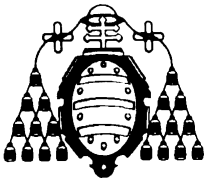

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

"TRANSGÉNICOS DE SOJA EN MATRICES ALIMENTICIAS COMPLEJAS: DETECCIÓN MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES"

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

ROSANA SOLLA PAZOS

JULIO, 2014

Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. http://www.unioviedo.es/MBTA

PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Yaisel Juan Borrell Pichs (Universidad de Oviedo)

Dra. Dña. Eva García Vázquez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Rosana Solla Pazos** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción curso 2013-2014.

Oviedo, 14 de Julio de 2014

EVA GARCÍA-VAZQUEZ

Yaisel J. Borrell

V°B°

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar quiero agradecer a Eva García Vázquez y Yaisel Borrel Pichs por concederme la oportunidad de realizar este proyecto y por toda la ayuda recibida durante este tiempo.

A los compañeros de laboratorio, en especial a Lucía Fernández por ayuda y por las esperas compartidas.

A mis compañeros del master, en especial a Marta, Paula, Vanesa, Lidia, Tania y Ainhoa por hacerme sentir como en casa a pesar de la distancia, y porque ya son más que compañeras de clase.

A mis amigas por el apoyo y darme la calma necesaria. A Andrea Salamanca por aportarme perspectiva cuando más la necesitaba y a Marta Vega por su interés y aportación.

A mi familia por la paciencia, la confianza y el esfuerzo durante todo este tiempo.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN. I
ABSTRACT. II
LISTA DE FIGURAS. III
LISTA DE TABLAS. IV
ABREVIATURAS. V
1. INTRODUCCIÓN. 1
2. OBJETIVOS: 4
3. CONSIDERACIONES TEÓRICAS. 5
3.1. LA SOJA. 5
3.1.1. PROPIEDADES NUTRICIONALES. 5
3.1.2. ALIMENTOS DERIVADOS DE SOJA. 7
3.2. INGENIERÍA GENÉTICA Y ALIMENTACIÓN. 8
3.2.1. TECNOLOGÍA. 8
3.2.2. APLICACIONES DE LA INGENIERÍA GENÉTICA EN LA ALIMENTACIÓN. 12
3.3. VEGETALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS. 14
3.3.1. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE APROBADOS EN LA UE. 18
3.3.2. VARIEDADES DE SOJA GENÉTICAMENTE MODIFICADAS APROBADAS EN LA UE. 20
3.3.3. PRODUCCIÓN DE CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS. 21
3.3.4. IMPLICACIONES DE LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS. 23
3.4. DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS. 26
3.4.1. MÉTODOS BASADOS EN LA DETECCIÓN DEL DNA. 27
3.5. LEGISLACIÓN. 29
3.5.1. LEGISLACIÓN EN MATERIA DE TRANSGÉNICOS. 29
3.5.2. LEGISLACIÓN EN MATERIA DE ETIQUETADO ALIMENTARIO. 34
3.5.3. LEGISLACIÓN SOBRE AGRICULTURA ECOLÓGICA. 36
4. MATERIALES Y MÉTODOS. 40
4.1. MUESTREO. 40
4.2. ANÁLISIS DE ETIQUETAS. 42
4.3. ANÁLISIS GENÉTICOS. 42
4.3.1. DETECCION DE GMOs. 42

4.3.2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE SOJA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL GEN *RBCL*. 46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 49
5.1. ANÁLISIS DEL ETIQUETADO ALIMENTARIO. 49
5.2. ANÁLISIS GENÉTICO PARA LA DETECCIÓN DE GMOS. 51
5.3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES (SECUENCIACIÓN DEL GEN *RBCL*). 54
6. CONCLUSIONES. 57
7. RECOMENDACIONES. 58
8. BIBLIOGRAFÍA. 59

RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN.

La legislación existente en la Unión Europea en materia de organismos genéticamente modificados en alimentos permite que, en la actualidad, existan en el mercado productos que contienen estas variedades modificadas sin un etiquetado que indique al consumidor a cerca de esta presencia. Debido a que la soja es la variedad vegetal genéticamente modificada que presentó una mayor superficie cultivada en el año 2013, el objetivo de este trabajo es comprobar la información suministrada en el etiquetado alimentario en relación a su contenido de soja modificada, y realizar un monitoreo de distintas matrices alimentarias mediante herramientas moleculares, que permiten la detección de secuencias concretas de DNA con la finalidad de detectar soja transgénica en los mismos. El fundamento de este monitoreo es la detección de secuencias reguladoras especificas presentes en la mayoría de organismos transgénicos, como son el promotor 35S y el terminador NOS, mediante la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados obtenidos muestran que 54,5% de los productos analizados presentan una amplificación positiva del promotor 35S, lo que pone de manifiesto que éstos contienen organismos genéticamente modificados.

ABSTRACT.

The current legislation in the European Union with regard to the presence of genetically modified organisms in food allows a number of products that contain GMO to lack the labeling that would indicate the consumer about its presence in the market. Because soy is the GM plant variety that had the highest area under cultivation in 2013, the aim of this work is to assess the information provided in the labeling regarding the presence of GM and to sweep different food matrices with molecular tools, which allow the detection of specific DNA sequences in order to detect GM soybean. The basis of this screening is the detection of specific regulatory sequences present in most GMOs, such as the 35S promoter and the NOS terminator, by using polymerase chain reaction. The results show that 54.5% of the food samples present the 35S promoter, indicating the presence of GMOs in it.

LISTA DE FIGURAS
Y TABLAS

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1: Información taxonómica *Glycine max*.....5

Figura 2: Esquema de la transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens.* 11

Figura 3: Ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos.....16

Figura 4: Sellos que identifican la agricultura ecológica. 38

Figura 5: Primers utilizados en la amplificación del gen *rbcL* 46

Figura 6: Clasificación taxonómica *Vigna radiata*. 49

Figura 7: Número de productos en base a la procedencia de alguno de sus ingredientes. 50

Figura 8: Resultados de amplificación alimentos mínimamente procesados.. 52

Figura 9: Resultados de amplificación alimentos poco procesados.....53

Figura 10: Resultados de amplificación alimentos poco procesados.....53

Figura 11: Muestras positivas para el promotor 35S en el total de las muestras de cada tipo de etiquetado.....54

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1: Comparación con la proteína de referencia IOM/FNB 2002 (mg/g de proteína) .. 6

Tabla 2: Variedades de soja GM aprobadas en la UE. 20

Tabla 3: Principales países productores de cultivos GM en 2013..... 22

Tabla 4: Cultivos GM más importantes..... 23

Tabla 5: Alimentos mínimamente procesados. 40

Tabla 6: Alimentos poco procesados..... 41

Tabla 7: Alimentos con procesamiento medio. 41

Tabla 8: Cantidad necesaria de cada reactivo de PCR por reacción. 45

Tabla 9: Cantidad óptima, por reacción, de cada reactivo de PCR para la amplificación de la región *rbcL*. 47

Tabla 10: Clasificación de los productos en base a su etiquetado sobre el contenido en GMOs indicando que no los contienen. 51

Tabla 11: Resultados identificación de especie en base a su secuencia *rbcL* en BOLDSystems. 55

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

Bp	base pair (pares de bases)
C	Citosina
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus (virus del mosaico de la coliflor)
CERA	Center for Environmental Risk Assessment (Centro para la Evalución de los Riesgos Ambientales)
Datp	desoxiadenosina trifosfato
Dctp	desoxicitosina trifosfato
dGTP	desoxiguanina trifosfato
Dttp	desoxitimina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAr	ácido desoxirribonucleico recombinante
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)
EPSPS	5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
G	Guannina
GM(s)	genéticamente modificado(s)
GMO(s)	organismo genéticamente modificado(s)
IOM/FNB	Institute of Medicine's Food and Nutrition Board (Comité de Nutrición y Alimentos del Instituto de Medicina)

ISAAA	International Service for the Acquisition of Agri-BIotech Applications (Servicio Internacional para la Adquisición de productos Agrobiotecnológicos)
LMO	organismo viviente genéticamente modificado
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
NOS	terminador del gen de la nopalina sintasa
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
RNA	ácido ribonucleico
UE	Unión Europea
UV	luz ultravioleta
35S	promotor 35S

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

El hombre desde el inicio de la agricultura y la ganadería ha intervenido en la mejora de los cultivos y los animales de granja de forma empírica. Sin embargo, hace poco más de 100 años que Gregor Mendel descubrió las leyes de la herencia de los caracteres y solo desde mediados del siglo pasado se sabe que los genes responsables de estas características están formados por nucleótidos de ácido desoxirribonucleico. Esta falta de conocimiento científico no ha evitado que el hombre usara las técnicas genéticas de mutación y cruce sexual en la mejora agroalimentaria, ya que resulta obvio que los cultivo domesticados actualmente difieren en gran medida de las variedades silvestres de las que proceden.

En la década de los años 70 se produjo la denominada “Revolución verde” durante la cual la agricultura sufrió grandes cambios gracias a la aplicación de las Leyes de Mendel, que permitieron crear variedades seleccionadas mediante hibridación, y a la mecanización y aplicación de fertilizantes y plaguicidas, que permitieron la siembra intensiva de estas variedades mejoradas en grandes extensiones con la finalidad de satisfacer los crecientes requerimientos alimentarios, pero con elevados costos tanto económicos como medioambientales (Sánchez-Cuevas, 2003).

En la actualidad, estamos en la denominada “Era biotecnológica” en la que la biotecnología, y dentro de esta la ingeniería genética juega un papel clave (Sánchez-Cuevas, 2003). La ingeniería genética permite realizar cambios concretos en el genoma gracias a la integración de genes perfectamente identificados y aislados en regiones concretas del mismo, a diferencia de las técnicas tradicionales en las cuales no es posible dirigir el lugar de inserción ni los genes insertados, debido a que en éstas el azar juega un papel fundamental. Esta nueva tecnología también supone una reducción en los tiempos de generación de estas nuevas variedades modificadas. Otra de las implicaciones que supone la aplicación de la ingeniería genética es la posibilidad de saltar la barrera de especie, ya que resulta obvio que no es posible el cruzamiento de especies distintas si es posible integrar un gen aislado de una especie en el genoma de otra especie distinta, incluso perteneciente a otro reino (Ramón, 2004).

La población humana actual es de unos 7.000 millones de habitantes y se estima podría alcanzar los 9.5 mil millones de habitantes en el año 2050, lo que implica la necesidad de aumentar en un 70% la producción actual de alimentos como el maíz y el arroz para cubrir esta demanda, y todo ellos a partir de los mismos

recursos naturales disponibles (Bakshi & Dewan, 2013). Es en este término donde los cultivos genéticamente modificados se perfilan como una tecnología prometedora, ya que podrían contribuir a la mejora de alimentos para hacer frente a esta creciente demanda (James, 2003). Según la FAO "la biotecnología ofrece instrumentos poderosos para el desarrollo sostenible de la agricultura, la pesca y la actividad forestal, así como de las industrias alimentarias y puede contribuir a satisfacer las necesidades de una población en aumento y cada vez más urbanizada" (FAO, 2000).

Por cultivo modificado genéticamente, también conocido como biotecnológico o transgénico, se entiende una planta con ácido desoxirribonucleico recombinante (DNA-r). Una planta de DNA-r es aquella cuyo material genético ha sido modificado mediante técnicas *in vitro* de ácidos nucleicos, incluida la introducción de DNA-r y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos (FAO, 2014). Asimismo, en el punto 2 del artículo 2 de la Directiva 2001/18/CE se define como "organismo modificado genéticamente" el organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético haya sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural.

La tasa de adopción de los cultivos GM no tiene precedentes y es más alta que cualquier otra tecnología agrícola. En el año 2013 se dedicaron 175,2 millones de hectáreas en 27 países a estos cultivos (James, 2014). Esto es debido a los beneficios que éstos suponen para los agricultores, ya que les permite una mejora del rendimiento agrícola (Herrera & Gómez, 2011).

Hasta la fecha la mayor parte de los cultivos GM, denominados de primera generación, presentan una mejora en las características agronómicas y resistencia al transporte y almacenamiento, ya que cabe destacar que entre el 30% y el 40% de los alimentos que se producen se tiran antes de llegar a los consumidores, con lo que el consumidor no es consciente de sus posibles beneficios (Bakshi & Dewan, 2013). En los últimos años se están desarrollando investigaciones que concluirán con la puesta en el mercado de alimentos que posean nuevas características nutricionales, como por ejemplo el arroz dorado (Ramón, 2003).

Actualmente, la soja es el cultivo GM más producido en el mundo, existiendo 30 variedades modificadas de esta especie aprobadas para consumo y cultivo en distintos países (ISAAA, 2014). Debido a sus propiedades tecnológicas y nutricionales, la soja está presente en un elevado número de productos, tanto la planta en sí como diversos compuestos extraídos a partir de ella como la lecitina.

Los posibles impactos que estos nuevos cultivos GM podrían tener sobre los ecosistemas, como son la generación de resistencias o la perdida de la biodiversidad y sobre la salud humana, entre las que destaca la posibilidad de generación de alergias, hacen que exista una gran controversia en la sociedad en cuanto a su adopción y consumo. Por ejemplo, la posibilidad de saltar la barrera de especie tiene claras repercusiones como sería el caso de los denominados genes de "reserva ética", un ejemplo lo representa la introducción de genes procedentes de animales en organismos vegetales y las repercusiones que esta modificación tendría para personas vegetarianas. También en determinados grupos religiosos el salto de la barrera de especie podría tener ciertas implicaciones al expresarse genes de especies cuyo consumo podría estar prohibido en su doctrina (Nombela et al., 2005). Por todo ello, resulta clave compartir el conocimiento sobre estos cultivos por parte de las instituciones científicas con la finalidad de estimular el diálogo sobre el impacto de esta tecnología en el medio ambiente, la salud de productores y consumidores, la sostenibilidad y la seguridad alimentaria global.

Estas implicaciones y el derecho de los consumidores a la información sobre los productos existentes en el mercado, hicieron necesaria una legislación específica relativa a estos nuevos cultivos GM, tanto en relación a su producción como al etiquetado de los artículos que los contienen. Así, la normativa legal existente en la Unión Europea, donde hay un gran debate entre los consumidores sobre estos productos, establece la obligatoriedad de informar en el etiquetado a cerca del contenido en GMOs cuando estos se presentan en una cantidad superior al 0.9%, cantidad fijada en el Reglamento (CE) n° 1829/2003.

Debido al contexto económico actual, en el que los recursos destinados por parte de las instituciones públicas a la lucha contra el fraude alimentario y la salud de los consumidores se han visto reducidos alarmantemente (La Voz de Galicia, 2013), es necesario llevar a cabo estudios que permitan comprobar el cumplimiento de la legislación existente en esta materia con la finalidad de proteger los interés de los consumidores y ofrecerles la información necesaria para la adquisición y consumo racional de los distintos productos existentes en el mercado. En este término se incluye el análisis llevado a cabo en este proyecto.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

1.- Realizar un estudio del etiquetado alimentario en productos procedentes de superficies comerciales en Asturias que permita verificar que en estos se presenta de manera correcta la información de mención obligatoria establecida en el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios y que representa la normativa en vigor.

2.- Determinar la presencia de soja GM en distintos productos alimentarios mediante el empleo de herramientas moleculares (PCR) y de este modo comprobar el grado de inclusión de estos cultivos en la cadena alimentaria asturiana y averiguar si cumplen con la legislación en materia de etiquetado de alimentos GM.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

3. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.

3.1. LA SOJA.

La soja, *Glycine max* (L) Merrill (Figura 1) es una planta anual perteneciente a la familia de las leguminosas, que junto con los cereales han sido las primeras plantas cultivadas destinadas a alimentación humana (Sanz, 2007). En la actualidad existen más de tres mil variedades de soja cultivadas en todo el mundo, siendo Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, India, Paraguay y Canadá los 7 principales productores al copar el 95% de la producción mundial de esta oleaginosa (Boggiano, 2013; Infoagro, 2014). En los países europeos la producción de soja es meramente simbólica, no dedicándose grandes extensiones a este cultivo (Sánchez, 2005). Se estima que en esta campaña se alcancen un cifra récord en lo referente a la producción mundial de soja (Consejo Internacional de Cereales, 2014).

- Reino: *Plantae*
  - División: *Magnoliophyta*
    - Clase: *Magnoliopsida*
      - Orden: *Fabales*
        - Familia: *Fabaceae*
          - Género: *Glycine*
            - Especie: *Glycine max*

Figura 1: Información taxonómica *Glycine max* (Fuente CONABIO, 2011).

3.1.1. PROPIEDADES NUTRICIONALES.

La soja es un alimento de gran valor nutricional debido a su elevada concentración de proteínas de alta calidad. La semilla de soja está compuesta, en promedio, por un 36,5% de proteínas, un 20% de lípidos, un 30% de hidratos de carbono, un 9% de fibra alimentaria, un 8,5% de agua y un 5% de cenizas (Ridner, 2006).

La soja posee mayor concentración proteica que el resto de las legumbres, presentando casi el doble de proteínas que la carne (20%), cuatro veces la cantidad de proteína presente en los huevos y hasta doce veces la de la leche (Herrera & Jiménez, 2007). En relación a las calidad de la proteína de soja, la OMS determinó

que contienen todos los aminoácidos esenciales y en cantidades suficientes para cubrir los requerimientos proteicos de niños mayores de 2 años y adultos (Tabla 1) (Ridner, 2006). Diversos estudios han concluido que las proteínas de soja ejercen un efecto antiaterogénico sobre la salud humana, ya que se ha determinado que reducen los niveles de colesterol total, de LDL-colesterol y triglicéridos mientras que tienden a incrementar la concentración de HDL-colesterol, lo que junto a su acción antioxidante, disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Asimismo, también se ha demostrado en animales que la proteína de soja reduce la masa de tejido adiposo y los niveles plasmáticos de glucosa y adiponectina, proteína producida por el tejido adiposo con efectos antiaterogénicos y anti-resistencia insulínica (Herrera & Jiménez, 2007).

Tabla 1: Comparación con la proteína de referencia IOM/FNB 2002 (mg/g de proteína) (Fuente: Ridner, 2006).

Aminoácido esencial	"Scoring pattern" (1 a 3 años)	Soja	Aislado proteico de soja	Tofu	Bebidas de soja
Histidina	18	27	29	29	26
Isoleucina	25	48	53	50	52
Leucina	55	67	66	66	88
Lisina	51	81	84	76	65
Meteonina y cisteína	25	30	27	27	32
Fenilalanina y tirosina	47	65	97	82	96
Treonina	27	43	39	41	41
Triptófano	7	15	14	16	16
Valina	32	50	51	50	51
Total proteínas		**36,5**	**80,7**	**8,1**	**2,75**

Las isoflavonas son compuestos fenólicos presenten en la soja en cantidades significativas y a los cuales se les atribuyen efectos beneficiosos para la salud. Entre las isoflavonas presentes en la soja, la genistina y daidzeína ejercen efectos similares a los estrógenos de origen animal sobre el organismo y por ello son de utilidad en el tratamiento sintomático de la menopausia, ya que se ha visto que presentan efectos beneficiosos sobre la funcionalidad de la mama, ovarios, endometrio, próstata y tejidos vascular y óseo (Herrera & Jiménez, 2007). Las isoflavonas presentan otros múltiples

beneficios derivados su acción antioxidante, antiinflamatoria, antitrómbica y anticancerígena, entre otras (Ridner, 2006; Herrera & Jiménez, 2007).

En relación al resto de nutrientes presentes en la soja, cabe citar que muestra un elevado contenido en ácidos grasos insaturados, entre los que destaca el ácido linoleico (18:2 ω6) que representa aproximadamente el 54% de la cantidad total de ácidos grasos. El linoleico es un ácido graso esencial precursor de la serie ω-6 (Herrera & Jiménez, 2007). También destaca dentro de la fracción lipídica su contenido en lecitina, representa entre 1,5 y el 2,5% de la misma. En cuanto a las vitaminas presentes en la soja, entre las que se encuentran la tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), niacina o la vitamina K, cabe mencionar que los tratamientos térmicos industriales a los que se puede someter al producto podrían destruir parte de estas vitaminas (Ridner, 2006; Herrera & Jiménez, 2007).

3.1.2. ALIMENTOS DERIVADOS DE SOJA.

Como es sabido, los alimentos de soja son ampliamente consumidos en los países Orientales desde hace aproximadamente tres mil años. Sin embargo, éstos no han tenido demasiada aceptación entre los consumidores occidentales hasta las últimas décadas gracias a la difusión de sus cualidades nutritivas y saludables, que han hecho que los productos de soja sean más apreciados en el mercado donde podemos encontrar gran variedad de los mismos.

El aceite y la harina son los productos mayoritarios obtenidos a partir de la soja. El aceite se obtiene por extracción con solventes de sus semillas y es el más utilizado culinariamente a nivel mundial destacando por su excelente calidad, directamente relacionada con sus ácidos grasos insaturados y sus antioxidantes naturales (Ridner, 2006).

La harina de soja se obtiene por molienda de habas o semillas y se presenta en el mercado en forma bruta (con sus enzimas activas) y desactivada (las enzimas se han desactivado por tratamiento térmico de las semillas) La harina bruta se utiliza en ocasiones como blanqueador de la harina panificable debido a que contiene lipoxidasa. La harina desactivada se emplea en repostería y posee excelentes propiedades ligantes y de retención de agua (Sanz, 2007).

Entre los productos de soja que mayor aceptación tienen en el mercado occidental destacan las bebidas de extracto de soja y el tofu. Las bebidas de extracto de soja se corresponden al extracto acuoso de las habas o semillas de soja, que tanto en su aspecto como en su composición se parece a la leche, a la que puede sustituir

en la alimentación. Las elevadas temperaturas a las que se somete a las semillas durante el procesamiento industrial son útiles para eliminar el sabor a legumbre cruda en el producto final y destruir el factor antitripsina, agente antinutritivo cuya presencia en la bebida de extracto de soja determina la inhibición de la tripsina y, por consiguiente, la posible aparición de desórdenes digestivos. También con el tratamiento industrial desaparecen ciertas sustancias volátiles causantes de alteraciones del sabor y aroma de estas bebidas. El tofu es un alimento muy nutritivo obtenido por coagulación de la bebida de extracto de soja y presenta un aspecto similar al del queso fresco (Sanz, 2007).

Existen otros productos obtenidos por fermentación de la soja como el shonyu o salsa de soja (elaborado por fermentación de semillas de soja y trigo), el sufu (obtenido por fermentación de tofu) o el miso (producto de consistencia cremosa obtenido por fermentación de soja y cereales), muy utilizados en los países orientales pero poco presentes en el mercado europeo (Sanz, 2007)

Además de estos productos, de la soja también se obtienen diversos concentrados con distintas utilidades industriales, como por ejemplo la lecitina, utilizada como emulsionante en la industria alimentaria (Pelaez & Montimer, 2011).

3.2. INGENIERÍA GENÉTICA Y ALIMENTACIÓN.

En la Cumbre del Milenio celebrada en el año 2000 la ONU se fijó ocho objetivos para conseguir en 2015, entre los que se incluía “erradicar la pobreza extrema y el hambre”. En concreto se pretendía reducir a la mitad el número de personas que pasan hambre (OMS, 2000). De este modo, el gran reto del nuevo milenio es producir la suficiente cantidad de alimentos para sustentar a la creciente población que se encuentra en una situación de insuficiencia alimentaria. Es en la consecución de este objetivo donde la ingeniería genética aplicada a la mejora de alimentos podría desempeñar un papel clave, y en concreto el cultivo de la soja, debido a sus propiedades nutricionales, contribuiría de manera muy positiva a la consecución de este objetivo.

3.2.1. TECNOLOGÍA.

La actual mejora biotecnología de alimentos, la producción de compuestos útiles en alimentación y la creación de nuevos alimentos genéticamente modificados, está basada en una de las tecnologías más prometedoras de los últimos años como la

ingeniería genética. Podemos definir la ingeniería genética como la serie de técnicas que permiten la transferencia programada de genes entre distintos organismo. Consiste en una reunión artificial de moléculas de DNA con la finalidad de aislar genes o fragmentos de DNA e introducirlos en otro genoma para que se expresen (García, 1998).

El fundamento de la ingeniería genética en la creación de GMOs se basa en aislar desde un organismo la secuencia de interés de DNA y propagarlo a otro organismo, con la finalidad de obtener el producto de dicho gen (Reyes & Rozowki, 2003). Esta tecnología está basada en la utilización enzimas de restricción y vectores para la integración del gen de interés en el genoma receptor.

TRANSFERENCIA DEL DNA RECOMBINANTE A LAS CÉLULAS HOSPEDADORAS.

El grado de éxito de los diferentes procedimientos de transferencia de DNA a las células depende de la complejidad de la envoltura celular de la célula hospedadora, y de la naturaleza y tamaño del DNA a incorporar. En el caso de las células vegetales la presencia de la pared de celulosa que recubre a la membrana plasmática supone un verdadero obstáculo para la entrada de genes. Las estrategias a seguir para salvar este problema van encaminadas a liberar a la célula de esta barrera física o a diseñar sistemas que dirijan el DNA al interior de la célula en presencia de la pared (Morcillo et al., 2011).

Para la transformación de células vegetales se suelen utilizar protoplatos, que son células vegetales a las que se les ha eliminado la pared celular por medio de tratamiento enzimático con celulasa y pectinasa. Al estar desprovisto de pared externa se facilitan la penetración del DNA y por lo tanto son más fáciles de transformar, para ello se suelen utilizar procedimientos químicos, electroporación o bombardeo de micropartículas. Posteriormente, el protoplasto, en un medio con nutrientes y señales adecuadas, regenerará la pared celular tras lo cual la célula comienza a dividirse y puede formar callos (masa indiferenciada de células) e incluso regenerar la planta completa. Sin embargo, la frecuencia de la transformación estable es baja y suele tardar mucho tiempo en regenerar plantas genéticamente modificas enteras (Morcillo et al., 2011; Narusaka et al., 2012).

Los métodos más utilizados para la transformación vegetal son:

1.- **Electroporación**. Está basada en la utilización de descargas eléctricas breves y de alto voltaje para crear pequeños poros transitorios en las membranas

celulares que permitan la entrada de DNA. Los rendimientos son altos, están en torno a 10^9-10^{10} transformantes/µg de DNA y es un método aplicable a un amplio número de tipos de células bacterianas y eucariotas, entre ellas los protoplastos (Narusaka et al., 2012).

2.- **Infección por virus**. La estrategia implica colocar el DNA recombinante en el interior de partículas víricas infectivas para que el sistema natural, enormemente eficaz, se encargue de sus transferencia al interior de la célula infectada. Un problema en ocasiones es la limitación del tamaño del DNA inserto a transportar (Untergasser et al., 2012).

3.- **Bombardeo con microproyectiles o biolística**. Es un método diseñado a finales de los años 80 para manipular el genoma de plantas cuya transformación mediante *Agrobacterium* era compleja. Se basa en el uso de proyectiles esféricos microscópicos de un metal pesado, generalmente oro o tungsteno, a cuya superficie se ha adherido el DNA a trasferir. A través de un sistema a alta presión, "pistola de genes", se lanzan los proyectiles sobre las células anfitrionas en cultivo o *in vivo* (piel, hojas, etc.) a una velocidad aproximada de 1500km/h, sufriente para penetrar en la pared celular del tejido sin causar la muerte de la célula (Brandão et al., 2012). El sistema es muy eficaz con células de pared fuerte como las vegetales, que de otro modo son difíciles de atravesar. Algunos proyectiles atraviesan las células y liberan el DNA recombinante de su superficie para posteriormente incorporarse al DNA cromosómico (Narusaka et al., 2012).

4.- ***Agrobacterium tumefaciens***. Los miembros del género *Agrobacterium* son las únicas especies que poseen de manera natural la capacidad de llevar a cabo una transferencia genética entre organismos de distintos reinos (Gelvin, 2012).

El método basado en esta capacidad de transferencia genética es el más utilizado hasta la fecha. Se fundamenta en la habilidad de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* para transferir e integrar el T-DNA (DNA transferido), tramo concreto de su DNA, en la célula vegetal a la que infecta (Figura 2) (Gelvin, 2012; Narusaka et al., 2012). Este T-DNA suele incluirse normalmente en el plásmido Ti de la bacteria, que es un DNA circular de unas 200Kb, pero en el interior de la célula solo penetra el T-DNA (Morcillo et al., 2011). Los genes incluidos en el T-DNA son capaces de perturbar la regulación del crecimiento de la célula infectada (se multiplica como si fuera un tumor), y de hacer que esta célula fabrique unas sustancias que sirven de alimento exclusivo para la bacteria porque sólo ella posee las enzimas necesarias para su digestión. Si se eliminan estos genes, pero se mantienen los

extremos del T-DNA, éste retiene la capacidad de ser transferido a la planta, gracias a la presencia de proteínas de virulecia (proteínas Vir) aunque pierde la capacidad de formar tumores y la de producir sustancias nutritivas para la bacteria (Gelvin, 2012). Si introducimos los genes de interés entre los bordes del T-DNA, es decir, utilizamos este T-DNA como vector de clonación, la bacteria introducirá estos genes en la célula vegetal y se transmitirán a la descendencia del mismo modo que lo hacen los que componen el genoma original.

Cabe destacar que el DNA recombinante obtenido, secuencia génica de interés más el T-DNA, tiene que ser introducido en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, con anterioridad a la infección. Los métodos más utilizados para esta transformación son la electroporación, la conjugación bacteriana o el shock térmico.

Es importante mencionar que en la actualidad se están desarrollando métodos que permitan la transformación vegetal mediante el uso de *Agrobacterium* en especies monocotiledóneas, como los cereales, al no ser estas infectadas de forma natural por la bacteria (Pérez-Piñeiro, 2012).

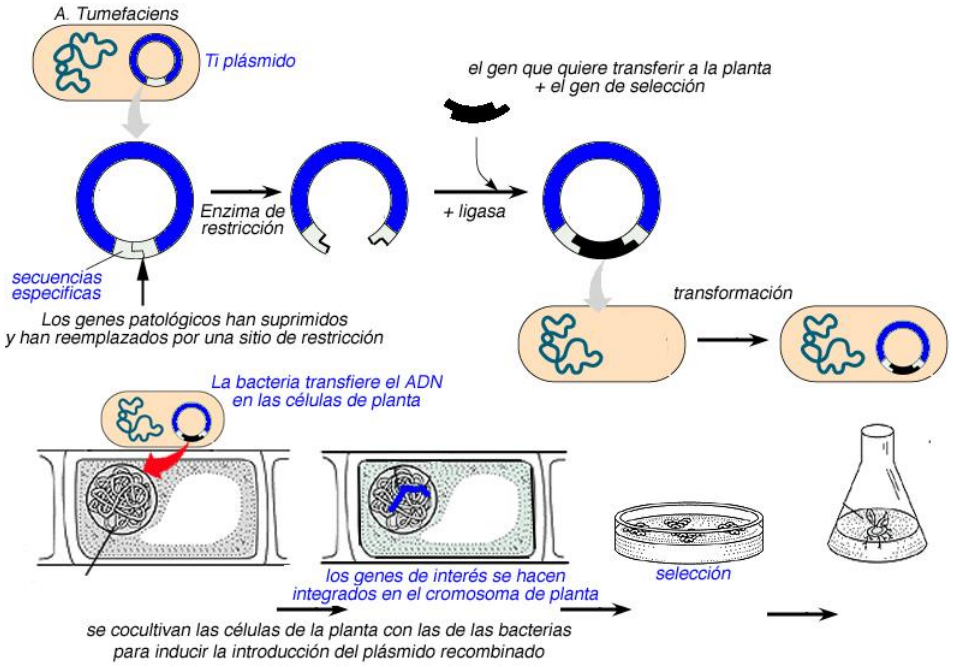

Figura 2: Esquema de la transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Existen otros métodos de transformación como el choque térmico, o la microinyección, pero no son de utilidad en la transformación de células vegetales.

EXPRESIÓN DE GENES EXÓGENOS.

Con frecuencia los genes introducidos presentas problemas de expresión y mantenimiento en las células. Debido a esto, es necesario incluir en los vectores, junto a los genes, regiones reguladoras que permitan la expresión de éstos. Así, el promotor es la región del DNA reconocida por el factor σ de la RNA polimerasa para el inicio de la transcripción, siendo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) el más utilizado para la expresión constitutiva de los genes insertados en plantas (Benfey & Chua, 1990). La secuencia terminadora determina el final del proceso de transcripción facilitando la disociación del complejo DNA:RNA polimerasa:RNA, siendo el terminador de la nopalina sintasa (NOS) el más utilizado en la transformación vegetal.

3.2.2. APLICACIONES DE LA INGENIERÍA GENÉTICA EN LA ALIMENTACIÓN.

La tecnología del DNA recombinante o ingeniería genética se está utilizando en el campo de la producción de alimentos con distintas finalidades, y sus perspectivas de futuro, tanto en el aspecto científico como tecnológico, son muy prometedoras.

Las primeras aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante en el campo de los alimentos han sido la obtención, en microorganismos, de proteínas con aplicaciones en el campo alimentario, entre las que destacan la hormona de crecimiento bovina, o somatotropina, y la quimosina bovina.

Mediante técnicas de ingeniería genética se ha obtenido somatotropina recombinante en *E. coli* en gran cantidad, que al ser suministrada mediante inyección a las vacas puede aumentar su producción de leche alrededor del 15%. Su utilización está autorizada en Estados Unidos desde el año 1994, donde alrededor de un tercio de las vacas lecheras reciben este tratamiento, pero no en la Unión Europea (Calvo, 2006).

El uso de quimosina recombinante fue autorizado por primera vez en Suiza en 1988. En Estados Unidos más del 80% del queso se fabrica actualmente utilizando quimosina recombinante. Sin embargo, en la Unión Europea los problemas burocráticos asociados a las normativas específicas de quesos con denominación de origen (¿debe considerarse a la quimosina recombinante un cuajo animal o un cuajo microbiano?) han frenado su difusión. Actualmente la quimosina recombinante es producida por distintos microorganismos, tales como *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces*

lactis y *E. coli*, siendo esta última la de menor presencia en el mercado (Carballo, 2002; Calvo, 2006).

Las levaduras de uso industrial también se han modificado con el fin de mejorar los productos alimentarios obtenidos de su utilización. Así, se han producido modificaciones en levaduras viníferas para aumentan el aroma del vino o su concentración en compuestos beneficiosos como el resveratrol (Carballo, 2002; Ramón, 2003; Ramón, 2004). Las levaduras panaderas modificadas han sido desarrolladas para optimar el rendimiento de la panificación (Ramón, 2004; Calvo, 2006). También se han desarrollado levaduras cerveceras que mejoran el rendimiento del proceso industrial y las características finales del producto (Ramón, 2004; Calvo, 2006; Morcillo et al., 2011).

Los desarrollos científicos alcanzados en la modificación de animales no han llegado aún a etapas comerciales debido, probablemente, a las repercusiones éticas y sociales que entraña la modificación genética de animales. Los principales aspectos de interés son los genes vinculados al crecimiento rápido y la obtención de leche con proteínas específicas como la lactoferrina, que presenta aplicaciones biomédicas (Calvo, 2006).

Es en el campo de la acuicultura donde mayores perspectivas presenta esta técnica, ya que se han conseguido carpas y salmones de mayor tamaño con múltiples copias del gen de la hormona de crecimiento de la trucha, sin problemas patológicos y manteniendo las características organolépticas de los animales sin transformar (Ramón, 2003). En la actualidad, la Food and Drug Administration de Estados Unidos está llevando a cabo los últimos informes que conducirán a la aprobación para consumo del primer animal modificado genéticamente. Se trata del salmón AquAdvantage® al que se le ha introducido un transgen construido a partir del gen de la hormona de crecimiento de *Oncorhynchus tshawytscha,* una especie próxima. Esta inserción le confiere un fenotipo de crecimiento rápido, con lo que el salmón alcanza el tamaño de mercado en la mitad de tiempo que el salmón atlántico sin transformar. El salmón AquAdvantage® estará solo disponible como hembra, con huevos estériles y solo puede criarse en acuicultura con agua dulce (Clifford, 2013).

3.3. VEGETALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.

La modificación genética de vegetales desde una perspectiva biotecnología ha sido el campo de mayor expansión para esta tecnología, desde que en el año 1983 científicos de la multinacional Monsanto lograran la primera planta GM al introducir en una planta de tabaco el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, pero no fue hasta el año 1994 cuando se comercializó el primer vegetal modificado genéticamente, el tomate Flavr Savr. En el año 1996 se cultivan en Estados Unidos las primeras variedades de maíz y soja transgénicas y la primera variedad de maíz Bt (toxinas producidas por *Bacillus thuringiensis*) no se autorizó en Europa hasta el año 1998 (Morcillo et al., 2011).

La modificación genética de vegetales se puede lograr mediante la aplicación de dos estrategias:

a) **supresión génica**. Se trata de eliminar el gen o genes responsables de la característica de la planta que se desea modificar. Generalmente no se trata de eliminar físicamente el gen, sino de inactivar el producto génico para impedir, retardar o ralentizar su acción. La estrategia que mejores resultados ha dado en este sentido ha sido la introducción en el genoma de la planta de un gen que sea el inverso complementario, denominado gen antisentido del gen que se pretende modificar, de tal forma que cuando se transcribe el RNA hibridará e inactivará al gen normal (Morcillo et al., 2011).

b) **adición génica.** Se pretende que la planta adquiera una nueva característica o propiedad y para ello se le introduce un nuevo gen, o genes que puede proceder de la misma planta o de otros organismos (Morcillo et l., 2011).

GENES ANTISENTIDO.

Como se mencionó anteriormente, los genes antisentido no inducen la expresión de una proteína nueva, sino que evitan la síntesis de una existente en el vegetal no transgénico. Mediante este sistema, la empresa Calgene desarrolló en 1994 el tomate *Flavr Savr* resistente al ablandamiento al contener un gen antisentido de poligalacturonasa. En este tomate el gen antisentido produce la síntesis de un m-RNA complementario del m-RNA de la poligalacturonasa, que al unirse a él impide la síntesis de la enzima (Ramón, 2003; Montes de Oca, 2013). Esta metodología es válida para la modificación de otras especies vegetales, como por ejemplo, la patata, que se modificó mediante la inserción de una copia antisentido del gen de la polifenoloxidasa, enzima responsable de su pardeamiento (Carballo, 2002).

GENES DE RESISTENCIA A INSECTOS Y OTROS PATÓGENOS.

La resistencia a insectos está basada en genes de diversas toxinas producidas por *Bacillus thuringiensis*, una bacteria patógena para determinados lepidópteros. Esta familia de proteínas se une específicamente a determinados receptores que solamente existen en el tubo digestivo de este tipo de insectos. Su acción es muy selectiva, mucho más que la de los insecticidas químicos, para la inmensa mayoría de los animales es simplemente una proteína más metabolizada como el resto de las proteínas (Calvo, 2006; Montes de Oca, 2013).

Otra aproximación para la obtención de variedades vegetales resistentes a insectos es mediante la expresión de proteínas presentes en variedades resistentes, especialmente lectinas. La actuación de las lectinas es menos específica y sería necesario llevar a cabo diversos estudios antes de su comercialización, para demostrar que no existe toxicidad para animales distintos del diana ni para los humanos, en el caso de que el alimento se consumiera crudo (Calvo, 2006; Montes de Oca, 2013).

Científicos de la Universidad de Cornell (EEUU) también han conseguido transferir del genoma de la patata al de plantas de arroz genes inhibidores de proteasas (inhibidor II de la proteasa) de *Sesamia inferens* que es la plaga más importante del arroz. Las proteasas degradan las proteínas del vegetal para llevar a cabo la infección. Biotecnólogos de la compañía Bayer y el Instituto Max Plank de Colonia lograron producir patatas transgénicas que producen resveratrol con capacidad antibiótica frente al hongo *Phytophtora infestans*, causante de la destrucción de los cultivos de patata a finales del siglo XIX (Carballo, 2002).

GENES DE RESISTENCIA A HERBICIDAS.

Los herbicidas habituales actúan inhibiendo una enzima clave en una ruta biosintética del vegetal, lo que produce su muerte. La aplicación de herbicidas para eliminar las malas hierbas da lugar a problemas medioambientales por acumulación de productos químicos tóxicos, difíciles de eliminar, y por otro lado a problemas técnicos por aparición de malas hierbas resistentes a los productos fitosanitarios. Existe una nueva generación de herbicidas de los que aún no aparecieron variedades resistentes y que son menos contaminantes, ya que son rápidamente degradados por las bacterias del suelo, como es el caso del glifosato. El glifosato presenta el inconveniente de que también afecta a las variedades cultivadas a no ser que estas se modifiquen mediante ingeniería genética para hacerlas resistentes. Para lograr

variedades resistentes se puede insertar en la planta el gen de una enzima que no se vea inhibido por el herbicida o bien insertar el gen de una enzima que destruya el herbicida (Ramón, 2003; Sánchez, 2008).

La soja resistente al glifosato se ha obtenido gracias a la inserción de un gen bacteriano para la enzima enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), la cual está involucrada en la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos (Figura 3). El enzima equivalente de la soja es inhibido por el herbicida, pero el bacteriano es resistente al mismo, de tal forma que no se corta la correspondiente ruta metabólica y se puede usar el herbicida en cualquier momento del desarrollo del cultivo sin que éste se vea afectado, eliminado de esta forma las malas hierbas sin disminuir el rendimiento de la cosecha (Calvo, 2006; Montes de Oca, 2013).

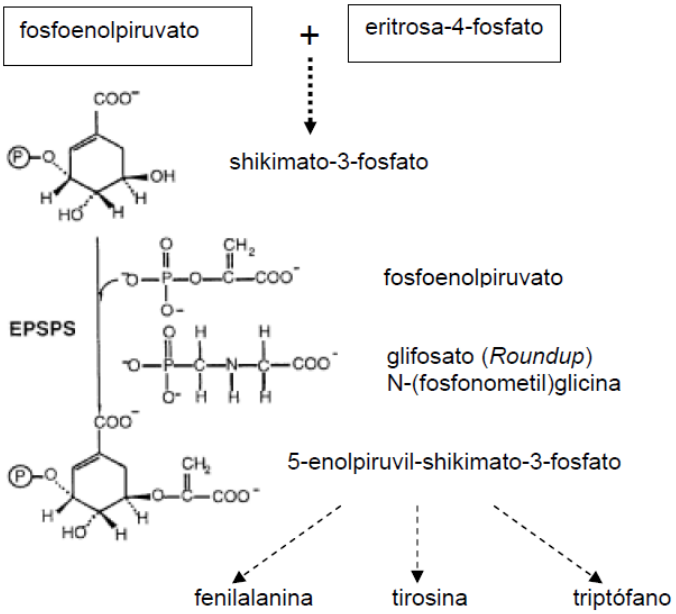

Figura 3: Ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos (Fuente Querci & Mazzada, 2007).

El glufosinato (fosfinotricina) es otro herbicida que actúa inhibiendo la actividad de la glutamina sintetasa, lo que tiene como consecuencia la acumulación de amoníaco y la muerte de la planta. Se han desarrollado variedades transgénicas de colza, maíz o remolacha resistentes a este herbicida, insertando en el genoma de las mismas el gen de la fosfinotricin-acetiltransferasa procedente de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*. Esta enzima es capaz de acetilar el glufosinato en una sustancia inactiva (Calvo, 2006; Montes de Oca, 2013).

UTILIZACIÓN DE TIERRAS MARGINALES.

La mayor proporción de la superficie disponible está limitada en uso agrícola por ser muy salina o alcalina. Con el fin de desarrollar variedades tolerantes a elevadas concentraciones de sal se ha logrado identificar, clonar y transferir un gen de tolerancia a la misma presente en el mangle *Avicennia marina* a distintas especies vegetales. Asimismo, se ha transferido el gen *gutD* de *E. coli* al maíz obteniéndose una especie transgénica tolerante a la sal. Estas nuevas variedades representan una fuente potencial para el establecimiento de cultivos en áreas hasta ahora sin utilización (Rivas, 2008). Mediante la ingeniería genética también se podría mejorar la capacidad de los cultivos para desarrollarse en suelos con altos niveles de acidez o elementos tóxicos, tales como aluminio o boro (Skerritt, 2000).

CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN.

En la actualidad se están desarrollando los denominados "organismos modificados genéticamente de segunda generación" en los se están produciendo cambios en su composición encaminados a aumentar su calidad nutricional.

Uno de los primeros transgénicos obtenido en 1995 por la empresa biotecnológica Calgene fue una variedad de colza con un aceite especialmente rico en ácido laúrico, obtenida insertando el gen de la tioesterasa que es la proteína transportadora del ácido laúrico del laurel de California. El aceite obtenido de esta variedad de colza es bajo en ácidos grasos saturados, bajo en triglicéridos, rico en aceites marinos, enriquecido en algunos micronutrientes como la vitamina E y A, y además se su producción es de bajo costo, También se ha logrado modificar la naturaleza de los hidratos de carbono en la remolacha introduciendo los genes que codifican para enzimas de la ruta de síntesis de la inulina o fructanos, aumentando considerablemente su producción. La inulina o fructanos se utilizan como edulcorante de bajas calorías y también como sustituto graso en la elaboración de alimentos (Calvo, 2006; Montes de Oca, 2013).

El arroz dorado es el primer organismo genéticamente modificado destinado a mejorar la nutrición de las poblaciones más necesitadas. Se trata de un arroz transformado que acumula en el embrión β-caroteno y otros carotenos, precursores de la vitamina A. La OMS estima que hay 124 millones de niños en todo el mundo padecen deficiencia en esta vitamina, de forma que el suministro de vitamina A, o su precursor β-caroteno, salvaría la vida a un millón y medio de niños cada año,

especialmente en las zonas donde el arroz es el alimento básico como el sudeste asiático y ciertas regiones de África y América Latina (FAO, 2002).

La base metabólica de la deficiencia de esta vitamina se fundamenta en que la planta de arroz solo sintetiza carotenoides en las hojas, pero la parte comestible del grano de arroz, que es el endospermo, está constituido por gránulos de almidón y cuerpos proteicos, pero carece de varios nutrientes esenciales para el mantenimiento de la salud tales como el β-caroteno. La estrategia para lograr este arroz es fortificarlo en vitamina A mediante fitomejoramiento, pero para ello son necesarias técnicas recombinantes debido a la falta de especies de arroz que produzcan β-caroteno en el endospermo, en conclusión mediante ingeniería genética se introdujeron los genes de las enzimas deficientes en el endospermo del arroz que están implicadas en la síntesis de vitamina A (Ye et al., 2000; Beyer et al., 2002).

3.3.1. ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE APROBADOS EN LA UE.

Para la obtención del permiso de comercialización los cultivos y alimentos transgénicos se someten a una serie de evaluaciones previas. En la Unión Europea es la European Food and Safety Agency (EFSA) la responsable de realizar estas evaluaciones después de valorar las opiniones de los comités de bioseguridad y/o las agencias de seguridad alimentaria de los estados miembros. En nuestro país la evaluación técnica de los GMOs es una responsabilidad del Comisión Nacional de Bioseguridad dependiente del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, pero la autorización es responsabilidad del llamando Órgano Colegiado dependiente de este ministerio. Además recientemente se ha creado la Comisión Nacional de Biovigilancia que debe velar por la coexistencia de los cultivos GMs y los tradicionales.

La autorización de comercialización de productos que contengan, se compongan o se hayan producido a partir de GMOs se produce a través de la publicación en el Diario Oficial de la Unión Europea de Decisiones de la Comisión, que serán específicas para cada GMO. Para la concesión de esta autorización de comercialización, con una validez de 10 años, es necesaria la emisión de un dictamen favorable de la EFSA en el cual se concluya que “no es probable que la comercialización de productos que contienen, se componen o se han producido a partir de GMO según se describen en la solicitud («los productos»), vaya a tener efectos perjudiciales para la salud humana o animal ni para el medio ambiente, si se emplean para los usos previstos”.

En las distintas Decisiones de la Comisión también se establece la necesidad de notificación de la Decisión a las partes del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, así como la introducción de toda la información sobre la autorización de los productos en el Registro Comunitario de Alimentos y Piensos Modificados Genéticamente establecido en el Reglamento (CE) nº 1829/2003. Asimismo, se fija la necesidad de asignar a cada GMO un identificador único con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 65/2004. En la Decisión también se establece la obligación por parte del titular de la autorización de asegurarse de que se fija y aplica el plan de seguimiento de los efectos ambientales especificados en el anexo VII de la Directiva 2001/18/CE, y la necesidad de presentar a la Comisión informes anuales sobre la aplicación y los resultados de las actividades expuestas en el seguimiento.

Hasta junio de 2014 y según lo dispuesto en primer lugar por el Reglamento (CE) nº 258/1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios y actualmente bajo el Reglamento (CE) nº 1829/2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, se han emitido por la Comisión 52 Decisiones por las que se autoriza la comercialización de productos que contienen, se componen o se han producido a partir de GMOs. Estas 52 autorizaciones corresponden a distintas variedades de 5 especies aprobadas para formar parte de alimentos y piensos como son el maíz (28 variedades), el algodón (8 variedades), la soja (7 variedades), la colza (5 autorizaciones) y la remolacha azucarera (1 autorización). Asimismo, existen 3 autorizaciones de comercialización exclusivamente para piensos, como son la patata (1 autorización) y microorganismos modificados para producir mayor cantidad de biomasa (2 variedades) (EU Register of authorised GMOs, 2014). Todas estas variedades han sido genéticamente mejoradas para aumentar su rendimiento agronómico, presentado de este modo resistencia a herbicidas o a plagas. La mayor parte de estas autorizaciones se han concedido a empresas líderes en el sector de la agrobiotecnología a nivel mundial como son Monsanto, Bayer, Syngenta y Pioneer.

Cabe mencionar que aunque el proceso de autorización de alimentos y piensos GMs es único y centralizado a nivel europeo, el acuerdo alcanzado actualmente debido a una solicitud realizada en el año 2009 por 13 Estados miembros, ofrece una base jurídica que posibilita a los Estados miembros prohibir o restringir el cultivo, en la totalidad o en parte de su territorio, de los GMOs que han sido autorizados a nivel de la Unión Europea (EU New Eu approach, 2014).

En el año 2010, la patata GM conocida como “Amflora” fue autorizada para cultivo y procesamiento industrial de almidón procedente de la misma, sin embargo esta variedad ya no se cultiva en la UE desde 2011.

3.3.2. VARIEDADES DE SOJA GENÉTICAMENTE MODIFICADAS APROBADAS EN LA UE.

En la actualidad la Comisión Europea, con arreglo al Reglamento (CE) nº 1829/2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, ha autorizado la comercialización de productos que contengan, se compongan o se hayan producido a partir de 7 variedades de soja modificada genéticamente (Tabla 2).

Tabla 2: Variedades de soja GM aprobadas en la UE.

Evento/ Identificador	Compañía	Decisión autorización	Gen insertado	Método de inserción	Uso
A2704-12/ ACS-GMØØ5-	Bayer CropScience AG	2008/730/CE	*pat* de *Steptomyces viridochromogenes*	Biolística	Resistencia herbicidas (glufosinato)
MON89788/ MON-89788-1	Monsanto	2008/933/CE	*cp4 epsps* de *Agrobacterium tumefaciens*	*Agrobacterim tumefaciens*	Resistencia herbicidas (glifosato)
356043/ DP-356Ø43-5	Pioneer Overseas Corporation	2012/84/EU	*gem-hra* de *Glycine max* *gat4601* de *Bacillus licheniformis*	Biolística	Resistencia herbicidas
40-3-2/ MON-Ø4Ø32-6	Monsanto	2012/82/EU	*cp4 epsps* de *Agrobacterium tumefaciens*	Biolística	Resistencia herbicidas (glifosato)
A5547-127/ ACS-GMØØ6-4	Bayer CropScience AG	2012/81/EU	*pat* de *Steptomyces viridochromogenes*	Biolística	Resistencia herbicidas (glufosinato)
MON 87701/ MON-877Ø1-2	Monsanto	2012/83/EU	*cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*	*Agrobacterium tumefaciens*	Resistencia lepidópteros
MON 87701 x MON 89788/ MON-877Ø1-2x MON-89788-1	Monsanto	2012/347/EU	*cry1Ac* *cp4 epsps*	Hibridación	Resistencia herbicidas y lepidópteros

En el artículo 2 de las diversas Decisiones se autoriza a las distintas variedades de soja aprobadas para su utilización como piensos, alimentos e ingredientes alimentarios que contengan, se compongan o se hayan producido a partir de soja modificada genéticamente o productos distinto de alimentos y piensos, que contengan se compongan de soja modificada genéticamente, para los mismos usos que cualquier otra soja, a excepción del cultivo.

3.3.3. PRODUCCIÓN DE CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.

El año 2013 fue el 18º año de comercialización de cultivos GMs durante los cuales la superficie dedicada a cultivos GMs ha crecido más de 100 veces, desde las 1,7 millones de hectáreas sembradas en 1996 hasta las 175,2 millones de hectáreas cultivas la campaña pasada. Estos 175,2 millones de hectáreas se repartieron en 27 países, 19 de los cuales son considerados países en desarrollo y 8 industrializados. De estos 27 países 19 cultivan 50.000 hectáreas o más (Tabla 3). Durante este año 2013 países como Blangladesh, Panamá, Sudán o Camerún están realizando estudios preliminares para la aprobación de cultivos GMs, con lo que se espera que el número de países que permitan este tipo de cultivos aumente en este año (James, 2014).

Las variedades GMs han sido cultivas por 18 millones de agricultores en el año 2013, más del 90% de los cuales fueron pequeños agricultores de países en desarrollo con escasos recursos, por ejemplo 14,8 millones de pequeños agricultores de China e India ha cultivado algodón GM. Asimismo, se estima que los agricultores han reducido aproximadamente el 50% la cantidad de aplicaciones de insecticidas (James, 2014).

En la Unión Europea se cultiva con fines comerciales la variedad GM de maíz MON 810, resistente a la plaga de barrenadores del maíz. En el año 2013 la variedad MON 810 se cultivó en 5 Estados miembros (España, Portugal, República Checa, Rumanía y Eslovaquia) en una superficie total de casi 150.000 hectáreas, de las cuales 137.000 fueron en España. Esto representa el 1,56% de los 9,6 millones de hectáreas de maíz cultivadas en la UE y el 0,26% del total de hectáreas de maíz transgénico cultivadas en el mundo (James, 2014).

Tabla 3: Principales países productores de cultivos GM en 2013 (Fuente: James, 2014).

Nº	País	Superficie (millones de hectáreas)	Cultivos biotecnológicos
1	EE.UU	70,1	Maíz, soja, algodón, colza, remolacha azucarera, alfalfa, papaya, calabaza
2	Brasil	40,3	Soja, maíz, algodón
3	Argentina	24,4	Soja, maíz, algodón
4	India	11,0	Algodón
5	Canadá	10,8	Colza, maíz, soja, remolacha azucarera
6	China	4,2	Algodón, papaya, álamo, tomate, pimiento
7	Paraguay	3,6	Soja, maíz, algodón
8	Sudáfrica	2,9	Maíz, soja, algodón
9	Pakistán	2,8	Algodón
10	Uruguay	1,5	Soja, maíz
11	Bolivia	1,0	Soja
12	Filipinas	0,8	Maíz
13	Australia	0,6	Algodón, colza
14	Burkina Faso	0,5	Algodón
15	Myanmar	0,3	Algodón
16	España	0,1	Maíz
17	México	0,1	Algodón, soja
18	Colombia	0,1	Algodón, maíz
19	Sudán	0,1	Algodón
20	Chile	<0,1	Maíz, soja, colza
21	Honduras	<0,1	Maíz
22	Portugal	<0,1	Maíz
23	Cuba	<0,1	Maíz
24	República Checa	<0,1	Maíz
25	Costa Rica	<0,1	Algodón, soja
26	Rumanía	<0,1	Maíz
27	Eslovaquia	<0,1	Maíz
Total		**175,2**	

En relación a las variedades cultivadas, estas corresponden en su mayoría a 4 especies como son el maíz, la soja, la colza y el algodón (Tabla 4). Si bien es cierto que el maíz es la especie vegetal que presenta mayor número de variedades GMs y es cultivada por más países, no es en maíz si no la soja la que representa mayor número de hectáreas cultivadas.

Tabla 4: Cultivos GM más importantes (Fuente: James, 2013).

Cultivo	Superficie (millones de hectáreas)	% sobre el total plantado	Total de países
Soja	84,5	79%	11
Algodón	23,9	70%	15
Maíz	57,4	32%	17
Colza	8,2	24%	4

3.3.4. IMPLICACIONES DE LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.

Desde el inicio de la aplicación de la ingeniería genética en la mejora de los cultivos, ha aparecido en la sociedad una creciente preocupación acerca del posible impacto negativo sobre el medio ambiente y la salud humana y animal que la incorporación de estos GMOs a la agricultura puede conllevar.

No existe un consenso científico en relación a los efectos que los GMOs tienen o podrían tener sobre los ecosistemas y la salud, y las distintas investigaciones publicadas son criticadas por la comunidad científica, poniendo en duda tanto la metodología empleada como los resultados obtenidos. El hecho de que gran parte de las investigaciones sobre estos cultivos se realizan bajo el amparo de las grandes multinacionales agrobiotecnológicas conlleva una gran desconfianza por parte de los consumidores sobre la imparcialidad de los resultados mostrados.

Otra de las críticas realizadas tiene su base en el monopolio que las grandes multinacionales del sector agroalimentario ejercen con los cultivos GMs. Está claro que el proceso que concluye con la comercialización de un GMO es largo y costoso, y supone que estas semillas se comercializan bajo patente. Una forma de combatir la posible violación de la patente es introducir en la planta transgénica un “gen suicida”, con lo que estas plantas serían viables solo una cosecha ya que producirían semillas

estériles, obligando a los agricultores a adquirir nuevas semillas cada año, con el consiguiente desembolso económico. Esto implica una elevación en su precio que podría suponer que pequeños agricultores y productores de países en desarrollo no podrán tener acceso a las mismas (Verma et al., 2011).

GMOs Y MEDIO AMBIENTE.

Entre los beneficios medioambientales que se podrían obtener con la adopción de los cultivos GMs destaca la reducción en el uso de fitosanitarios que conlleva la adopción de cultivos resistentes a determinados insectos. Esta reducción podría suponer un aumento en las poblaciones animales y de insectos beneficiosos, una mayor limpieza de las aguas y una reducción del consumo de combustibles derivados de la menor necesidad de aplicación de estos productos (Ubalua, 2009). Diversos estudios ponen de manifiesto que la adopción de cultivos transgénicos ha permitido el uso de 393 millones de kg menos pesticidas por los agricultores, lo que se tradujo en la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero que en 2009 fue equivalente a retirar 7,8 millones de coches de las carreteras (Ahmad et al., 2012). Asimismo, la mejora en el control de las malas hierbas proporciona las condiciones adecuadas para la siembra directa, con lo que se reduce la erosión del suelo (Ubalua, 2009).

Entre los posibles riesgos sobre el medio ambiente atribuidos a las plantas transgénicas, destacan la invasión del ecosistema por parte de la planta GM desplazando a las especies establecidas, el flujo de los genes introducidos mediante la transferencia de polen o la posibilidad de desarrollo de resistencias por parte de los organismos existentes en el entorno, sean diana o no (Deisingh & Badrie, 2005; Ubalua, 2009; Verma et al, 2011). Otra preocupación se refiere a la posibilidad de la dominación comercial de un número limitado de variedades, lo que supondría una pérdida de biodiversidad en los cultivos. En este término cabe mencionar que esta pérdida de biodiversidad también pude producirse si se emplea un número limitado de variedades domesticadas por técnicas tradicionales, con lo que sería aconsejable la creación de bancos de germoplasma que permitan la conservación de las distintas especies.

Las variedades resistentes a insectos se presentaron como una solución permanente a estas plagas, pero está claro que, como sucede con los pesticidas, surgirán organismos resistentes a estas variedades a lo largo del tiempo. Lo mismo podría ocurrir con los herbicidas si se utilizan de manera incontrolada, reduciendo su

sensibilidad en las malas hierbas y generándose de este modo un problema mayor al desarrollarse malas hierbas súper resistentes (Verma et al, 2011).

En lo concerniente a la transferencia de genes entre la variedad GM y el resto de plantas existentes en el ecosistema, para que esta se pueda producir sería necesario que las dos especies floreciesen al mismo tiempo, y que el polen fuese transportado hasta la variedad no GM. Estas dos plantas tendrían que ser sexualmente compatibles y capaces de producir una descendencia fértil. Esta posibilidad de transferencia de genes puede contemplarse en un medio donde el cultivo GM presente especies silvestres próximas con las que pueda reproducirse (Lövei, 2001; Nicola et al., 2013).

En cuanto al desarrollo de resistencias o la pérdida de biodiversidad de los organismo diana de las especies resistente a insectos, se establece que en los cultivos deben existir “refugios” en los cuales se plantarán la variedad convencional sensible, de este modo la plaga se ceba con la variedad sensible y se retrasa la generación de resistencias y el dominio en el medio de esta población resistente, en el caso de desarrollarse (Lövei, 2001; Nombela et al., 2005; Bakshi & Dewan, 2013). En lo referente a la transferencia horizontal a microorganismos asociados, aunque existen evidencias de la persistencia del DNA de la planta transgénica, no se ha conseguido probar la transmisión de este DNA a las bacterias del suelo en condiciones de campo (Ubalua, 2009; Verma et al, 2011). Otros estudios consiguieron demostrar que la planta GM puede alterar el entorno microbiológico asociado a sus raíces y se ha visto que esta alteración varía en función de las condiciones del terreno, con lo que las características del mismo juegan un papel clave en esta modificación. Asimismo, se ha sugerido que esta alteración en los microorganismos asociados no es permanentes en el tiempo (Ubalua, 2009).

GMOs Y SALUD HUMANA.

En relación a la salud humana, una de las preocupaciones existentes se basa en la presencia de genes de resistencia a antibióticos, usados como marcadores de selección en las plantas GMs, que podrían transferirse a bacterias del tracto gastrointestinal y generar bacterias resistentes. La producción de nuevos alérgenos o el aumento de la toxicidad son otros efectos potenciales que preocupan en la evaluación de la seguridad (Deisingh & Badrie, 2005; Ubalua, 2009). Según la OMS y otros organismos internacionales la posibilidad de efectos adversos derivados de la presencia de DNA transgénico en los alimentos, ya sea por la toxicidad o por la trasferencia directa de genes sería mínimo (Domingo, 2007).

El aumento de la toxicidad podría deberse a que la inserción del gen podría dañar otros genes de la planta dando como resultado una producción de mayores niveles de toxinas. Asimismo, este nuevo gen podría interferir en alguna ruta metabólica dando como resultado una producción de toxinas en la planta. Este posible aumento de los niveles de toxinas no se ha podido demostrar en plantas GMs (Ubalua, 2009). Otra preocupación radica en la posibilidad de inclusión de alérgenos en especies que antes no los contenían (Verma et al., 2001). Dado que hay extensas bases de datos de secuencias de aminoácidos de los alérgenos conocidos, los genes considerados para su uso en la transformación de cultivos alimentarios se evalúan previamente en estas bases de datos (Skerritt, 2000).

Como se mencionó anteriormente, existe una gran controversia en la metodología utilizada en los ensayos realizados para determinar los posibles efectos de los GMOs sobre la salud, poniéndose en evidencia tanto la duración como el tamaño muestral utilizado en los distintos estudios (Domingo, 2007). Así, se han puesto en evidencia diferentes ensayos de laboratorio realizados con ratas alimentas con distintas variedades de GMOs, en los que se observaron daños hepáticos y modificaciones pancreáticas y en órganos reproductivos (Verma et al., 2011). Otros estudios realizados también en ratas, mostraron que no había diferencias significativas en el sistema inmunológico de ratas alimentadas con soja GM y soja no GM (Domingo, 2007).

Está claro que son necesarios más ensayos y mejores metodologías para valorar los posibles efectos adversos que estos cultivos pueden producir sobre la salud, tanto humana como del resto de animales, ya que los científicos todavía tienen una visión incompleta de la fisiología, la genética y el valor nutricional de los cultivos GMs.

3.4. DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.

La base de las técnicas de detección de GMOs es revelar las diferencias entre la variedad no modificada y la planta transgénica, esto es la detección del gen insertado o la proteína resultado de la expresión del nuevo gen (Gachet et al., 1999). En base a esto, en la actualidad se utilizan dos aproximaciones para la detección de plantas transgénicas como son la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) y el “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas” (ELISA).

Los métodos de monitoreo que permiten la detección de un elevado número de GMOs en los alimentos, son unas herramientas esenciales para los análisis rutinarios. Sin embargo, estos métodos no permiten la identificación de la variedad individual presente, con lo que son necesarios métodos analíticos posteriores que permitan discernir el GMO concreto presente. La estrategia más común se basa en la amplificación mediante PCR de secuencias que se encuentran en el mayor número posible de GMOs, como los promotores y terminadores insertados en la mayor parte de las plantas transgénicas aprobadas. Así, las dos secuencias más utilizadas son el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS) (García-Cañas et al., 2004; Özgen et al., 2013). Se ha determinado que el límite de detección de la PCR utilizando el promotor 35S, para GMO en alimentos y materias primas, se encuentra entre el 0.01 y el 0.1% (Deisingh & Badrie, 2005).

Los métodos basados en la detección de estas secuencias, promotor 35S y terminador NOS, fueron los primeros métodos validados a nivel de la Unión Europea para la realización de un monitoreo de las muestras. La validación de este método para la detección de la mayoría de GMOs autorizados para su comercialización fue coordinada por la antigua Unidad de productos alimentarios y bienes de consumo del Instituto de la Salud y la Protección de los Consumidores, del Centro Común de Investigación, y se hizo en colaboración con el Instituto de Medidas y Materiales de Referencia del CCI, encargado de la producción de los materiales de referencia certificados (Querci, 2007). En relación a esto, existen materiales de referencia certificados que sirvan de controles positivos con la finalidad de validar los distintos procedimientos basados en la detección del DNA (Bogani et al., 2009).

3.4.1. MÉTODOS BASADOS EN LA DETECCIÓN DEL DNA.

La mayor estabilidad térmica del DNA y el hecho de que está presente en la mayoría de los tejidos biológicos hace que sea el analito más adecuado para la detección de los GMOs. La mayoría de los métodos utilizados para la detección del DNA se basan en el uso de la PCR, siendo la técnica más utilizada (Querci, 2007). Una alternativa a los métodos basado en la PCR es el uso de microarrays de DNA para la detección y cuantificación de GMOs en un único ensayo, tecnología que se encuentra en fase de desarrollo (García-Cañas, 2004; Miragliaa et al, 2004; Deisingh & Badrie, 2005; Holst-Jensen, 2009; Nikolic et al., 2009).

La limitación de los métodos basados en DNA es que no permiten diferenciar entre GMO y la presencia natural de los elementos transgénicos utilizados en la

detección como son el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador NOS, pudiendo dar lugar a falsos positivos en la detección (Deisingh & Badrie, 2005).

PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR) fue desarrollada a mediados de los años ochenta por el bioquímico estadounidense Kary Mullis, galardonado con el premio Nobel en 1993. La invención de esta técnica supuso una revolución en el campo de la biología molecular al permitir la amplificación selectiva de una región concreta del DNA.

Mediante la PCR y gracias a la utilización de cebadores específicos diseñados para hibridarse con regiones concretas del gen de interés, se permite la amplificación selectiva de éste cuando está presente en baja frecuencia en una mezcla compleja con otras secuencias de DNA. El conocimiento previo de la conformación molecular del gen introducido y los elementos reguladores que lo franqueen es un aspecto clave para la detección efectiva de los GMOs mediante PCR, para lo cual también es necesario disponer de una cantidad mínima de DNA intacto de la muestra que incluya el gen diana de interés (Lin et al., 2000; Deisingh & Badrie, 2005).

Entre las características más salientables de la PCR en la detección de GMOs presentes en muestras alimentarias podemos destacar (Querci, 2007):

- Es una técnica extremadamente sensible que posee la capacidad de detectar la presencia de pocos ejemplares del gen o secuencia de interés dentro del genoma del organismo. Debido a esta elevada sensibilidad es posible obtener falsos positivos con niveles muy bajos de contaminación accidental.
- Los reactivos necesarios están disponibles de forma comercial y su preparación exige poco tiempo en comparación con los reactivos necesarios para los ensayos inmunológicos,
- El análisis de las muestras es relativamente rápido, un día aproximadamente.
- Es posible identificar productos transgénicos específicos utilizando una metodología adecuada y validada.

PCR EN TIEMPO REAL.

La PCR cuantitativa en tiempo real es probablemente el método más preciso disponible actualmente para la cuantificación de GMOs. El límite de cuantificación se estableció entre 30-50 moléculas de DNA recombinante, si bien este varía en función de la variedad o matriz en la que se encuentre (Deisingh & Badrie, 2005). Es importante mencionar que la PCR a tiempo real es el método de referencia, validado por laboratorios de control, aceptado en la Unión Europea para la detección de las distintas variedades de soja GM debido a su elevada sensibilidad, especificidad y la capacidad de utilizarla con muestras procedentes de diferentes matrices alimentarias (Ahmed, 2002).

En la actualidad se están llevando a cabo diversos estudios para la utilización de la PCR en tiempo real combinada con la PCR múltiple en la detección de GMOs. Mediante el empleo de esta tecnología se permite la identificación individual de la variedad modificada presente en la muestra, gracias al diseño de primers específicos para cada una, y su cuantificación. Existen procedimientos basados en la PCR múltiple no solo para la detección de las distintas variedades de soja modificada, sino también para la detección simultánea de diversas especies de GMOs, como podrían ser maíz, soja y colza (James et al., 2003; Germini et al., 2004; Wang & Fang, 2005; Nikolic, 2009). La aplicación de esta tecnología supone una reducción en los tiempos necesarios para la realización de un monitoreo de las muestras con la finalidad de detectar GMOs, pero la dificultad de este procedimiento radica en la puesta a punto de la PCR que disminuya la posibilidad de hibridación inespecífica de los distintos primers utilizados, debido a que cada pareja de primers presenta una temperatura óptima de hibridación.

La utilización de los distintos métodos basado en la PCR además de la detección de sus componente, permite seguir la trazabilidad lo largo de la cadena de distribución de estas plantas GMs que formarán parte de alimentos y piensos (Miraglia et al., 2004; Bogani et al., 2009).

3.5. LEGISLACIÓN.

3.5.1. LEGISLACIÓN EN MATERIA DE TRANSGÉNICOS.

En relación a la comercialización internacional de alimentos compuestos por GMOs, no existen en la actualidad sistemas reglamentarios específicos que regulen

internacionalmente este ámbito. En el año 2004, la Comisión del Codex Alimentarius (Codex) estableció una serie de principios para el análisis de riesgos para la salud humana, en ellos establece la necesidad de realizar un análisis previo a la comercialización. Esta evaluación debe incluir la valoración tanto de los efectos directos (del gen insertado) como de los efectos no deseados que puedan surgir como consecuencia de la inserción del nuevo gen. Estos principios del Codex carecen de obligatoriedad sobre la legislación nacional, pero la Organización Mundial de Comercio los menciona específicamente en el Acuerdo Sanitario y Fitosanitario (Acuerdo SPS) y pueden usarse como referencia en caso de disputas comerciales.

La FAO, la OMS y la OECD elaboraron el principio de “equivalencia sustancial” a principio de la década de 1990. Este principio sugiere que los alimentos GMs pueden ser considerados tan inocuos como los alimentos convencionales cuando los componentes toxicológicos y nutricionales claves en los alimentos GMs son comparables con los alimentos convencionales, y cuando la modificación genética en sí se considera segura (OMS, 2005). Esto quiere decir que si se descubre un alimento o componente alimentario nuevo es sustancialmente equivalente a un alimento o componente alimentario existente, éste puede ser tratado de la misma manera en lo que respecta a la seguridad (Barros, 2009). Asimismo, estas instituciones también establecen la necesidad de una evaluación caso por caso de las distintas variedades modificadas antes de su comercialización.

En el Protocolo de Cartagena sobre Bioinocuidad se regula el movimiento transfronterizo de los organismos vivientes genéticamente modificados (LMO) que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana (Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000). Los alimentos GMs entran dentro de ámbito de aplicación de este Protocolo solo si contiene LMO capaces de transferir o replicar material genético.

LEGISLACIÓN EN LA UNIÓN EUROPEA.

Los primeros documentos jurídicos en los que se hace referencia a GMOs aprobados en la Comunidad Europea son la Directiva nº 90/219/CCE relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente y la Directiva nº 90/220/CEE sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente. La finalidad de estas Directivas era la protección del medio ambiente y de la salud humana y animal.

A lo largo de los últimos años se han elaborado y aplicado múltiples instrumentos jurídicos en los cuales se trata más específicamente la aprobación y seguridad en la utilización de los GMOs destinados a consumo humano. De este modo, se aprobó el 27 de enero de 1997 el Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios y que constituye el primer texto legal en el que se hace referencia al etiquetado de productos derivados de GMOs. Este Reglamento se refería específicamente a:

- alimentos e ingredientes alimentarios que contengan organismos genéticamente modificados con arreglo a la Directiva 90/220/CEE, o que consistan en dichos organismos;
- alimentos e ingredientes alimentarios producidos a partir de organismos genéticamente modificados, pero que no los contengan;
- alimentos e ingredientes alimentarios de estructura molecular primaria nueva o modificada intencionadamente;
- alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en microorganismos, hongos o algas u obtenidos a partir de estos;
- alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en vegetales, u obtenidos a partir de ellos, e ingredientes alimentarios obtenidos a partir de animales, excepto los alimentos e ingredientes alimentarios obtenidos mediante prácticas tradicionales de multiplicación o de selección y cuyo historial de uso alimentario sea seguro;
- alimentos e ingredientes alimentarios que se hayan sometido a un proceso de producción no utilizado habitualmente, que provoca en su composición o estructura cambios significativos que afectan a su valor nutritivo, a su metabolismo o a su contenido en sustancias indeseables.

Los requisitos específicos de etiquetado se establecían en el Reglamento (CE) nº 258/97 con la finalidad de que el consumidor estuviera informado de cualquier cambio en las características o propiedades de los alimentos como son su composición, valor nutritivo o efectos nutritivos, o el uso previsto del alimento, responsable de que un nuevo alimento o ingrediente alimentario dejara de ser equivalente a un alimento o ingrediente alimentario existente.

En el año 2000 se aprobó el conocido como “Reglamento de umbrales”, Reglamento (CE) nº 49/2000 de la Comisión, de 10 de enero de 2000, por el que se

modifica el Reglamento (CE) nº 1139/98 del Consejo, mediante el cual se intentaba resolver el problema planteado por la contaminación inadvertida e introducía el concepto de umbral. En dicho Reglamento se establecía que no se aplicarían a los alimento requisitos específicos adicionales de etiquetado en caso de que la presencia del material obtenido a partir de los GMOs entre los ingredientes alimentarios no superara la proporción del 1% en cada uno de los ingredientes alimentarios. Asimismo, se establecía que los operadores debían aportar pruebas de que habían tomado las medidas oportunas para no utilizar GMOs gracias a las cuales se podría establecer que la presencia e este material en el alimento era accidental.

Con posterioridad, en el año 2001 se publica el considerado como el principal instrumento jurídico que rige el sector de la biotecnología en la Unión Europea, la **Directiva 2001/19/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de marzo de 2001,** sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos genéticamente modificados que deroga la Directiva 90/220/CEE. Con la promulgación de la Directiva 2001/19/CE se refuerzan las normas anteriores relativas a la liberación de GMO en el medio ambiente y se establecen los principios de evaluación del riesgo ambiental, las obligaciones de seguimiento ambiental tras la comercialización, información al público, etiquetado y trazabilidad, y la creación de un registro molecular, como medidas más salientables.

Con la entrada en vigor de la Directiva 2001/18/CE se estable que las autorizaciones concedidas según la Directiva 90/220/CEE deben renovarse para evitar disparidades y adaptarse a las nuevas condiciones. Con posterioridad a la comercialización de un GMO como producto o componente de un producto, el notificador debe velar por el seguimiento tras la comercialización y la elaboración de informes que indicen que esta se lleva a cabo con arreglo a las condiciones especificadas en la autorización.

Debido a la ausencia de una legislación comunitaria específica sobre piensos genéticamente modificados, las dificultades de interpretación y aplicación de los instrumentos jurídicos existentes, en el año 2003 se publican dos Reglamentos, que al modificar o derogar la normativa legal anterior, proporcionan la base legal actual (junto con el Reglamento (CE) nº 65/2004 y el Reglamento (CE) nº 641/2004) sobre los alimentos y piensos modificados genéticamente. Estos son el **Reglamento (CE) nº 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003**, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente y el **Reglamento (CE) nº 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003**, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a

la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE.

En el Reglamento (CE) nº 1829/2003, vigente desde el 18 de abril de 2004, se introducen por primera vez normas específicas sobre piensos GMs, y se refuerzan y amplían las normas sobre la evaluación de la seguridad y etiquetado de estos piensos y alimentos existentes en la legislación anterior. Este Reglamento establece que una sola aprobación permite la utilización tanto en piensos como en alimentos destinados a consumo humano, llenando de esta forma el vacío legal sobre la aprobación de productos para piensos y abandonando a la vez el procedimiento simplificado que se basa en el concepto de "equivalencia sustancial". En el mismo también se contempla que el solicitante debe presentar un expediente completo donde se indique un método de detección de la modificación genética concreta de que se trate. El expediente y en concreto, lo relativo a evaluación del riesgo para el medio ambiente y para la seguridad de los alimentos, han de ser evaluados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (creada en virtud del Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002). Del mismo modo, el laboratorio comunitario de referencia (creado según lo expuesto en el Reglamento (CE) nº 1829/2002) debe evaluar y validar los métodos de detección indicados por el solicitante.

Los umbrales mínimos para el etiquetado también se ven modificados con la entrada en vigor del Reglamento (CE) nº 1829/2003 que modifica al Reglamento (CE) nº 49/2002 de la Comisión respecto a la presencia accidental de GMOs autorizados, rebajando el umbral de 1 al 0,9%. Asimismo, se establece un umbral del 0,5% respecto a la presencia accidental de GMOs no autorizados, con carácter transitorio, siempre que haya sido objeto de un dictamen favorable del comité o comités científicos pertinentes.

Debido a la controversia existente entre los consumidores en relación con los GMOs y al reconocimiento por parte de la UE del derecho de éstos a la información y al etiquetado como instrumento para una elección consciente del producto, se ha establecido desde 1997 la obligatoriedad de indicar en el etiquetado la presencia de GMOs como tales o formando parte del producto. Con la aprobación del Reglamento (CE) nº 1830/2003 se refuerzan las normas sobre etiquetado de alimentos GMs extendiéndose el etiquetado a todos los alimentos y piensos y define la trazabilidad como la capacidad de seguir la traza de los GMOs y los productos producidos a partir de ellos en todas las fases de su comercialización a lo largo de la cadena de producción y distribución. De este modo, en el Reglamento se establece que los

operadores velarán por que se transmita por escrito al operador que reciba el producto la mención de que el mismo contiene o está compuesto por GMOs y el identificador o identificadores únicos asignados a dicho GMO.

LEGISLACIÓN ESPAÑOLA.

En España las actividades con GMO están reguladas por 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 GMO y por el **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, modificado por los Reales Decretos 367/2010 y 191/2013. Estas normas han sido publicadas con la finalidad de transponer a la legislación española las Directivas y Reglamentos europeos que tienen como finalidad la protección de la salud humana y el medio ambiente frente a los posibles efectos secundarios derivados del uso de GMOs

En el artículo 1 de la Ley 9/2003 se establece que el régimen jurídico expuesto en la citada ley es aplicable a GMOs, pero quedan excluidos de ella aquellos cuya modificación genética se obtenga por técnicas de mutagénesis o de fusión (incluida la de protoplastos) de células vegetales, en que los organismos resultantes puedan producirse también mediante métodos tradicionales de multiplicación o de cultivo, siempre que tales técnicas no supongan la utilización de moléculas de ácido nucleico recombinante ni de organismos modificados genéticamente. Igualmente quedan excluidas la utilización de las técnicas de fertilización in vitro, conjugación, transducción, trasformación o cualquier otro proceso natural y la inducción poliploide, siempre que no supongan la utilización de moléculas de ácido nucleico recombinante ni de GMOs.

El ejercicio de las funciones regulas en esta ley y la vigilancia, el control y la imposición de las sanciones por las infracciones cometidas en la realización de las actividades reguladas por la Ley 9/2003 son competencia cedida a las Comunidades Autónomas según lo dispuesto en el artículo 4.

3.5.2. LEGISLACIÓN EN MATERIA DE ETIQUETADO ALIMENTARIO.

En la actualidad en España el etiquetado de los alimentos está regulado por el **Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio**, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios y por el Real Decreto 890/2011, de 24 de junio, por el que se modifica la norma general de

etiquetado, presentación, y publicidad de los productos alimenticos, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio.

En el artículo 4 del Real Decreto 1334/1999 se establecen los principios generales del etiquetado y las modalidades de realizarlo, que no deberán ser de tal naturaleza que induzcan a error al comprador, especialmente:

1. Sobre las características del producto alimenticio y, en particular, sobre su naturaleza, identidad, cualidades, composición, cantidad, duración, origen o procedencia y modo de fabricación o de obtención.

2. Atribuyendo al producto alimenticio efectos o propiedades que no posea.

3. Sugiriendo que el producto alimenticio posee características particulares, cuando todos los productos similares posean estas mismas características.

4. Atribuyendo a un producto alimenticio propiedades preventivas, terapéuticas o curativas de una enfermedad humana, ni mencionando dichas propiedades, sin perjuicio de las disposiciones aplicables a las aguas minerales naturales y a los productos alimenticios destinados a una alimentación especial.

Asimismo, en el artículo 5 se expone la información obligatoria que debe figurar en el etiquetado de los alimentos, que salvo excepciones es:

1. La denominación de venta del producto. Esta será la denominación precisa para este producto en las disposiciones de la Comunidad Europea que le sean aplicables.

2. La lista de ingredientes en orden decreciente de sus pesos en el momento en que se incorporan durante el proceso de fabricación del producto. Según lo expuesto en el apartado 4 artículo 7 “los ingredientes se designarán por su nombre específico”.

3. La cantidad de determinados ingredientes o categoría de ingredientes.

4. El grado alcohólico en las bebidas con una graduación superior en volumen al 1,2 %.

5. La cantidad neta, para productos envasados.

6. La fecha de duración mínima o la fecha de caducidad.

7. Las condiciones especiales de conservación y de utilización.
8. El modo de empleo, cuando su indicación sea necesaria para hacer un uso adecuado del producto alimenticio.
9. Identificación de la empresa: el nombre, la razón social o la denominación del fabricante o el envasador o de un vendedor establecido dentro de la Unión Europea y, en todo caso, su domicilio.
10. El lote.
11. El lugar de origen o procedencia, cuando el producto proceda de terceros países o procediendo de un país comunitario la no indicación pueda inducir a error al consumidor.
12. Las especialmente previstas para diversas categorías o tipos de productos alimenticios (se recogen en el anexo V del Real Decreto 1334/1999).

Es importante señalar que a finales del presente año entrará en vigor una nueva normativa europea, el Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, con el fin de consolidar y actualizar la normativa referente a etiquetado general de los productos alimenticios, regulado por la Directiva 2000/13/CE y al etiquetado nutricional, objeto de la Directiva 90/496/CEE. Este Reglamento pretende conseguir un alto nivel de protección de la salud de los consumidores y garantizar su derecho a la información para que estos tomen decisiones con conocimiento de causa.

3.5.3. LEGISLACIÓN SOBRE AGRICULTURA ECOLÓGICA.

En España la agricultura ecológica se encuentra regulada legalmente desde 1989, año en que se aprobó el Reglamento de la Denominación Genérica "Agricultura Ecológica", que fue de aplicación hasta la entrada en vigor del Reglamento (CEE) 2092/91 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios, que supuso el primer marco legislativo común en lo relativo a la producción ecológica.

En este ámbito también se publicó el 1 de junio de 2004 el «Plan de actuación europeo sobre la alimentación y la agricultura ecológicas», dentro del cual se inscribe el **Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007**, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) n° 2092/91**.** Este Reglamento, en vigor desde el 1 de enero de

2009, constituye la base legislativa actual en el ámbito de la agricultura ecológica ya que establece el marco jurídico para los productos ecológicos, especificando normas relativas a la producción, etiquetado, control e intercambios con terceros países.

Dentro del campo de aplicación del Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo, se encuentran los productos agrícolas (incluida la acuicultura) transformados o no y destinados a la alimentación humana, los piensos, el material de reproducción vegetativa y las semillas para cultivo y las levaduras destinadas al consumo humano o animal. Los principios generales establecidos en el Reglamento se refieren a métodos de producción específicos, la utilización de recursos naturales y la estricta limitación del uso de medios de síntesis, así como la fijación de principios específicos aplicables a la agricultura y a la transformación de productos alimenticios y piensos ecológicos.

En lo relativo a las semillas ecológicas en el Reglamento (CE) nº 889/2008 de la Comisión se recogen los esfuerzos que os productores dedican a la producción de semillas y materiales vegetativos ecológicos, actualmente solo patata**.** No obstante, para muchas especies no hay aún suficientes semillas ni materiales de reproducción vegetativa ecológicos y, en tales casos, debe permitirse el uso de semillas y materiales de reproducción vegetativa no ecológicos. En el capítulo 7 de dicho Reglamento se establece la necesidad de que los estados miembros mantengan una base de datos en línea con el fin de facilitar la adquisición de estas semillas. En España la gestión de esta base de datos corresponde a la Subdirección General de Calidad Diferenciada y Agricultura Ecológica, adscrita a la Dirección General de la Industria Alimentaria del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). Para la inclusión de semillas o patatas de siembra en esta base de datos, los proveedores deben solicitar la inscripción de la misma a la autoridad competente en materia de producción ecológica de la Comunidad Autónoma donde radique su sede social, al ser la certificación y control de alimentos ecológicos competencia de las Comunidades Autónomas. De este modo, es la autoridad competente de la Comunidad Autónoma la encargada de realizar las verificaciones correspondientes con la finalidad de demostrar que los materiales objetos de la solicitud se ajustan al régimen de control establecido en el artículo 27 del Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo, y remitirá este informe favorable al MAGRAMA para que proceda a la inscripción de las semillas o patatas de siembra en la base de datos.

En lo relativo a la producción ecológica vegetal, en el Reglamento en vigor se establecen los principios generales que ésta debe cumplir en relación a:

- los tratamientos del suelo, que deben respetar la vida y la fertilidad natural del suelo.
- la prevención de daños, que debe basarse en métodos naturales pero para lo cual se permite utilizar un número limitado de productos fitofarmacéuticos autorizados por la Comisión;
- las semillas y los materiales de reproducción vegetativa, que han de producirse ecológicamente;
- los productos de limpieza, que deben haber sido autorizados por la Comisión.

Es importante señalar que según las normas generales de producción ecológica establecidas, los GMOs están prohibidos en todas sus formas, ya que en el artículo 9 del Reglamento 834/2007 se estable que “en la producción ecológica no podrán utilizarse GMO ni productos obtenidos a partir o mediante GMO, como alimentos, piensos, coadyuvantes tecnológicos, productos fitosanitarios, abonos, acondicionadores del suelo, semillas, material de reproducción vegetativa, microorganismos ni animales”.

En lo referente al etiquetado, publicidad o documentos comerciales deben figurar los términos «eco» y «bio» para caracterizar a un producto ecológico, sus ingredientes o las materias primas. Del mismo modo, desde el 1 de julio de 2010 es obligatoria la utilización del logotipo comunitario en los productos alimenticios producidos mediante agricultura ecológica, así como la indicación del lugar de procedencia de las materias primas que componen el producto (Figura 4).

Figura 4: Sellos que identifican la agricultura ecológica (Fuente MAGRAMA).

Los productos procedentes de terceros países pueden comercializarse también en el mercado comunitario como productos ecológicos si cumplen el Reglamento y si han sido objeto de control. Este control puede realizarlo un organismo reconocido por la Comunidad Europea o un organismo de control acreditado. Con el fin establecer normas y procedimientos pormenorizados para garantizar la aplicación correcta y uniforme de las disposiciones relativas a la importación de los productos ecológicos establecidas en los artículos 32 y 33 del Reglamento (CE) nº 834/2007 se publicó en Diario Oficial de la Unión Europea el Reglamento (CE) nº 1235/2008 de la Comisión, de 8 de diciembre de 2008, por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo en lo que se refiere a las importaciones de productos ecológicos procedentes de terceros países.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. MUESTREO.

Con el fin de detectar soja transgénica en matrices alimentarias se han analizado 23 muestras, adquiridas en 6 superficies comerciales y de 19 marcas (tanto marcas de fabricante como de distribuidor) que presentan soja como componente principal. Los productos fueron adquiridos en la ciudad de Oviedo, Principado de Asturias, en el mes de mayo del año 2014.

Las distintas muestras se agruparon en tres clases en función del grado de procesamiento de las mismas, creándose 3 grupos de productos en base a este criterio:

1.- **Alimentos mínimamente procesados**, siendo estos brotes y semillas (Tabla 5).

Tabla 5: Alimentos mínimamente procesados.

Marca	Denominación de venta
Rioverde	Brotes germinados
Pedro Luís Conservas Artesanas	Brote de soja
Bonduelle	Brotes germinados
Carrefour	Brotes germinados
Hipercor	Brotes germinados
Alsur	Brotes de soja
El Corte Inglés	Brotes germinados de soja verde
Hacendado	Brotes germinados
Alimerka	Brotes de soja germinada
Biocop	Soja verde (semillas)

2.- **Alimentos poco procesados**, que se corresponden con tofu y soja texturizada (Tabla 6).

Tabla 6: Alimentos poco procesados.

Marca	Denominación de venta
Eco cesta	Tofu al estilo japonés
Soria Natural	Tofu natural
Natursoy	Tofu
Frias	Tofu firme
Frias	Tofu de soja (Burgalia)
Special line	Tofu natural
Sojhappy	Tofruti tofu con fruta
Natur cesta	Soja texturizada fina

3.- **Alimentos con procesamiento medio** como son las hamburguesas, encontrándose en una matriz más compleja (Tabla 7).

Tabla 7: Alimentos con procesamiento medio.

Marca	Denominación de venta
Sojasun	Burguers de soja, tomate y albahaca
Toki Eco	Barritas de tofu y verduras
Toki eco	Barritas de soja y champiñones
Toki Eco	Vegeburguer de tofu y setas
Toki ECo	Vegeburguer de soja y pimientos

Como ya se ha comentado en el apartado alimentos de soja, en el mercado existen multitud de alimentos que se componen de soja, pero la elección de estos productos está basada en el menor procesamiento que muestran estos en comparación con otro tipo de alimentos, como podrían ser las galletas o leches de soja, en los cuales los tratamientos industriales necesarios para su elaboración

pueden degradar el DNA dificultado su extracción y detección con la metodología empleada en este estudio.

4.2. ANÁLISIS DE ETIQUETAS.

Para los tres tipos de alimentos muestreados se realizó el análisis de las etiquetas que consistió en el análisis detallado de las mismas comprobando si cumplían o no con la regulación nacional de etiquetado, según la cual deberían indicar la denominación de venta, la lista de ingredientes, la cantidad neta, la fecha de duración mínima, el lote, la identificación de la empresa y el lugar de origen, y además, en el caso concreto de los alimentos ecológico, los sellos pertinentes que garanticen este origen.

4.3. ANÁLISIS GENÉTICOS.

4.3.1. DETECCION DE GMOs.

EXTRACCIÓN DEL DNA.

La extracción de DNA se realizó con la utilización del Kit de purificación para plantas, algas y hongos GeneMATRIX de EURx.

Para ello se tomó una muestra de aproximadamente 10mm de diámetro de cada uno los productos. En el caso de los brotes, al encontrarse estos en un medio acuoso que contiene diversos compuestos como ácido cítrico, azúcar, etc., se ha lavado con agua destilada con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de estos compuestos, que podrían interferir en el rendimiento de la extracción. Asimismo, se ha descartado la parte del hipocotilo por estar formada por tejido meristemático, más esponjoso y con mayor contenido en agua, cogiéndose para la extracción la parte del cotiledón. En las hamburguesas, al ser muestras complejas constituidas por múltiples ingredientes, se han marcado 10 puntos equidistantes y se han cogido muestras en 3 de estos puntos elegidos aleatoriamente, con lo cual los productos de hamburguesas se han analizado por triplicado.

El protocolo establece que el tejido extraído de la muestra se pase a un tubo Eppendorf al que se le añade buffer P (400µl), RNasa (3µl) y Proteinasa K (10µl), y este se incube a 65ºC durante 1 hora con la finalidad de que se produzca la lisis del tejido y la degradación de RNA y proteínas que interferirían en la purificación del DNA

(Gachet et al., 1999). Una vez transcurrido este tiempo se añaden 130µl de buffer AC y se incubó 5 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó en una *microcentrífuga Thermo Scientific* a 14.000 rpm durante 10 minutos, transfiriendo 400µl del sobrenadante resultante de la centrifugación, donde se encuentra el DNA, a un nuevo tubo al que se le adicionaron 350µl de buffer SOL P y 250µl de etanol 100%. Después de invertir el tubo se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm durante 1 minuto. Concluida la centrifugación se transfirieron 600µl del sobrenadante a la columna de extracción, previamente activada gracias a la aplicación de 40µl de buffer P, centrifugándose ésta nuevamente a 12.000 rpm durante 1 minuto. Este paso se repitió para transferir el sobrenadante restante.

Los pasos sucesivos se realizan con la finalidad de eliminar de la columna las diversas moléculas retenidas, para ello se añadió a la columna 500µl de buffer Wash PX y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min, repitiéndose este paso dos veces siendo la duración de la segunda centrifugación de 2 minutos. Finalizada la etapa de lavado de la columna, ésta se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se añadió a la misma 35µl de buffer Elution a 70ºC. Posteriormente, se incubó la columna 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos con lo que se consigue la elución del DNA retenido en la columna, que se encuentra ahora en tubo Eppendorf que se almacenará a 4ºC para su utilización en análisis posteriores.

Para comprobar la eficacia de la purificación se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%. El gel se realizó con agarosa seca en polvo y TBE 1X. A la mezcla se le añadieron 5µl por cada 100 ml de TBE de SimplySafe™ (de EURx), agente que permite la visualización del DNA al iluminarlo con luz ultravioleta (UV) ya que emite fluorescencia verde (EURx, SimplySafe). Se cargaron 8µl de DNA purificado mezclado con 2µl de azul de bromofenol, compuesto que contiene sacarosa lo que confiere densidad a la muestra facilitando la carga y también marca el frente de electroforesis permitiendo seguir el progreso de la misma, ya que tiene una movilidad mayor que cualquier macromolécula. Una vez concluida la carga de las muestra y rellenada la cubeta de electroforesis con TBE 1X ésta se cierra y se conecta a la fuente de alimentación, estableciendo un voltaje de 120 voltios durante 25 minutos, transcurridos los cuales se iluminó el gel con luz UV para detectar la presencia de DNA.

PCR.

Para la realización de la PCR se ha utilizado el Kit para la detección de GMOs en alimentos frescos y procesados de BIOTOOLS STANDAR. Este Kit de detección de

GMOs presenta una sensibilidad mínima de 0,1%, limite por debajo del 0,9% que estable el Reglamento (CE) nº1829/2003 como umbral por debajo del cual no se requiere etiquetado específico.

El Kit se basa en la detección y amplificación de secuencias específicas de GMOs que no existen en plantas nativas y que si están presenten en el 90% de los GMOs, permitiendo detectar la presencia de GMOs en la muestra pero no su identificación. Es importante señalar que secuencias del promotor 35S pueden estar presenten en plantas nativas de la familia *Cruciferae* infectadas por este virus. Asimismo, pueden encontrarse secuencias del terminador NOS procedentes de *Agrobacterium* en muestras de raíces, ya que esta bacteria se encuentra en el suelo.

En el Kit se establece que se realizarán 4 amplificaciones, una para planta y otra para soja que permiten determinar la presencia de material vegetal y de soja en la muestra, y otras dos para NOS y 35S, para determinar la existencia de GMOs. La identificación de planta se basa en la amplificación del gen *rbcL* del cloroplasto, presente tanto en plantas modificadas genéticamente como en plantas no modificadas. Asimismo, la identificación de soja se realiza con en base al gen de la lecitina, presente también en soja GM.

Para la realización de las diferentes amplificaciones se suministran con el Kit los 4 Master Mix que contienen los diferentes compuestos necesarios para la reacción de PCR, exceptuando la DNA polimerasa y el $MgCl_2$ y en la proporción adecuada para la amplificación del gen correspondiente. Así, cada Master Mix consiste en una solución Tris-HCl que contiene: <10% de glicerol, KCl, < 0.001% de dATP, dCTP, dGTP, dTTP y los primers correspondientes. Cada reacción de PCR tiene una cantidad optimizada de reactivo, preparándose el mix de PCR necesario para cada una de las amplificaciones en un tubo Eppendorf, al que se le añade el volumen necesario de cada uno de los reactivos en función del número de muestras analizadas (Tabla 8). Los reactivos proporcionados en el Kit se conservan congelados y se manipulan, al igual que los mix de PCR, en hielo.

Tabla 8: Cantidad necesaria de cada reactivo de PCR por reacción.

Reactivo	35S	NOS	Planta	Soja
$MgCl_2$	1.00 µl	1.00 µl	0.80 µl	0.80 µl
Master Mix	6.00 µl	6.00 µl	6.00 µl	6.00 µl
Polimerasa	0.56 µl	0.56 µl	0.40 µl	0.40 µl
H_2O bidestilada estéril	10.44 µl	10.44 µl	10.80 µl	10.80 µl

De este modo cada reacción amplificación tendrá un volumen de 20µl, de los cuales 2µl corresponderán al DNA de la muestra y los 18µl restantes al mix de PCR.

Con el fin de comprobar la efectividad de cada reacción de amplificación se realizó un control positivo. Los 3 controles de amplificación (GMO, planta y soja) son suministrados con el Kit y su realización se llevó a acabo de la misma forma que la de las muestras problema (2µl de control de amplificación + 18µl de mix de amplificación)

La reacción de amplificación se llevó a cabo en *termocicladores 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems.* En las amplificaciones para planta, 35S y NOS se utilizó el mismo programa de PCR que consta de una desnaturalización inicial a 94ºC durante 3 minutos, una amplificación cíclica (45 ciclos) que empieza con 30 segundos a 94ºC, seguida de 40 segundos a 55ºC y concluye con 1 minuto a 72ºC finalizada esta etapa se realiza una elongación final a 72ºC durante 3 minutos. La amplificación de soja consta de una desnaturalización inicial a 94ºC durante 10 minutos, una amplificación cíclica (40 ciclos) que empieza con 30 segundos a 94ºC, seguida de 30 segundos a 60ºC y concluye con 1 minuto a 72ºC. Concluida esta etapa se realiza una elongación final durante 3 minutos a 72ºC.

Para llevar a cabo la interpretación de los resultados de los productos de amplificación, estos se observaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, cuyo proceso de elaboración es análogo al utilizado para la visualización del DNA en la etapa anterior. Debido al pequeño tamaño de las bandas obtenidas es especialmente importante que la separación entre los productos de amplificación y dímeros del primer sea suficiente, dejando correr el gel el tiempo oportuno, pero sin que las bandas migren hasta el final del gel.

Debido a la presencia de muestras dudosas en la primera amplificación de 35S se realizó una segunda amplificación 35S para estas muestras con la finalidad de comprobar los resultados.

4.3.2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE SOJA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL GEN *RBCL*.

Debido a la heterogeneidad de los productos analizados, y a que se observó que bajo la denominación genérica de soja se comercializan 2 especies distintas, se realizó una secuenciación de las muestras con el fin de confirmar la especie de la cual éstos se componían en su mayor parte.

Esta confirmación se llevó a cabo en base a la secuencia de la región *rbcL.* El gen *rbcL,* en la región plastidial, codifica para la subunidad grande de la RuBisCO, establecido como uno de los múltiples loci útiles en la identificación de plantas terrestre ya que ofrece una alta universalidad y un buen poder de discriminación (CBOL Plant Working Group, 2009; Fazekas et al., 2012). Es importante señalar, que en el caso de identificación de plantas, no existe una región universal que permita discriminar entre todas las especies de todos los grupos de plantas (Kress et al., 2009). Como paso previo a la secuencia se realizó una PCR para la amplificación del gen *rbcL*, con primers secuenciados por la compañía *Invitrogen, DISMED S.A*. (Figura 5).

Región	Primer	Secuencia (5'-3')	Dirección	Tamaño, bp
rbcL	rbcLa-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	F	554
	rbcLa-R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	R	

Figura 5: Primers utilizados en la amplificación del gen *rbcL* (Fuente: Kress et al., 2009).

La preparación del mix de PCR fue análoga a la realizada en la etapa anterior de detección de GMOs, pero variando los reactivos y su concentración (Tabla 9). La reacción de PCR se llevó a cabo en un *termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystem*, con un programa que constaba de una desnaturalización inicial a 95ºC durante 5 minutos, seguida de una amplificación cíclica (5 ciclos) que se inicia a 95ºC durante 30 segundos, seguido de 1 minuto a 45ºC y finaliza a 72ºC durante 1 minuto. Concluida esta etapa se realiza otra amplificación cíclica (35 ciclos) que se inicia a

95ºC durante 30 segundos, seguido de 1 minuto a 50ºC y finaliza a 72ºC durante 1 minuto. Para finalizar se desarrolla un elongación final durante 10 minutos a 72ºC.

Tabla 9: Cantidad óptima, por reacción, de cada reactivo de PCR para la amplificación de la región *rbcL.*

Reactivo	Concentración	Volumen
Buffer	1x	4 µl
MgCl2	3 mM	2.4 µl
DNTPs	0,4 mM	0.8 µl
rbcLa-F	0.3 µM	0.06 µl
rbcLa-R	0.3 µM	0.06 µl
Taq-polimerasa	1 unidad/ µl	0.2 µl
H2O bidestilada estéril		10.48 µl
DNA		2 µl

Finalizada la amplificación se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, con objetivo de determinar la eficacia de la misma. Para ello se cargaron directamente en el gel 5 µl del producto de amplificación de cada una de las reacciones, y se corrió el gel a 120 voltios durante un tiempo aproximado de 25 minutos.

SECUENCIACIÓN

Como paso previo a la secuenciación es necesaria una purificación del DNA amplificado, siendo necesario para ello realizar una electroforesis en gel de agarosa y una purificación posterior de la banda donde estaba contenido el DNA.

Para ello se cargó en un gel de agarosa al 2% el volumen restante de la amplificación, 15 µl, y se sometió a un campo eléctrico de 100 voltios durante un tiempo aproximado de 30 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo el corte de la banda de cada reacción, de 554 bp, y el DNA contenido en ésta se purificó mediante el Kit GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit de EURx.

La banda cortada se introdujo en un tubo Eppendorf al que se le añadieron 600µl de buffer Orange-A, incubándose en un baño de agua a 70°C hasta la disolución de la banda de agarosa, siendo necesario agitar el tubo por inversión cada minuto, aproximadamente. Una vez disuelta la banda de agarosa se transfirió el volumen contenido en el tubo a una columna, previamente activada con la aplicación de 40µl de buffer A, y se centrifugó en una microcentrífuga a 12.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, se añadieron a la columna 500µl de buffer Wash-A1, centrifugándose durante 1 minuto a 12.000 rpm, transcurridos los cuales se volvió a añadir a la columna 650 µl de buffer Wash-AX2 centrifugándose del mismo modo que en el paso anterior. Con la finalidad de eliminar de la columna los restos de buffer Wash-AX2 se centrifugó la columna a 12.000 rpm durante 2 minutos. Concluida esta etapa, se administraron a la columna, contenida en un nuevo tubo Eppendorf, 35µl de buffer Elution-A a 80°C, con la finalidad de eluir el DNA retenido en la columna. Para ello se dejó incubar ésta 5 minutos a temperatura ambiente, transcurridos los cuales se centrifugó durante 2 minutos a 12.000 rpm, encontrándose el DNA disuelto en el tubo Eppendorf al final de esta etapa.

Con la finalidad de comprobar el éxito de la purificación, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, cuya preparación fue análoga a la utilizada para comprobar el resultado de la amplificación. Para ello se cargaron 2µl del DNA purificado mezclado con 2µl de azul de bromofenol, y se sometió el gel contenido en la cubeta de electroforesis a una corriente eléctrica de 120V durante 25 minutos. Finalizada la electroforesis, el gel se observó en un transiluminador UV, como en casos anteriores, y se realizó una cuantificación del DNA presente en la muestra por comparación de la intensidad de la banda con la intensidad de la banda de un marcador de talla y concentración comercial (*Promega*). La cantidad restante de DNA se conservó congelada hasta su utilización posterior.

El DNA obtenido en la purificación de la banda de agarosa se envió a la compañía *Macrogen* con sede en Amsterdam, Holanda, para su secuenciación. Obtenidas las secuencias, estas fueron tratadas mediante el programa informático *BioEdit, Sequence Alignment Editor* para su alineamiento y corrección, pasos previos necesarios para posterior identificación en la base de datos BOLDSystems.

La base de datos BOLDSystems está desarrollada por el International Barcode of Life que actualmente incluye a más de 120 organizaciones procedentes de 45 países. En esta base de datos se incluyen miles de secuencias de regiones características que permiten la identificación de las especies eucariotas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. ANÁLISIS DEL ETIQUETADO ALIMENTARIO.

Como primer resultado extraído de este estudio se observó que en el mercado se comercializan dos especies distintas bajo la denominación genérica de soja, como son la judía mungo o soja verde y la soja amarilla, siendo esta última la soja, que el consumidor reconoce como tal. Estas dos especies pertenecen a la familia *Fabaceae*, también conocida como familia *Leguminosae*, pero se corresponden con géneros distintos (Figura 6). La judía mungo, se presenta como el ingrediente de los productos analizados que presentan un mínimo procesamiento, brotes germinados y semillas. Así, del total de productos analizados (n=23) el 43,5% presentaban soja verde como ingrediente y el 56,5% se componían de soja.

- Reino: *Plantae*
  - Filo: *Angiospermophyta*
    - Clase: *Magnoliopsida*
      - Orden: *Fabales*
        - Familia: *Leguninosae*
          - Género: *Vigna*
            - Especie: *Vigna radiata*

Figura 6: Clasificación taxonómica *Vigna radiata* (Fuente: Universidad Politécnica de Valencia).

En la totalidad de estos productos se especifica en la lista de ingredientes que se trata de judía mungo o soja verde, y en dos casos ésta se designa por su nombre científico *Vigna radiata,* con lo que no se incumple la legislación vigente en materia de etiquetado, ya que el Real Decreto 1334/1999 establece que los ingredientes deberán figurar por su nombre específico. Sin embargo, el hecho de que en solo 2 de estos 10 productos se indique explícitamente en la denominación de venta que se trata de soja verde, y en ninguno se cita judía mungo en la denominación de venta, hace pensar que se trate de cierta manipulación publicitaria (el 80% de los productos no especifica soja verde) con el fin de que el consumidor crea que se trata de *Glycine max*, y beneficiarse de la posición y estatus que ésta tiene en el mercado.

Todos los productos muestran un etiquetado correcto para todas las menciones obligatorias excepto para el país de procedencia (65,2%), debido a la propia ambigüedad de la legislación vigente. En la normativa en vigor se establece que la procedencia del producto solo será obligatoria cuando este proceda de terceros países y en el caso de países comunitarios el artículo 13 del Real Decreto 1334/1999 se establece que "en los productos procedentes de los Estados miembros de la Unión Europea, se deberá indicar el lugar de origen o procedencia solamente en los caso en que su omisión pudiera inducir a error en el consumidor sobre el origen o procedencia real del producto". En base a esto, el 30,4% de los productos analizados declara estar elaborado en España, el 30,4% menciona procedencia de agricultura no UE (solo 1 de estos 7 productos especifica que está importado de China) y en el 39,2% de los productos no se indica el origen, de lo que se deduce según lo expuesto en la normativa en vigor que proceden de algún país comunitario (Figura 7). La procedencia más dudosa la presentan los productos de la agricultura ecológica, ya que en muchos de estos debajo del sello de agricultura ecológica se especifica agricultura no UE, en el 54,5% de los productos declarados como ecológicos, de lo que se deduce que alguno de sus ingredientes ha sido importado de terceros países, pero no se menciona el país concreto de procedencia. Sin embargo, en el etiquetado si se presentan los sello de la UE y la Comunidad Autónoma pertinente que garantizan la procedencia ecológica del alimento.

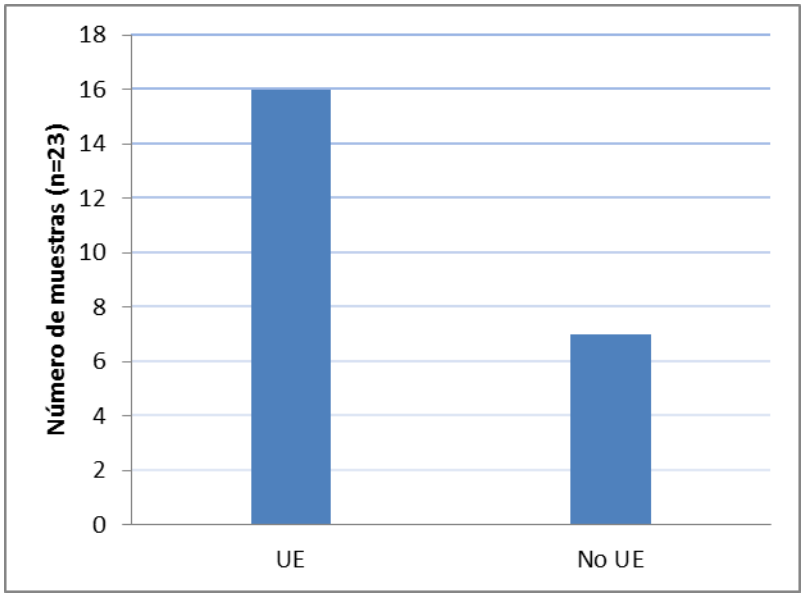

Figura 7: Número de productos en base a la procedencia de alguno de sus ingredientes.

En resumen, del total de muestras analizadas (n=23) un 65,2% de ellas presenta alguna inconsistencia que nos permitiría asegurar que el etiquetado de los productos es perfectamente mejorable, no solo para cumplir con la legislación vigente sino también con el derecho del consumidor a estar informado.

Múltiples productos analizados, sin ser de procedencia ecológica, declaran no estar elaborados a partir de soja genéticamente modificada. Esta declaración se presenta en el 26,1% de los productos analizados (Tabla 10).

Tabla 10: Clasificación de los productos en base a su etiquetado sobre el contenido en GMOs indicando que no los contienen.

Productos ecológicos (n=11; 47,8%)	Productos no ecológicos (n=6; 26,1%)	Productos etiquetados como no GMO (n=6; 26,1%)
Brotes germinados (1)	Brotes germinados (5)	Brotes germinados (3)
Semillas (1)	Soja texturizada (1)	Tofu (2)
Tofu (5)		Hamburguesas (1)
Hamburguesas (4)		

5.2. ANÁLISIS GENÉTICO PARA LA DETECCIÓN DE GMOS.

En la detección de la presencia de GMOs mediante la amplificación del promotor 35S se han observado 12 resultados positivos, lo que supone el 54,5% de productos analizados. Estos 12 resultados positivos se corresponden a 6 alimentos mínimamente procesados (Figura 8), 4 alimentos poco procesados (Figura 9) y 2 alimentos con procesamiento medio, 6 muestras (Figura 10). Cabe mencionar que 3 muestras, correspondientes al producto número 20, no han amplificado para ninguna de las de las dos reacciones utilizadas como controles (planta y soja). Esto puede ser debido a que el procesamiento industrial al que se vio sometido el producto degradase el DNA dificultando su amplificación, o que este fuese degradado por alguno de los compuestos que forman la matriz alimentaria en la que se encuentran la soja, como por ejemplo el vinagre y ácido cítrico empleados como conservantes, ya que se ha visto que un pH ácido creado por estos compuestos puede degradar el DNA (Elsanhoty et al., 2011; Hernández-Orona et al., 2011). También podría deberse a que

los componentes del alimento interfieran en la eficiencia de la extracción del DNA, debido a que el Kit presenta una eficacia óptima para tejido vegetal fresco, si bien es cierto que ha mostrado buenos resultados en el resto de muestras. Debido a esta no amplificación este producto no se tendrá en cuenta en los cálculos posteriores

Todas las muestras analizadas no han mostrado amplificación para el terminador NOS, con lo que este no se muestra en los geles. Esto puede ser debido a que la detección del terminador NOS es menos sensible que la del promotor 35S (Özgen et al., 2013).

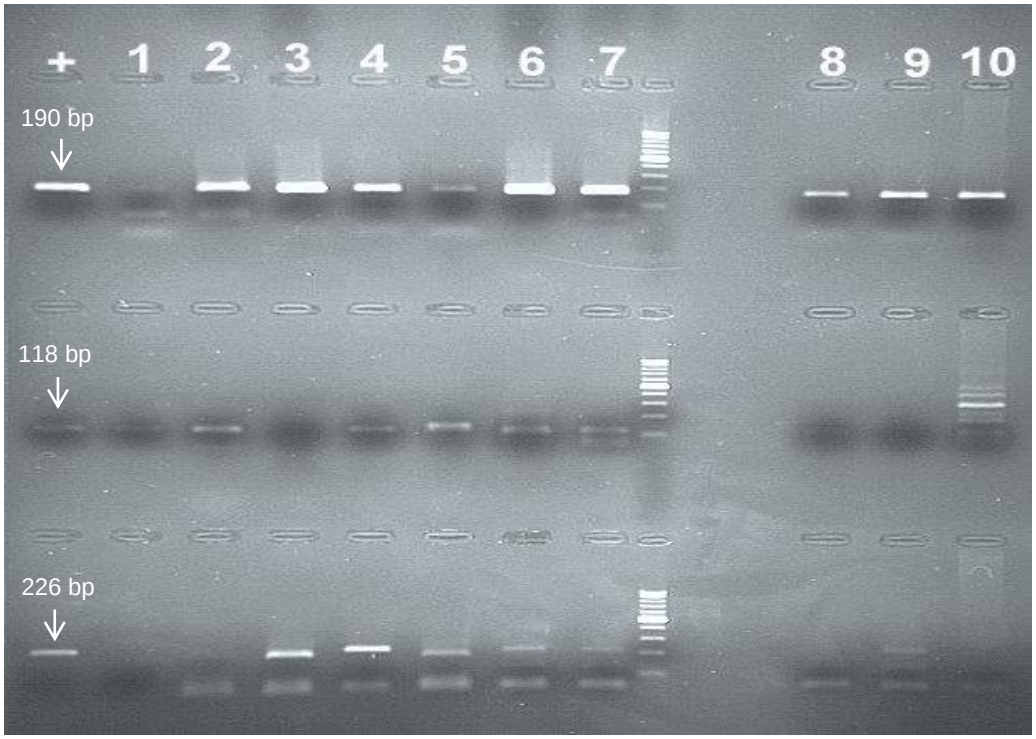

Figura 8: Resultados de amplificación alimentos mínimamente procesados. +: Control positivo de amplificación. Muestras 1 a 9: brotes; muestra 10; semillas. Primera fila: resultados amplificación planta; segunda fila: resultados amplificación soja; tercera fila: resultados amplificación promotor 35S.

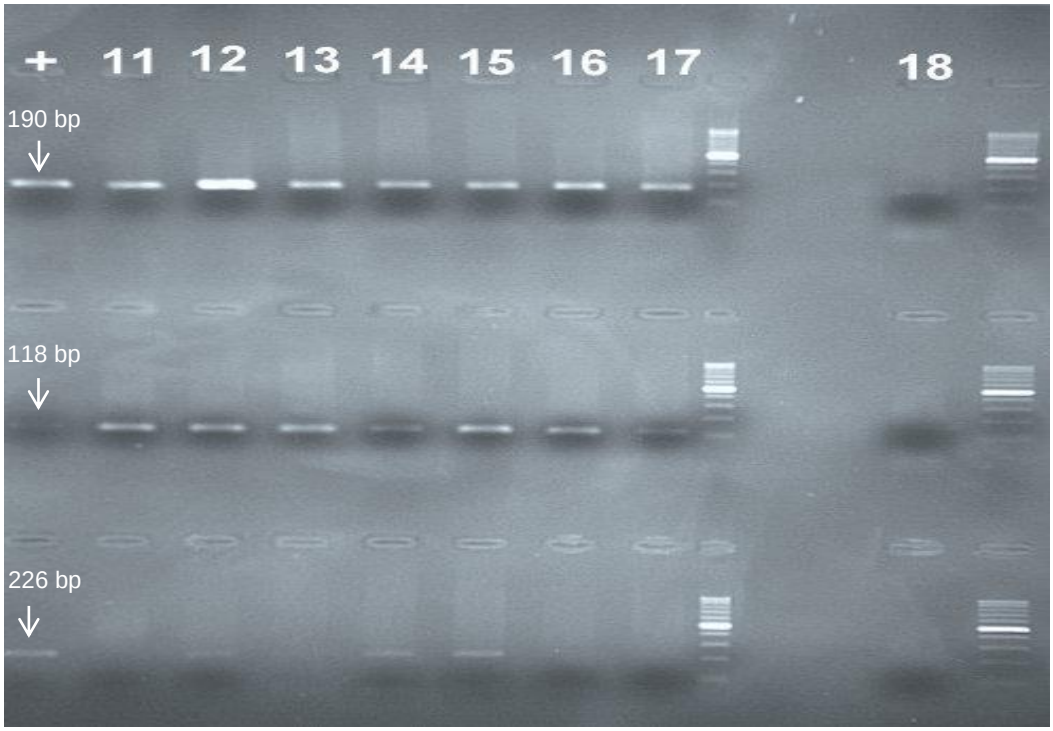

Figura 9: Resultados de amplificación alimentos poco procesados.
+: Control positivo de amplificación. Muestras 1 a 7: tofu; muestra 10: soja texturizada. Primera fila: resultados amplificación planta; segunda fila: resultados amplificación soja; tercera fila: resultados amplificación promotor 35S.

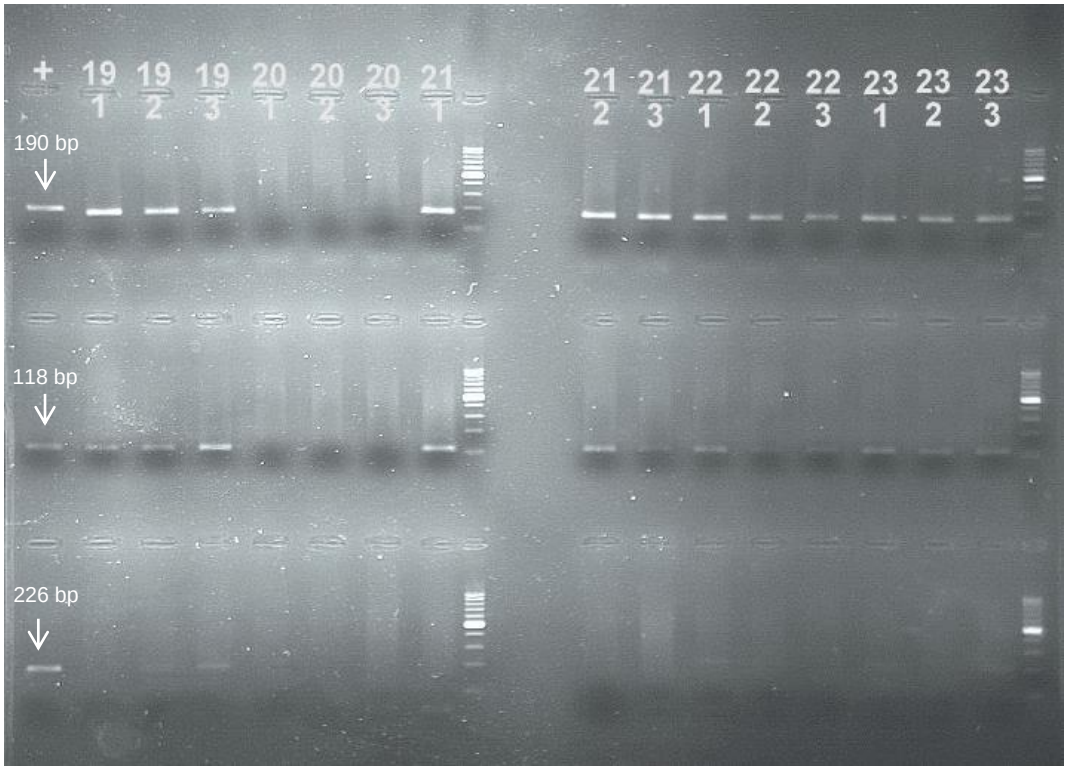

Figura 10: Resultados de amplificación alimentos poco procesados.
+: Control positivo de amplificación. Muestras 19-1 a 23-3: hamburguesas (se presentan las 3 repeticiones de cada muestra). Primera fila: resultados amplificación planta; segunda fila: resultados amplificación soja; tercera fila: resultados amplificación. promotor 35S.

Los resultados para los alimentos etiquetados como ecológicos (10 productos) muestran que 4 de ellos presentan una amplificación positiva para el promotor 35S, lo que supone el 40% del total de muestras ecológicas. También se analizaron 6 productos que alegaban no estar producidos a partir de soja modificada genéticamente, para los cuales se observaron 4 reacciones de amplificación positivas para el promotor 35S, lo que representa el 66.7% de este tipo de muestras. Dentro de productos que presentan un etiquetado convencional (6 productos) se han encontrado 4 amplificaciones positivas para el promotor 35S, lo que supone el 66,7% de estos productos (Figura 11).

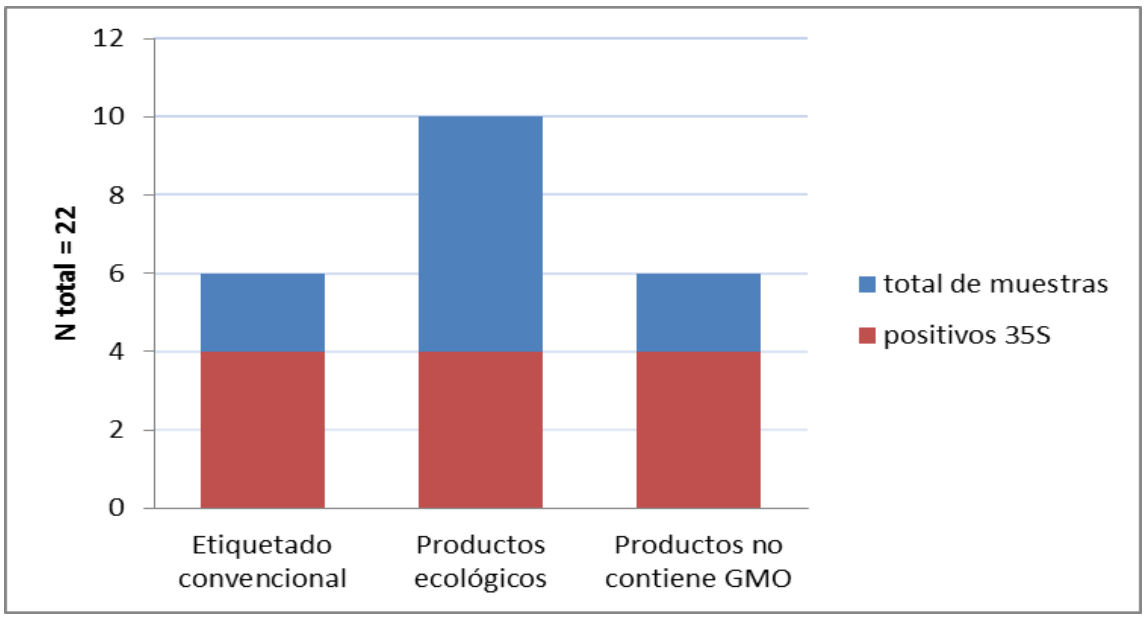

Figura 11: Muestras positivas para el promotor 35S en el total de las muestras de cada tipo de etiquetado.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES (SECUENCIACIÓN DEL GEN *RBCL*).

Un total de 27 muestras procedentes de 17 productos comercializados analizados fueron amplificadas y secuenciadas para el gen *rbcL*.

Los resultados obtenidos en la identificación de especies en base a su secuencia de la región *rbcL* son los esperados según el etiquetado de los productos analizados, ya que las especies etiquetadas como soja verde se componen de la especie *Vigna radiata* y las que presentan soja como ingrediente la especie identificada en su mayoría es *Glycine max* (Tabla 11). Cabe mencionar que en el producto "Burguer de soja, tomate y albahaca" se identificaron 3 especies, siendo *Ocium basilicum y Origanum majorana* hierbas aromáticas presentes en el producto.

Casi todas las asignaciones obtenidas en la identificación de especie mediante BOLDSystems se aceptaran como válidas, ya que presentan un nivel de identidad mayor al 97%, establecido como mínimo en esta base de datos (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Tabla 11: Resultados identificación de especie en base a su secuencia *rbcL* en BOLDSystems.

Denominación de venta	Especie	Identidad
Brotes de soja	*Vigna radiata*	99.81
Brotes germinados de soja verde	*Vigna radiata*	99.45
Brotes de soja germinada	*Vigna radiata*	99.95
Soja verde	*Vigna radiata*	99.63
Tofu al estilo japonés	*Glycine max*	99.45
Tofu natural	*Glycine max*	99.45
Tofu	*Glycine max*	99.45
Tofu firme	*Glycine max*	99.63
Tofu de soja (Burgalia)	*Glycine max*	99.45
Tofu natural	*Glycine max*	99.45
Tofruti tofu con fruta	*Glycine max*	99.45
Soja texturizada fina	*Glycine max*	99.63
Burguer de soja, tomate y albahaca	*Ocium basilicum* *Origanum majorana* *Glycine max*	98.85 97.11 96.36
Barritas de tofu y verduras	*Glycine max* *Glycine max* *Glycine max*	99.35 99.63 99.63
Barritas de soja y champiñones	*Glycine max* *Glycine max* *Glycine max*	99.81 99.81 100
Vegeburguer de tofu y setas	*Glycine max* *Glycine max* *Glycine max*	99.81 99.8 100
Vegeburguer de soja y pimientos	*Glycine max* *Glycine max* *Glycine max*	100 99.81 99.28

Sería importante realizar aquí una serie de apuntes finales que son relevantes. En relación a las muestras etiquetadas como ecológicas, el 40% de las mismas muestra una amplificación positiva para el promotor 35. Estos resultados no cumplirían con la legislación comunitaria en el campo de los cultivos ecológicos, en la cual no se

acepta el cultivo de organismos modificados genéticamente, a no ser que esta presencia sea accidental y técnicamente inevitable, con lo que son necesarios estudios posteriores que permitan determinar tanto la cantidad como el origen de estos GMOs presentes en los productos.

En las muestras de hamburguesas que presentan amplificación positiva para el promotor 35S, es importante señalar que estos alimentos se componen de diversas especies vegetales como ingredientes, entre las que se incluye el maíz y otros GMOs cuya utilización no está aprobada en la Unión Europea, con lo que debido a las propias características del método de detección solo podemos concluir que el alimento contiene GMOs, sin poder identificar la especie modificada que está presente.

Finalmente, la presencia de amplificación para el promotor 35S en las muestras cuyo etiquetado indica que se trata de soja verde o judía mungo es llamativa debido a que en la base de datos sobre cultivos GMs aprobados, como la del ISAAA y la del CERA, no se incluye ninguna especie del género *Vigna* genéticamente modificada cultivada actualmente. Si bien es cierto que en las bases de datos de cultivos GM no se presenta ninguna variedad del género *Vigna* aprobada para cultivo, en la bibliografía consultada se recoge la presencia de diversos estudios realizados en los últimos años para obtener variedades GM de diversas especies de este género, con lo que también existiría la posibilidad de que estas especies se estén comercializando sin las aprobaciones oportunas (Jaiwal & Singh, 2003; Kole et al., 2010). Esta presencia también podría explicarse por contaminación accidental del cultivo con al promotor 35S al realizarse éste en un medio en el cual estén presentes GMOs. Otra posibilidad es la presencia de soja GM en los productos, y que estos se compongan de una mezcla de *Vigna radiata* y *Glycine max*, presentándose la soja en menor proporción. Otro posible origen del promotor 35S en los productos podría deberse a la infección de estos vegetales por el virus del mosaico de la coliflor, si bien esta posibilidad es improbable debido a que este virus solo infecta a especies de la familia *Cruciferae*.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. Bajo la denominación genérica de soja se están comercializando dos variedades distintas como son la judía mundo (43,5% de productos analizados) y la soja, lo que induce a error de percepción en el consumidor.

2. La ambigüedad de la propia legislación determina que no siempre se cumpla (65,2%) el derecho a la información por parte de los consumidores en relación a la procedencia geográfica de los productos de soja existentes en el mercado.

3. El procedimiento empleado basado en la detección mediante PCR de secuencias presentes en la mayoría de los organismos genéticamente modificados aprobados en la Unión Europea, como son el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador de la nopalina sintasa, se presenta como una herramienta útil en el monitoreo rutinario de muestras de matrices alimentarias de soja y ayudaría en la determinación del grado de cumplimiento de la legislación vigente en cuanto al uso e información al consumidor sobre la presencia de organismos genéticamente modificados en los alimentos.

4. A la vista de los resultados obtenidos la inclusión de los organismos modificados genéticamente en los productos consumidos en la sociedad asturiana es una realidad, ya que el 54,5% de las muestras de soja analizadas (60% productos mínimamente procesados, 50% alimentos poco procesados y 50% productos con procesamiento medio) presentaban resultados positivos en el promotor 35S, lo que indicaría una presencia muy significativa de variedades vegetales genéticamente modificadas en muestras alimentarias de soja.

RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES.

1. Son necesarios estudios posteriores que incluyan la cuantificación de trazas de GMOs (e.g. PCR cuantitativa) para determinar si la cantidad de material GM es inferior al 0,9% establecido como umbral en el Reglamento (CE) nº 1829/2003.

2. Son necesarios estudios posteriores para discernir el origen de la presencia del promotor 35S en los productos compuestos de la soja verde, *Vigna radiata*.

3. En las muestras ecológicas serían necesarios estudios más detallados y completos de trazabilidad para determinar si la presencia de GMOs se debe, o no, a contaminación accidental técnicamente inevitable, que sería el único origen de esta presencia aceptado para alimentos ecológicos.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA.

Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, N.A., Al-Qurainy, F., Role of transgenic plants in agriculture and biopharming, Biotechnology Advances, Vol. 30 (2012); 524–540.

Ahmed, F.E., Detection of genetically modified organisms in foods, Trends in Biotechnology, Vol. 20, No. 5 (2002); 215-223.

Bakshi, S., Dewan, D., Status of Transgenic Cereal Crops: A Review. Cloning & Transgeneis, Vol. 3, No. 1 (2013).

Barros, C., Recomendaciones relativas a los aspectos científicos de la información necesaria para secundar las solicitudes de puesta en el mercado de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimenticios y/o alimentarios en Alimentos nuevos y nuevos ingredientes alimenticios y /o alimentarios según la Comunidad Europea. Visón Libros (2009).

Benfey, P., Chua, N., The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants, Scienc, Vol. 250, No 4983 (1990); 959-966

Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R., Potrykus, I., Golden Rice: Introducing the β-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. The journal of nutrition, Vol.132, No 3 (2002); 506-510.

Bogani, P., Minunnni, M., Spiriti, M.M., Zavaglia, M., Tombelli, S., Buiatti, M., Mascini, M., Transgenes monitoring in an industrial soybean processing chain by DNA-based conventional approaches and biosensors, Food Chemistry, Vol. 113 (2009); 658-664.

Boggiano, M. A., Los 7 países productores de Soja del mundo (2013) http://www.cartafinanciera.com/tendencia-actual/los-7-paises-productores-de-soja-del-mundo/ (consultado junio 2014).

Brandão, R., Portilho, N., de Oliveira, A., Coelho, G., Almeida, A., Genetic Transformation of Immature Sorghum Inflorescence via Microprojectile Bombardment (2012) http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/30873.pdf (consultado en junio 2014).

Calvo, M., Informe relativo a los organismos genéticamente modificados (2006) www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad_Agroalimentaria/Agencia_Aragonesa_Seguridad_Alimentaria/Dictamenes_informes/AASA/INFORME_RELATIVO_ORGANISMOS_GENETICAMENTE_MODIFICADOS.pdf.

CBOL Plant Working Group, A DNA barcode for land plants. Proceedings of the Natlional Academy of Science, Vol. 106, No 31 (2009); 12794-12797.

Charels D., Mazzara M., Grazioli E., Van den Eede G., Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line MON87701 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol (2011) http://bookshop.europa.eu/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/EU-Bookshop-Site/en_GB/-/EUR/ViewPublication-Start?PublicationKey=LBNA25136 (consultado junio 2014).

CIISB (Centro de Intecambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología) MON-877Ø1-2 (2012) http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=103079 (consultado junio 2014).

CIISB (Centro de Intecambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología) Roundup Ready soybean (2012) http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14796 (consultado junio 2014).

Clifford, H., Brief History of AquaBounty Technologies and the AquAdvantage® Salmon (2013) http://www.biomarine.org/wp-content/uploads/2013/06/aquabounty-page-biomarine-2013.pdf (consultado junio 2014).

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad) *Glycine max* (2011) http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20909_sg7.pdf (consultado junio 2014)

Consejo Internacional de Cereales, Informe mercado de cereales (junio 2014) http://www.igc.int/downloads/gmrsummary/gmrsumms.pdf (consultado julio 2014).

Carballo, J., Biotecnoloxía e alimentos transxénicos. Ciencia y Tecnología Alimentarias, Vol. 3. No 5 (2002); 314-321.

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, N., Camargo, W., Methods to produce marker-free transgenic plants, Biotechnology Journal, Vol. 2 (2007); 83–90.

Deisingh, A.K., Badrie, N., Detection approaches for genetically modified organisms in foods, Food Research International, Vol. 38 (2005); 639–649.

Domingo, J.L., Toxicity Studies of Genetically Modified Plants: A Review of the Published Literature, Food Science and Nutrition, Vol. 47(2007); 721-733.

Elsanhoty, R.M., Fawzy, M., Dieter, K., DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study, Food Chemistry, Vol. 126 (2011); 1883-1889.

EU, New Eu approach (2014) http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/future_rules_en.htm (consultado junio 2014).

EU Register of authorised GMOs (2014) http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm (consultado junio 2014).

EURx, SimplySafe http://www.eurx.com.pl/product/224/zoom/simplysafe.html (consultado junio 2014).

FAO, Carencia de vitamina A (2002) www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0j.htm (consultado junio 2014).

FAO, Consulta técnica sobre niveles bajos de cultivos modificados genéticamente en el comercio internacional de alimentos y piensos (2014) http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/topics/LLP/Spanish/MJ631_TC-LLP_2014_3_es.pdf (consultado en junio 2014).

FAO, Declaración de la FAO sobre biotecnología (2000) http://www.fao.org/biotech/fao-statement-on-biotechnology/es/ (consultado junio 2014).

Fazekas, A.J., Kuzmina, M.L., Newmaster, S.G., Hollingsworth, P.M., DNA Barcoding Methods for Land Plants, en DNA Barcodes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 858 (2012) Ed. Erickson.

Gachet, E., Martin, G.G., Vigneau, F., Meyer, G., Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available, Trends in Food Science & Technology, Vol. 9 (1999); 380-388.

García-Cañas, V., Cifuentes, A., González, R., Detection of genetically modified organisms in food by amplification techniques, Food Science and Nutrition, Vol.44, No. 6 (2004); 425-436.

García, A., Cuestiones éticas en la manipulación genética (1998) http://www.oc.lm.ehu.es/cupv/univ98/comunicaciones/comun04.html (consultado junio 2014).

Gelvin, S., Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome Plant-Microbe Interaction, Vol. 3 (2012), articulo 52.

Germini, A., Zanetti, A., Salati, C., Rossi, S., Forré, C., Schmid, S., Marchelli, R., Development of s Seven-Target Multiplex PCR for the Simultneous Detection of Transgenic Soybean and Maize in Feed and Foods, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 52 (2004); 3275-3280.

Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Carroll, S.B., Aislamiento y manipulación de gene, en Genética. McGraw-Hill. 9ª ed. 2008, Madrid.

Hernández-Orona, V.L., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C., Escobar-Saucedo M.A., Reyes-Valdés, M.H., Detección Simultanea por PCR Múltiple de Diferentes Secuencias Acompañantes y Eventos Transgénicos en Alimentos Hechos en Casa y Comerciales (2011) http://www.unicordoba.edu.co/pregrado/alimentos/MEMORIAS/pdf/ARTICULOS%20CORTOS%20TECNOLOGIA/RODRIGUEZ%20T,%20MEXICO.pdf (consultado mayo 2014).

Herrera, E., Jiménez, R., Componentes de la soja de interés en alimentación, nutrición y salud humana, en La Salud y la Soja. EDIMSA Editores Médicos S.A., 2007, Madrid.

Herrera, N., Gómez, J. L., La biotecnología y los alimentos transgénicos (2011) www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2011/08/18/la_biotecnologia_y_los_alimentos_transgenicos_organismos_modificados_geneticamente.pdf (consultado junio 2014).

Holst-Jensen, A., Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives, Biotechnology Advances, Vol. 27 (2009); 1071–1082.

Infoagro, El cultivo de la soja (2014) http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm (consultado junio 2014).

ISAAA, GM Approval Database (2014) http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=19&TraitTypeID=Any&DeveloperID=Any&CountryID=Any&ApprovalTypeID=Any (consultado junio 2014).

Jaiwal, P.K., Singh, R.P., Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology. Kluwer Academic Publishers, (2003), Cornwall.

James, D., Schmidt, A.M., Wall, E., Green, M., Masri, S., Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 24, No. 51 (2003); 5829-5834.

James, C., BRIEF 46 Situación Mundial de los Cultivos Biotecnológicos/GM Comercializados: 2013 (2014) http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/pdf/Brief%2046%20-%20Executive%20Summary%20-%20Spanish.pdf (consultado mayo 2014).

James, C., Global review of commercialized transgenic crops. Current Science, Vol. 84, No. 3 (2003); 303-309.

James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA Brief No. 44 (2013) http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/infographic/default.asp (consultado junio 2014).

Kole, C., Abbott, A.G., Michler, C.H., Hall, T.C., Transgenic Crop Plants: Volume 2: Utilization and Biosafety. Springer-Verlag, 2010, Berlín.

Klug, W.S., Cummings, M.R., Tecnología del DNA recombinante, en Conceptos de genética. Prentice Hall. 5ª ed. 1999, Madrid.

Kress, W.J., Erickson, D.L., Jones, F.A., Swenson, N.G., Perez, Rolando, Sanjur, O., Bermingham, E., Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 106, No. 44 (2009); 18621-18626.

La Voz de Galicia, La Xunta plantea el cierre del Laboratorio de Saúde Pública de Pontevedra (2013) http://www.lavozdegalicia.es/pontevedra/2013/04/09/00031365504790546387951.htm (consultada julio 2014).

Lin, H., Chiueh, L., Yang-Chih, D., Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize by the Polymerase Chain Reaction Method, Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 8, No.3 (2000); 200-207.

Lövei, G.L., Ecological risks and benefits of transgenic plants, New Zealand Plant Protection, Vol. 54 (2001); 93-100.

Mazzara M., Munaro B., Larcher S., Grazioli E., Charles Delobel C., Savini C., Van Den Eede G., Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line 40-3-2 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol - Report on the Validation of a DNA Extraction Method for Soybean Seeds (2007) http://bookshop.europa.eu/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/EU-Bookshop-Site/en_GB/-/EUR/ViewPublication-Start?PublicationKey=LBNA23086 (consultado junio 2014).

Miraglia, M., Berdal K.G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J., Marvin, H.J.P.; Schimmel, H., Rentsch, J., van Rie, J.P.P.F., Zaagon, J., Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain, Food and Chemical Toxicology, Vol. 42 (2004); 1157-1180.

Montes de Oca, D.A., Food Biotechnology. Atlantic International University Honolulu (2013) http://www.aiu.edu/applications/DocumentLibraryManager/upload/1-892013-19307-719630705.doc (consultado junio 2014).

8. Bibliografía.

Morcillo, G., Cortés, E., García, J.E., Biotecnología y alimentación. Universidad Nacional de Educación a Distancia, 2ªed 2011, Madrid.

Narusaka, Y., Narusaka, M., Yamasaki, Satoki., Iwabuchi, M., Methods to Transfer Foreign Genes to Plants (2012) http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/30876.pdf (consultado junio 2014).

Nick, P., Christou, P., Breviario, D., Generating transgenic plants by minimal addition of exogenus DNA – a novel selection marker based on plant tubulins. AgBiotechNet Vol. 5 (2003).

Nicola, A., Manzo, A., Veronesi, F., Rosellini, D., An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research, Critical Reviews Biotechnology, Vol., 34 No. 1 (2014); 77-88.

Nikolic, Z., Taški-Ajdukovic, K., Jevtic, A., Marinkovic, D., Detection of GM soybean in food products by simultaneous employment ofThree pairs of PCR primers, Food Research International, Vol. 42 (2009); 349-352.

Nombela, C., Alonso, C., Balairón, L., Belil, F., Cortina, A., Elices, M., Fernánez-Rañada, A., López, M., Ramón, D., Rodés, J., Romeo, C.M., Valero, M., Organismos modificados genéticamente en la agricultura y la alimentación, Cuadernos de Bioética, Vol. XVI, No. 1 (2005); 67-130.

OMS, 20 preguntas sobre los alimentos genéticamente modificados http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/20questions_es.pdf?ua=1 (consultado junio 2014).

OMS, Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias (2005) http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_sp.pdf (consultado junio 2014).

OMS, Objetivos de Desarrollo del Milenio (2000) http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/es/ (consultado junio 2014).

Özgen, Ö., Yilmaz, F., Muratoglu, K., PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods, Food Control, Vol. 32 (2013); 525-531.

Pelaez, N., Montimer, F., Estudo da estabilidade de espuma com aplicação gastronómica elaborada a apartir da lecitina de soja Food Ingredients Brasil No. 17 (2011); 55-56.

Pérez-Piñeiro, P., Gago, J., Landín, M., Gallego, P., *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Wheat: General Overview and New Approaches to Model and Identify the Key Factors Involved (2012) http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/30868.pdf (consultado junio 2014).

Convenio sobre la Diversidad Biológica, Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (2000) http://www.conacyt.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/cartagena-protocol-es.pdf (consultado junio 2014).

Querci, M., Presentación del Manual, Métodos de Trabajo e Introducción del Curso, en Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos (2007) http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf (consultado junio 2014).

Querci, M., Mazzada, M., Características de la soja Roundup Ready, en Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos (2007) http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf (consultado junio 2014).

Ramón, D., Alimentos transgénicos (2003) http://www.fundacionmhm.org/pdf/Mono9/Articulos/articulo4.pdf (consultado junio 2014).

Ramón, D., Nuevas aplicaciones de la genética en la alimentación: alimentos transgénicos, Alimentación, Nutrición y Salud, Vol.11. No.1 (2004); 1-5.

Randhawa, G.J., Firke, P.K., Detection of transgenes in genetically modified soybean and maize using polymerase chain reaction, Indian Journal of Biotechnology, Vol.5 (2006); 510-513.

Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., BOLD: The Barcode of Life Data System, Molecular Ecology Notes (2007).

Reyes, M.S., Rozowski, J., Alimentos transgénicos, Revista chilena de nutrición, Vol.30. No.1 (2003).

8. Bibliografía.

Ridner, E., Valor Nutricional de la soja, en Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. Grupo Q S.A.: Sociedad Argentina de Nutrición, 1ªed 2006, Buenos Aires.

Rivas, C., Plantas y cultivos transgénicos (2008) http://www.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/CristinaRivas.pdf (consultado junio 2014).

Sánchez, F., Historia y economía, en Cultivo de la soja en Castilla y León. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. (2005).

Sánchez, T., Plantas transgénicas (2008) http://www.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/TrinidadSanchez.pdf (consultado junio 2014).

Sánchez-Cuevas, M.C., Biotecnología: ventajas y desventajas para la agricultura. UDO agrícola Vol. 3, No. 1 (2003); 1-11.

Sanz, B., Alimentos derivados de la soja, en en La Salud y la Soja. EDIMSA Editores Médicos S.A., 2007, Madrid.

Sanz, B., Introducción a la soja como alimento, en La Salud y la Soja. EDIMSA Editores Médicos S.A., 2007, Madrid.

Skerritt, J.H., Genetically modified plants: developing countries and the public acceptance debate, AgBiotechNet, Vol. 2 (2000).

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C., Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad. Vol.2, No 2 (2013); 70-78.

Tengel, C., Schüßler, P., Setzke, E., Balles, J., Sprenger-Haußels, M., PCR- Bases Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs, BioTechniques, Vol. 31 (2001); 426-429.

Terrón, M., Técnicas moleculares en la detección de organismos genéticamente modificados en los alimentos (2008) http://www.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/MartaTerron.pdf (consultado junio 2014).

Ubalua, A.O., Transgenic plants: Successes and controversies, Biotechnology and Molecular Biology Reviews, Vol. 4, No. 6 (2009); 118-127.

Universidad de Alcalá, Electroforesis en gel de poliacrilamida con sds "SDS-PAGE" http://www2.uah.es/jcdiez/biologia%20sanitaria/metodos%20biologia%20molecular/practicas.pdf (junio 1014)

Universidad Politécnica de Valencia, Familia Leguminosas http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas%20Angiospermas/R%C3%B3sidas/Leguminosas/Leguminosas.htm (consultado junio 2014).

Untergasser, A., Bijl, G., Liu, W., Bisseling, T., Schaart, J., Geurts, R., One-Step Agrobacterium Mediated Transformation of Eight Genes Essential for Rhizobium Symbiotic Signaling Using the Novel Binary Vector System pHUGE, PLOS ONE, Vol. 7, No, 10 (2012).

Verma, C., Nanda, S., Singh, R.K., Singh, R.B., Mishra, S., A Review on Impacts of Genetically Modified Food on Human Health, The Open Nutraceuticals Journal, Vol. 4 (2011); 3-11.

Wang, W., Fang, T.J., Development of Multiplex and Quantitative PCR Assay to Detect Genetically Modified Roundup Ready Soybean in Foods, Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 13, No. 2 (2005); 132-138.

Ye, X., Al-Babili, S., Kl Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I., Engineering the Provitamin A (β-carotene) Biosynthetic pathway into (Carotenoid- Free) Rice Endosperm, Science, Vol. 287 (2000); 303-305.