencia significativa de alimentos fabricados con insumos transgénicos a nivel mundial, lo cual es útil para evaluar los riesgos potenciales para la salud. También es interesante destacar que, de acuerdo con los reportes encontrados, el mayor porcentaje de estudios publicados al respecto se han reportado en países en vías de desarrollo de África, Asia y América Latina; lo cual

revela la preocupación que existe sobre su consumo en dichos países.

Es de resaltar que la secuencia transgénica más frecuentemente detectada es la P35S, como lo demostraron en Costa Rica Carvajal et al. (2017), quienes al analizar 36 muestras de alimentos detectaron el P35S en el 86.0% y el TNOS (terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*) en el 72%, y en Turquía Ozgen et al. (2013) quienes al analizar 43 muestras de maíz detectaron el P35S en el 32,56% y el TNOS en el 11,63%; años después también en Turquía Erkan y Dastan (2017) al analizar 472 muestras de productos alimenticios diversos detectaron el P35S en el 10,17%, el TNOS en el 8,26% y el PFMV (promotor 34S del virus del mosaico de la higuera) en el 0,85%. Estos estudios demuestran la mayor presencia del P35S sobre las otras secuencias transgénicas usualmente utilizadas; por ello consideramos de importancia la detección del P35S para evidenciar componentes transgénicos y como un tamiz eficiente para detectar y cuantificar la secuencia transgénica específica de interés.

En los alimentos elaborados en el Perú, la presencia del P35S puede deberse a que: el maíz es de origen foráneo, se esté cultivando maíz genéticamente modificado ilegalmente, o exista contaminación genética accidental; debido a que, en el Perú por las moratorias del 2011 al 2035 no se pueden cultivar ni importar organismos vivos modificados genéticamente, pero sí insumos de origen transgénico para la alimentación de acuerdo con las Leyes N° 29811- 2011 y N° 31111- 2021. Tres de los países: Estados Unidos de América, Chile y Colombia, de los cuales el Perú importa productos alimenticios de maíz con componentes transgénicos, cuyas muestras hemos analizado en el presente estudio, cultivan maíz genéticamente modificado y México lo importa de Estados Unidos de América. El 100% de los productos importados de América del Norte (Estados Unidos de América y México) contiene componente transgénico y el 100% de los importados de Europa (Italia y Suiza) no; en estos dos últimos países está prohibido el cultivo de vegetales transgénicos, y su consumo es restringido. Aunque el número de muestras es poco significativo, el dato es interesante. En los países limítrofes Colombia, Brasil, Bolivia y Chile se cultiva maíz transgénico (Ardisana et al., 2019); lo cual hace posible la contaminación de cultivos nativos del Perú, debido a que el maíz tiene como característica significativa que se poliniza fácilmente y se ha demostrado que es posible la dispersión de transgenes a cultivos nativos por múltiples mecanismos como lo reportaron Oviedo-Bolaños et al. (2020) en Costa Rica, Trejo-Pastor et al. (2021) en México, Mazo y Rodríguez (2021) en Colombia. Los transgenes como los cultivos RR tolerantes al glifosato, que es un herbicida de amplio espectro y los cultivos Bt que producen la toxina Cry, que es un insecticida que afecta principalmente a lepidópteros, podrían conservar en forma indefinida su capacidad de desarrollo y de

expresión de proteínas recombinantes.

Es preocupante que se haya encontrado secuencias transgénicas del P35S en tres productos elaborados en el Perú que se comercializan como snacks o bocaditos, maíz gigante del Cuzco frito (S01), maíz gigante original (S20) y nachos de maíz morado (S09), las dos variedades de maíz son originarias del Perú, país en el cual está prohibido el ingreso y el cultivo de plantas transgénicas. La presencia del P35S posiblemente se debe a la contaminación durante el proceso de extrusión, debido a que se elaboran industrialmente con otros productos que pueden contener componentes transgénicos, y difícilmente a la contaminación transgénica de los cultivos debido a las dificultades biológicas y geográficas.

El hecho de que en las muestras de alimentos industrializados de maíz se haya detectado la secuencia transgénica del P35S, de que no contenían otros componentes orgánicos susceptibles de tener origen transgénico y de que se tomaron las medidas pertinentes para evitar o descartar la contaminación adventicia durante el análisis, sugiere la presencia de maíz transgénico; aunque es posible la contaminación accidental en pequeñas cantidades durante el proceso de fabricación. Las cuales fueron detectados por un método sensible como la Real-Time PCR que se utilizó.

Cuantificación de la secuencia transgénica P35S, en productos alimenticios de maíz

En cuanto a la cuantificación de la concentración, el límite que se obtuvo fue de 13 copias por reacción, valor muy cercano al límite de detección establecido por el fabricante; lo que evidencia la precisión del método empleado. La muestra de menor número de copias/g corresponde a dos productos: maíz pop corn (M01) elaborado en el Perú y harina de maíz precocida (H01) elaborada en Estados Unidos de América, y la de mayor número de copias/g a hojuelas de maíz (C03) elaborada en Chile (Tabla 2); en este último caso diferente al mayor valor obtenido por Baran y Özcelik (2018) quienes trabajando con muestras similares encontraron la mayor cantidad de copias/g en harina de maíz; los datos de este estudio y los nuestros confirman la diferente cantidad de componente transgénico que se encuentra en cada producto alimenticio industrializado que va a ser ingerido por el consumidor.

La cuantificación de copias de ADN transgénico en productos alimenticios cobra especial importancia si se toma en cuenta el criterio de bioseguridad por riesgos para la salud humana de la Comisión Europea, que considera que la inserción de demasiadas copias de ADN extraño en una posición no deseada, o de múltiples segmentos genéticos con reordenaciones, puede potenciar o silenciar ciertos procesos de producción de proteínas y provocar cambios en su composición, con

la aparición de compuestos potencialmente tóxicos en los alimentos que podrían poner en riesgo la salud humana (The World Trade Organization - WTO, 2004). Por ello, aplicando el principio de precaución y tomando en consideración la conveniencia de que el público consumidor esté informado, en países como los Australia, Ecuador, Bolivia y los de la Unión Europea es obligatorio el etiquetado de los productos alimenticios que tienen un umbral de presencia de ADN transgénico de 0,1% a 0,9% (Agro-Bio, 2021).

Demostración de la eficiencia y practicidad del método Real-Time PCR

El estudio permitió comprobar la eficiencia y practicidad del método empleado, lo que está de acuerdo con lo expuesto por Rizzi et al. (2004), Oliver (2014) y Leguizamón et al. (2018), quienes reportaron que es un método conveniente para detectar y cuantificar organismos transgénicos por su aplicabilidad, exactitud, rapidez, costo, y elevada especificidad y sensibilidad. Este método también se utilizó con éxito en numerosos estudios relacionados con cultivos de plantas y con alimentos transgénicos (Erkan y Dastan, 2017; Fernández et al., 2012; Leao-Buchir et al., 2018).

Asimismo, Carvajal et al. (2017) recomiendan que las muestras de productos transgénicos sean analizadas mediante Real-Time PCR para determinar los porcentajes de OGM que contiene cada muestra, también expresan que la técnica ha sido validada a nivel internacional por el Centro Común de Investigación de la Comisión Europea (JRC- EC) para la detección cualitativa y cuantitativa de OGM, debido a que posee un grado de sensibilidad del 0,01% en la detección de secuencias derivadas de OGM. Con esta técnica se han logrado reducir los resultados falsos negativos en alimentos procesados que poseen una baja proporción de material transgénico; en el Perú Santa-María et al. (2014) empleando dicha técnica detectaron la presencia adventicia (cantidad mínima) de eventos transgénicos en una cadena de suministros de maíz convencional, y en Brasil Leao-Buchir et al. (2018) detectaron trazas de soya transgénica en lotes de soya no transgénica.

El promotor 35S, que es una secuencia de ADN permitió detectar un porcentaje significativo de productos alimenticios de maíz que tenían componente transgénico. Debido a que es un promotor potente, generalmente se le utiliza para asegurar la expresión del transgene en la mayoría de las plantas cultivadas genéticamente modificadas que se comercializan en el mercado mundial. Según Rabiei et al. (2013) el P35S está presente en alrededor del 95% de las plantas genéticamente modificadas que se comercializan.

Debido al déficit de alimentos a nivel mundial, al impacto socioeconómico y a los resultados de la evaluación riesgo/beneficio, lo más probable es que en

un futuro cercano la mayor producción de alimentos que provienen de plantas tenga su origen en cultivos genéticamente modificados.

Como todavía existen dudas sobre el riesgo para la salud de la ingesta de productos alimenticios que contienen componentes transgénicos, se consideró ético e importante que el consumidor tenga conocimiento si un producto los tiene o no y decida si lo consume o no. No obstante, las empresas productoras y comercializadoras de semillas y alimentos transgénicos se oponen a que la información respectiva se incluya en el etiquetado, o se publicite, debido a que consideran que el hacerlo puede generar temor en los consumidores y disminuir la demanda, lo cual afectaría sus intereses económicos; argumentan que hasta la fecha no hay estudios científicos que demuestren fehacientemente que causen daño a los humanos, lo que por ahora es cierto (Ladics, 2019; Shen et al., 2022).

Conclusiones

Se demostró, que un elevado porcentaje de productos alimenticios elaborados con maíz y comercializados en Lima contienen la secuencia transgénica del Promotor 35S, lo cual sugiere la presencia de maíz transgénico; que los diversos productos analizados molecularmente tienen diferente concentración de dicha secuencia; y que el método de Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR) es eficiente y práctico para detectar y cuantificar el P35S en productos alimenticios.

El procedimiento empleado puede ser utilizado para detectar productos alimenticios industrializados que contienen componentes transgénicos y como tamiz para detectar y cuantificar la presencia de secuencias transgénicas específicas, lo cual podría ser útil para evaluar su potencialidad de poner en riesgo la salud humana.

Recomendaciones

Las autoridades de Salud como Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú [SENASA] y Dirección General de Salud Ambiental [DIGESA] deben utilizar el procedimiento empleado o estandarizar uno similar, como tamiz para detectar y cuantificar en forma rutinaria la presencia de secuencias transgénicas en productos alimenticios comercializados.

Es conveniente que los investigadores realicen estudios clínicos relacionando alimentos transgénicos con posibles riesgos para la salud de la población.

Es conveniente difundir los resultados de la presente investigación con la finalidad de contribuir a sensibilizar y concientizar a gobernantes, autoridades de

Salud y público en general, sobre la necesidad de evaluar el riesgo/beneficio de la producción, comercialización y consumo de alimentos transgénicos.

Referencias

- Acosta, A. (2016). Alimentos transgénicos, una mirada social. *Enclave Social*, 5(2), 40-47. <http://hdl.handle.net/10567/1841>
- Acosta, O., & Guerrero, C. (2007). Alimentos Transgénicos y Alergenicidad. *Rev. Fac. Med*, 55(4), 251-269. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/23088>
- Agrodata Perú. (2022). *Maíz amarillo Duro Perú Importación 2022 Agosto*. <https://www.agrodataperu.com/2022/09/maiz-amarillo-duro-peru-importacion-2022-agosto.html>
- Andow, D. (2001). *Resisting resistance to Bt -corn. Genetically Engineered Organisms Assessing Environmental and Human Health Effects*. CRC Press.
- Arcieri, M. (2016). Spread and Potential Risks of Genetically Modified Organisms. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 552-559. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210784316300729>
- Ardisana, E., Gainsa, B., Torres, A., & Fosado, O. (2019). Alimentos transgénicos: ¿Sí o No? La Perspectiva Sudamericana. *Revista Chakiñan*, 8, 148-157. http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2550-67222019000200148%20&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Aris, A., & Leblanc, S. (2011). Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. *Reprod Toxicol*, 31(4), 528-33. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21338670/>
- Asociación de Biotecnología Vegetal Agrícola- Agro-Bio. (2021). *¿Como se etiquetan los alimentos transgénicos?*. <https://agrobio.org/noticias/como-se-etiquetan-los-alimentos-transgenicos>
- Baran, M., & Özcelik, F. (2018). Detection of genetically modified maize in foods and feedstuff by PCR methods. *Gida*, 43(6), 971-983. <https://doi.org/10.15237/gida.GD18071>
- Baumgarte, S., & Tebbe, C. (2005). Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology*, 14, 2539-2551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02592.x>
- Bektas, A. (2018). A Multiplex, Fluorescent, and Isothermal Method for Detecting genetically Modified maize. *Food Analytical Methods*, 11, 686-692. <https://doi.org/10.1007/S12161-017-1041-9>
- Branquinho, M., Barroso, R., & Cardarelli, P. (2012). Use of real-time PCR to evaluate two DNA extraction methods from food. *Ciênc Tecnol Aliment Campinas*, 32(1), 112-118. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000012>
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosens, N., & Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>
- Carvajal, P., Ureña, H., Umaña, J., Sancho, C., Solano, F., Arleo, M., Martínez, C., & Umaña, R. (2017). Detección molecular de secuencias de ADN transgénico en alimentos de consumo humano y animal en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 53 - 68. <https://www.redalyc.org/journal/436/43652987004/html/>
- Chibuzor, A., Chidozie, P., & Oyejide, O. (2018). Detection of genetically modified DNA in processed maize and soybean products in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 17(35), 1090-1098. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16479>
- Cleveland, D., Soleri, D., Aragón, F., Crossa, J., & Gepts, P. (2005). Detecting (trans)gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico. *Environ Biosafety Res*, 4(4), 197-208. <https://doi.org/10.1051/ebr:2006006>
- Coelho, E. (2021). Decodificando organismos genéticamente modificados e seu impacto na alimentação. *Revista Mangút: Conexões Gastronômicas*, 1(1), 239-246. <https://revistas.ufrj.br/index.php/mangut/article/download/41761/24225>
- Daniel, I., & Alcochete, A. (2011). Detection of transgenic maize (*Zea mays* L.) in Angola. *Ciencia e Tecnologia*, (1), 7-19. <https://docplayer.com.br/68930773-Ciencia-e-tecnologia.html>
- Ellstrand, N. (2003). *Dangerous Liaisons? When Cultivated Plants Mate with Their Wild Relatives*. Baltimore, USA. Johns Hopkins University Press.

- Erkan, I., & Dastan, K. (2017). Real-Time PCR detection of genetically modified organisms in several food products and their environmental effects in Turkey. *Fresenius Boletín Ambiental*, 26(4), 2589-2595. https://www.academia.edu/32357735/Real_Time_PCR_Detection_of_Genetically_Modified_Organisms_in_Several_Food_Products_and_Their_Environmental_Effects_in_Turkey
- Ertugrul, A., Budak, H., & Cetiner, S. (2008). *The DNA based qualitative and quantitative analysis of genetically modified products in Turkish market* [Presentación en Conferencia]. 1st Global Conference on GMO Analysis, Como, Italy. <https://bch.cbd.int/en/database/VLR/BCH-VLR-SCBD-47166-2>
- European Commission. (2015). *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. JRC Technical Report*. European Network of GMO Laboratories (ENGL). https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf
- Ewen, S., & Pusztai, A. (1999). Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing Galanthus nivalis lectin on rat small intestine. *The Lancet*, 354(9187), 1353-1354. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)05860-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)05860-7)
- Fernandes, T., Amaral, J., Oliveira, M. B., & Mafra, I. (2014). A survey on genetically modified maize in foods commercialised in Portugal. *Food Control*, 35(1), 338-344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.017>
- Fernández, M., Da Silva, A., & Martínez, C. (2012). Análisis de transgénesis mediante PCR de 20 harinas de maíz (polentas) que se encuentran a la venta en el mercado Uruguayo. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 13(1), 92-104. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81324433012.pdf>
- Gouttefanjat, F. (2021). Revolución Verde, neoliberalismo y transgénicos en México: hacia una subordinación del maíz al capital. *Forhum International Journal of Social Sciences and Humanities*, 3(4), 108-119. <https://doi.org/10.35766/j.forhum2021.04.03.9>
- Grobman, A., Bonavia, D., Dillehay, T. D., Piperno, D. R., Iriarte, J., & Holst, I. (2012). Preceramic maize from Paredones and Huaca Prieta, Peru. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(5), 1755-1759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120270109>
- Heap, I. (2018). *International Survey of Herbicide-Resistant Weeds (Graphs in PowerPoint)*. Global Herbicide Resistance Action Committee (HRAC). Weed Science. <http://www.weedscience.org>
- Ibrahim, M. A., & Okasha, E. (2016). Effect of genetically modified corn on the jejunal mucosa of adult male albino rat. *Exp Toxicol Pathol*, 68(10), 579-588. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.10.001>
- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications [ISAAA]. (2016). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. Brief N° 52*. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf>
- Intriago, R., & Bravo, E. (2015). Situación actual del Ecuador como territorio libre de transgénicos. Letras Verdes. *Revista Latinoamericana de Estudios Socioambientales*, 18, 264-275. <http://dx.doi.org/10.17141/letrasverdes.18.2015.1606>
- Kim, J., Zhang D., & Kim, H. (2014). Detection of sixteen genetically modified maize events in processed foods using four event-specific pentaplex PCR systems. *Food Control*, 35(1), 345 - 353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.029>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front. Microbiol*, 8, 108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Krimsky, S. (2019). *GMOs Decoded. A Skeptic's View of Genetically Modified Foods*. The MIT Press.
- Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Kumar, T., Singh, A., Kumar, J., Yadava, P., Choudhary, M., & Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251(91), 1-27. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>
- Ladics, G. (2019). Assessment of the potential allergenicity of genetically-engineered food crops. *Journal of Immunotoxicology*, 16(1), 43-53. <https://doi.org/10.1080/1547691x.2018.1533904>
- Leao-Buchir, J., Pereira, G. V., Silva, A., Alban, S., Rocha, M., Poletini, J., Thomas-Soccol V., & Soccol, C. (2018). Real-time PCR for traceability and quantification of genetically modified seeds in lots of non-transgenic soybean. *Bioscience Journal*, 34(1), 34-41. <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n1a2018-37236>
- Leguizamón, J., Vela, A., Arias, M., & Cifuentes, L. (2018). Panorama general de los organismos genéticamente modificados en Colombia y en

- el mundo: Capacidad nacional de detección. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 101–116. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77080>
- Ley N° 29811. *Ley que establece la moratoria al ingreso y producción de organismos vivos modificados al territorio nacional por un periodo de 10 años* (17 de noviembre del 2011). <http://www.minam.gob.pe/uploads/2017/04/Ley-N-29811>
- Ley N° 31111. *Ley que establece la moratoria al ingreso y producción de organismos vivos modificados al territorio nacional por un periodo de 5 años, a fin de establecer la moratoria hasta el 31 de Diciembre de 2035* (5 de enero de 2021). <https://busquedas.elperuano.pe/download/url/ley-que-modifica-la-ley-29811-ley-que-establece-la-moratori-ley-n-31111-1917468-1>
- Louanchi, M., Belalia, N., Lehad, A., Laala, S., & Salhi, L. (2017). Qualitative detection of genetically modified material in crops and food products containing maize and soybean in Algeria. *Afr. J. Biotechnol*, 16(7), 322-327. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15537>
- Mazo, C., & Rodríguez, M. (2021). Modelo de dispersión de polen de maíz transgénico en el municipio de Tierralta (Córdoba, Colombia). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(1), 1-28. https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num1_art:1637
- Moreira, C., & Rampazzo, L. (2021). Organismos Genéticamente Modificados: Uma Análise À Luz Do Princípio Da Precaução. *Revista de Biodireito e Direito dos Animais*, 7(1), 98-115. <https://www.indexlaw.org/index.php/revistarbda/article/view/7954>
- Mota-Sánchez, D. (2013). Resistencia de insectos a cultivos Bt [Conference presentation]. V Conferencia presentada en la CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados), México. <https://documents.net/document/resistencia-de-insectos-a-cultivos-bt.html?page=1>
- Oliver, M. (2014). Why We Need GMO Crops in Agriculture. *Missouri Medicine*, 111(6), 492-507. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6173531/>
- Oviedo, K., García, J., Solano, S., Martínez, C., Sancho, C., & Umaña, R. (2020). Detección del promotor 35S mediante PCR tiempo-real: indicador de transgenicidad en alimentos y *Gossypium* sp. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 209-221. <http://www.revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso>
- Ozgen, O., Yilmaz, F. & Muratoglu, K. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in midly and highly processed foods. *Food Control*, 32(2), 525-531. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.023>
- Park, J., Seol, M., Eum, S., Kim, I., Lim, H., Lee, J., & Choi, W. (2020) Development of a multiplex PCR method for identification of four genetically modified maize lines and its application in living modified organism identification. *Journal of Plant Biotechnology*, 47, 309-315. <https://doi.org/10.5010/JPB.2020.47.4.309>
- Potrykus, I. (2017). The GMO-crop potential for more, and more nutritious food is blocked by unjustified regulation. *Journal of Innovation & Knowledge*, 2(2), 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.jik.2017.03.003>
- Pusztai, A. (17 de enero de 2006). *National Regulations Should Reflect Risks of GE Crops*. BioSpectrum. <http://biospectrumindia.ciol.com/content/columns/10601061.asp>
- Qiagen. (2017). *mericon® Quant GMO Handbook*. Sample & Assay Technologies. <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=7096104c-8e5d-4c7d-afdb-1e56f21e7446&lang=en>
- Qiagen. (2014). *DNeasy® mericon® Food Handbook*. For the extraction of total nucleic acids from a range of food sample types. Sample & Assay Technologies. <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=bd9cc2a8-aa71-4cb5-b6f7-97b3d7fc306d&lang=en>
- Rabiei, M., Mehdizadeh, M., Rastegar, H., Vahidi, H., & Alebouyeh, M. (2013). Detection of Genetically Modified Maize in Processed Foods Sold Commercially in Iran by Qualitative PCR. *Iran J Pharm Res*, 12(1), 25-30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813200/pdf/ijpr-12-25.pdf>
- Rizzi, A., Sorlini, C., & Daffonchio, D. (2004). Practicality of detection of genetically modified organisms (GMOs) in food. *Ag Biotech Net*, 6(ABN 130), 1N–9N. https://www.researchgate.net/publication/228593692_Practicality_of_detection_of_genetically_modified_organisms_GMOs_in_food
- Santa-María, M., Lajo-Morgan, G., & Guardia, L. (2014). Adventitious presence of transgenic

- events in the maize supply chain in Perú: A case study. *Food control*, 41(1), 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.006>
- Séralini, G. E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D. & Vendômois, J. (2014). Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environ Sci Eur*, 26(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0014-5>
- Chen, S., Xiang-Chang, Y., Bo-Yang, J., Jing, L., Peng, J., Xiao-Wen, Z., Xue-Hao, C., Jian-Xin, R., Hui-Di, L., Wen-Bin, H., Min, F., Xun, L., Yu-Tong, F., Nicola, R., & Jian-Ping, L. (2022). Evaluation of adverse effects/events of genetically modified food consumption: a systematic review of animal and human studies. *Environ Sci Eur*, 34(8), 1-33. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00578-9>
- Traversa, I. (2021). Diagnóstico de Alimentos con Origen Transgénico en la Frontera Uruguay-Brasil: Legislación, Conocimiento y Rotulado. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 20(4), 47-56. <https://doi.org/10.29105/respyn20.4-5>
- Trejo, V., Espinosa, A., Mendoza, M., Kato, T., Morales, M., Tadeo, M., & Wegier, A. (2021). Grano de Maíz comercializado en México como Potencial Dispersos de eventos transgénicos. *Rev. Fitotec. Mex.*, 44(2), 251-259. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.251>
- U.S. Department of Agriculture [USDA]. (2021). *Producción Agrícola Mundial. Actualización Mayo 2021*. <http://apps.fas.usda.gov/psdomline/app/index.html#/app/downloads.www>
- Uslu, T. (2021). Advantages, risks and legal perspectives of GMOs in 2020s. *Plant Biotechnology Reports*, 15, 741-751. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00714-0>
- Vázquez, R., Gonzáles, J., García, C., Neri, L., Lopéz, R., Hernández, M., Moreno, L., & De La Riva, G. (2000). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(1), 54-58. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2584>
- World Trade Organization [WTO]. (2004). *European Communities – Measures Affecting the Approval and Marketing of Biotech Products (DS/291, DS292, DS293). Supplementary Rebuttal Submission by the European Communities*. https://trade.ec.europa.eu/doclib/docs/2005/february/tradoc_121573.pdf
- Wu, Y., Wang, Y., Li, J., Li, W., Zhang, L., Li, Y., Li, X., Li, J., Li, Z., & Wu, G. (2014). Development of a general method for detection and quantification of the P35S promoter based on assessment of existing methods. *Scientific reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep07358>
- Zhang, C., Wohlhueter, R., & Zhang, H. (2016). Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. *Food Science and Human Wellness*, 5, 116-123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.002>