



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

***DETECCIÓN DE ORGANISMOS VEGETALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN
MATRICES ALIMENTARIAS QUE SE COMERCIALIZAN EN EL DEPARTAMENTO
DE MONTEVIDEO***

Bach. Marianella Amilibia

Diciembre 2023

Director de Tesina
Dra. Sylvia Vázquez
Laboratorio de Microbiología del Laboratorio de Bromatología
Servicio de Regulación Alimentaria
División Salud
Intendencia de Montevideo

Codirector de Tesina
MSc. Mailen Arleo
Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria
Facultad de Ciencias – UdelAR

Contenido

Tribunal.....	4
Dedicatoria.....	5
Agradecimientos.....	5
Resumen.....	6
1-Introducción.....	7
1.1- ¿Qué son los Alimentos Genéticamente Modificados o transgénicos?.....	7
1.2- Evaluación de riesgos asociados a los cultivos transgénicos.....	9
1.3- Etiquetado de los alimentos.....	10
1.4- Derecho a la información.....	11
1.5- Etiquetado de alimentos Genéticamente Modificados en Uruguay.....	11
1.6- Detección y cuantificación por PCR en tiempo real de OGM.....	13
1.6.1- Generalidades.....	13
1.6.2- <i>Screening</i> de secuencias GM.....	15
1.6.3- Detección de eventos específicos.....	16
1.6.4- Cuantificación de OGM por PCR.....	18
2- Objetivos.....	20
2.1- Objetivos generales.....	20
2.2- Objetivos específicos.....	20
3- Metodología.....	21
3.1- Muestreo.....	21
3.2- Extracción de ADN.....	21
3.3- Cuantificación y estimación de la pureza del ADN.....	22
3.4- <i>Screening</i> de secuencias GM.....	22
3.5- Detección de eventos específicos.....	22
3.6 Análisis estadístico.....	23
4- Resultados y Discusión.....	24
4.1- Resultados del <i>screening</i>	24
4.2- Comparación con resultados de estudios anteriores.....	33
4.3- Resultados de detección de evento específico.....	34
Perspectivas.....	38
Referencias.....	39

ANEXO I.....	42
ANEXO II.....	46
ANEXO III.....	48
ANEXO IV.....	49

Tribunal

Dra. Sylvia Vázquez. Laboratorio de Microbiología del Laboratorio de Bromatología

Servicio de Regulación Alimentaria, División Salud, Intendencia de Montevideo.

Dra. Natalia Bajsá. Investigadora Asociada en Departamento de Ecología Microbiana,

Instituto Clemente Estable (IIBCE).

Dra. Paula Mussio, Consultor/Investigador en Proyectos Alimentos – Microbiología,

Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Sector Microbiología.

Dedicatoria

- A mis padres donde estén, a mi hijo y a mi familia.
- A mis amigos, hermanos de la vida que no me han dejado caer,
- A todos los que han aportado para que salga adelante.

Agradecimientos

- Al tribunal por aceptar corregir la tesis.
- A Natalia Pastorino y Sebastián Mondutey por brindarme la oportunidad y el apoyo para realizar la tesis.
- A Sylvia Vázquez y a Mailen Arleo por la paciencia, la enseñanza y la guía para poder realizar la tesis.
- A Vivi por su paciencia, apoyo, su tiempo y enseñanzas.
- A los amigos y compañeros del laboratorio de Bromatología (funcionarios y pasantes) que no me dejaron bajar los brazos.
- A todos los que me alentaron y acompañaron durante todo el proceso.

Resumen

Los alimentos transgénicos son aquellos que contienen organismos genéticamente modificados (OGM) o han sido producidos a partir de ellos. Se entiende por OGM, cualquier planta, animal o microorganismo que ha sido modificado por técnicas de ingeniería genética, con el fin de lograr alguna característica de utilidad. Los alimentos transgénicos están hoy en día, ampliamente distribuidos en la industria.

La incorporación de este tipo de alimentos a la dieta, ha llevado a muchos países a introducir legislaciones específicas para controlar su producción y comercialización. Ya hace varios años se han aprobado diversas normas que imponen la obligación de identificar los OGM a través de leyendas en el rótulo o bien mediante la exhibición de listas de esos productos.

En Uruguay, el uso de transgénicos se encuentra regulado por normas específicas, siendo el Gabinete Nacional de Bioseguridad el órgano encargado de su regulación, a través del cual se canalizan las solicitudes de autorización y cuyo objetivo es evitar los riesgos para la salud humana y la conservación del medio ambiente.

A nivel departamental, La Junta Departamental de Montevideo, aprobó en el año 2013 el decreto N° 34.901 y posteriores modificaciones, donde se establece la obligatoriedad de etiquetado para aquellos alimentos que contengan OGM a concentraciones superiores al 1 %, considerando cada especie vegetal de forma individual. El Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo es el responsable de realizar los controles de fiscalización mediante técnicas de PCR basadas en normas validadas internacionalmente.

El objetivo del presente trabajo fue realizar la búsqueda de secuencias moleculares de transgenes en alimento comercializados en Uruguay, con fines a dar cumplimiento a la reglamentación departamental vigente. Para ello se analizaron 100 muestras provenientes de diferentes alimentos, que el laboratorio extrajo como parte de su plan anual de muestreo. Las mismas fueron procesadas y analizadas por PCR en tiempo real para la detección e identificación del material transgénico presente. Con los datos de las secuencias obtenidas, se realizó un análisis estadístico para evaluar la asociación de la presencia de transgénicos con el tipo de matriz, el país de origen y el tipo de procesamiento del alimento. Posteriormente se realizó una comparación con los resultados obtenidos en los cinco años anteriores de análisis del laboratorio, con el objetivo de identificar cambios que pudieran ser atribuidos a la implementación y fiscalización del etiquetado.

Palabras clave: Organismos vegetales genéticamente modificados, OGMs, etiquetado.

1-Introducción

1.1- ¿Qué son los Alimentos Genéticamente Modificados o transgénicos?

Se entiende por Organismo Genéticamente Modificado (OGM), aquellos organismos cuyo material genético (ADN) ha sido modificado genéticamente de una forma que no ocurre naturalmente (OMS, 2005). Los alimentos genéticamente modificados o transgénicos, son aquellos alimentos que contienen o están compuestos por Organismos Genéticamente Modificados, o han sido producidos a partir de ellos, según fuera definido por la Unión Europea en el año 2003. El alimento puede ser en sí mismo un OGM o estar compuesto por OGM, por ejemplo, harina de maíz o porotos de soja, puede contener ingredientes derivados de OGM (ejemplos: aceite de maíz, almidón, lecitina de soja) o alimentos que en su fabricación se emplearon microorganismos genéticamente modificados o enzimas producidas por microorganismos genéticamente modificados (GM) (por ejemplo yogur, cerveza, etc) (Galeano, P. *et al.*, 2014).

A nivel mundial existen 32 especies vegetales modificados genéticamente, siendo los más distribuidos los cultivos de soja, maíz y algodón. En lo que refiere al maíz existen 244 variedades transgénicas distintas (también llamados eventos transgénicos) y 43 para el cultivo de soja (International Service for Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2023). Se conoce como evento transgénico a la inserción particular de ADN de otra especie, que se inserta en una célula vegetal y que le brinda nuevas características a la planta modificada respecto a la no modificada, como por ejemplo resistencia a insecto, tolerancia a herbicidas, etc (Arleo, 2015) (Ver Fig.1).

El primer evento transgénico aprobado en Uruguay en 1996 fue la soja RR (Roundup Ready) de la empresa Monsanto, tolerante al herbicida glifosato. En los años siguientes fueron aprobados dos eventos más de soja de la empresa Bayer, ambos con tolerancia al herbicida glufosinato de amonio; otro de la empresa BASF con tolerancia a herbicidas del grupo de las imidazolinonas; y un 'evento apilado' de Monsanto (la soja Intacta RR2Pro) que porta a la vez un transgen que lo hace tolerante al glifosato y otro que lo convierte en tóxico para ciertas lagartas al producir una toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt). En la actualidad hay aprobados 17 eventos de soja para uso comercial (ver anexo I) (GNBio, 2023).

Los primeros eventos transgénicos en maíz aprobados para cultivo en Uruguay fueron los ‘maíces Bt’, MON810 y Bt11, en 2003 y 2004 respectivamente. Ambos producen una proteína Bt tóxica para larvas de lepidópteros que son plaga del maíz. Luego se aprobaron otros ocho eventos simples y apilados que producen toxinas Bt y/o presentan tolerancia a glifosato y/o a glufosinato de amonio. De estos eventos transgénicos, 4 pertenecen a la empresa Syngenta, 3 a Monsanto, 2 a Dow Agrosciences y 1 a un acuerdo entre Monsanto y Dow. Actualmente hay aprobados para uso comercial, 22 eventos de maíz (ver anexo I), (GNBio, 2023).

Por otro lado se encuentran en etapas de estudio para aprobación con fines comerciales algunos eventos algodón, papa y trigo (GNBio, 2023). Ejemplo de la construcción génica de los eventos aprobados en Uruguay se puede ver en la figura 1. Los eventos apilados (*stacked events*) se conforman por el cruzamiento convencional de dos o más líneas parentales de plantas conteniendo estas construcciones génicas (p. ej., GA21 x Bt11).

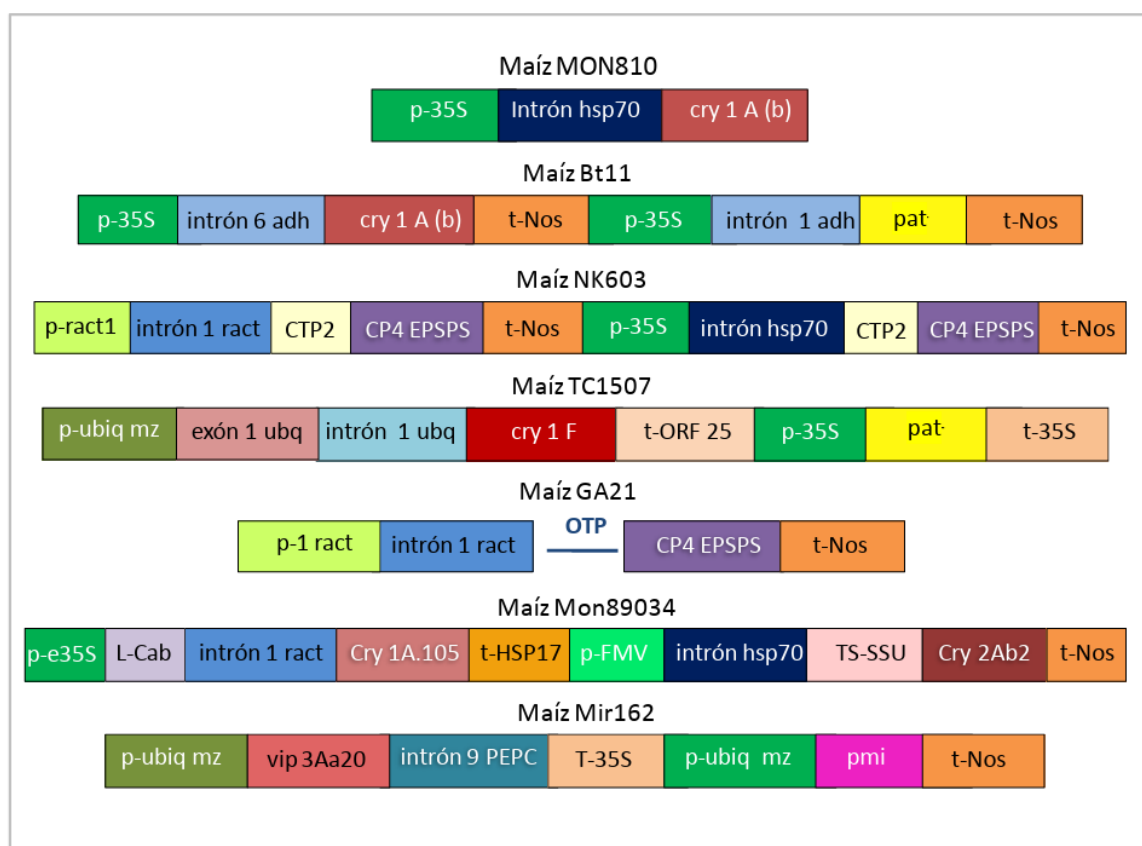


Figura 1. Representación de algunas de las construcciones de los eventos de maíz aprobados en Uruguay, MON810, Bt11, NK603, TC1507, GA21, MON89034 y Mir162. A modo explicativo el p35S es el promotor 35S del virus del mosaico del

coliflor, Hsp70 corresponde al intrón de la *heat-shock protein* 70 de maíz, intrón 6 adh es el intrón 6 del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa de maíz, mientras que cry 1 A(b) codifica para la delta-endotoxina cry1Ab de *B. thuringiensis subsp. kurstaki*, intrón 1 adh corresponde al primer intrón del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa de maíz, t-Nos es el terminador del gen nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, pat es el gen de la enzima fosfoinotricin-acetil transferasa (pat) de *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, p-ract 1 es el promotor del gen de la actina de arroz, intrón 1 ract corresponde al intrón 1 del gen de la actina de arroz, CTP2 es el péptido de tránsito al cloroplasto de *A. thaliana*, CP4 EPSPS codifica para la enzima 5 enolpiruvil-shiquimato 3-fosfato sintetasa de *A. tumefaciens*, p-ubiq es el promotor del gen de ubiquitina de maíz, exón 1 ubq es el primer exón del gen de la ubiquitina de maíz, intrón 1 ubiq es el primer intrón del gen de la ubiquitina de maíz, cry 1 F codifica para una delta-endotoxina cry1F de *B. thuringiensis*. T-ORF25 corresponde a la secuencia PolyA del ORF25 de *A. tumefaciens*, t-35s corresponde al terminador del gen 35S del virus del mosaico del coliflor, p-PEPC es el promotor del gen de la fosfoenol-piruvato carboxilasa de maíz, intrón 9 PEPC es el intrón 9 del gen de la fosfoenol-piruvato carboxilasa de maíz, p-CDPK es el promotor del gen de la proteína quinasa dependiente de calcio de maíz, L-Cab corresponde a la región 5' no traducida de la proteína de unión a la clorofila a/b de trigo, cry 1A.105 codifica para la delta-endotoxina artificial con los dominios I y II de cry1Ab o cry1Ac de *B. thuringiensis subsp. kurstaki*, t-Hsp17 corresponde a la secuencia 3' de terminación de la transcripción para la *heat-shock protein* 17 del trigo, p-FMV corresponde al promotor del virus del mosaico del higo, TS-SSU codifica para una secuencia de acceso al cloroplasto de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa del maíz y primer intrón, cry 2Ab2 corresponde a la secuencia codificante de la proteína cry2Ab2 de *B. thuringiensis*, vip 3Aa20: delta-endotoxina producida por *B. thuringiensis*, *pmi* es el gen que codifica para la fosfomanosa isomerasa de *E. coli* en base a información del ISAAA (Tomado de Arleo, M. 2015).

1.2- Evaluación de riesgos asociados a los cultivos transgénicos

La liberación al ambiente de los organismos vegetales genéticamente modificados suele conllevar diversos riesgos, los cuales deben evaluarse y gestionarse previo a su introducción al ambiente. Entre ellos se asocian las interacciones de estos con los distintos componentes del ecosistema, posibles efectos en los consumidores en el caso de cultivos alimenticios y efectos del paquete tecnológico vinculado al uso de los nuevos rasgos aportados por estos cultivos. Esto hace que la preocupación por los riesgos asociados deje de ser primordialmente de los científicos que trabajan directamente en el desarrollo de la tecnología y pase a ser de interés de toda la sociedad. El Convenio de Naciones Unidas sobre Diversidad Biológica (CDB) reconoce que existen riesgos potenciales asociados a los cultivos transgénicos. En su artículo 8 inciso g este convenio señala que se “establecerá o mantendrá medios para regular, administrar o controlar los riesgos derivados de la utilización y la liberación de organismos vivos modificados como resultado de la biotecnología, que es probable tengan repercusiones ambientales adversas que puedan afectar a la conservación y a la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana”, estos riesgos potenciales en la salud podrían ocasionar resistencia a antibióticos, el desarrollo o aumento de alergias asociadas a la exposición al

producto del transgen y toxicidad a corto o largo plazo (Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2010).

En Uruguay existe desde el año 2008 el Sistema Nacional de Bioseguridad, quien reúne a los organismos encargados de autorizar la introducción, el uso y la manipulación de vegetales genéticamente modificados y sus partes, cualquiera sea la forma o el régimen bajo la cual se realicen, teniendo en cuenta los resultados de las correspondientes etapas de evaluación y gestión del riesgo de esa aplicación sobre el ambiente, la diversidad biológica, la salud humana, la sanidad animal, la sanidad vegetal y aspectos socioeconómicos (GUBUY, Sistema Nacional de Bioseguridad, 2023)

1.3- Etiquetado de los alimentos

La importancia del etiquetado se centra en el derecho a la alimentación adecuada y derecho a la información; la alimentación es considerada un Derecho Humano fundamental a partir de la Declaración Universal de los Derechos Humanos (DUDH) (Naciones Unidas: 1948). La DUDH por sí misma no presenta ningún valor jurídico a la interna de los países, por lo que en 1966 fueron aprobados dos pactos internacionales, los cuales presentan carácter vinculante para los Estados que los firman. Estos fueron el Pacto Internacional de Derechos Civiles y Políticos (PIDCP, 1966) y el Pacto Internacional de Derechos Económicos, Sociales y Culturales (PIDESC, 1966). El PIDESC, propone que los Estados parte adopten las medidas necesarias para mejorar los métodos de producción, conservación y distribución de alimentos, haciendo pleno uso de los conocimientos técnicos y científicos, difundiendo el conocimiento de los principios de la nutrición y desarrollando o reformando sistemas agrarios de tal manera que se logre el desarrollo y aprovechamiento más eficiente de los recursos naturales.

Según la FAO, desde la Cumbre Mundial de la Alimentación (CMA) de 1996, “la Seguridad Alimentaria, a nivel de individuo, hogar, nación y global, se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana” (CMA, 1996). Los cuatro pilares de la seguridad alimentaria son la disponibilidad, el acceso, la utilización y la estabilidad” según fuera establecido en el Programa Especial para la Seguridad Alimentaria en el año 2011 (PESA, 2011).

El etiquetado de los alimentos constituye el principal medio de comunicación entre los productores y los vendedores de alimentos, los compradores y los consumidores. La etiqueta, reseña de cualquier tipo de producto (alimenticio, farmacéutico, textil, etc.), es elemento esencial en la identidad del mismo y un motivador frente a decisiones de consumo. Proporciona los datos necesarios que los consumidores necesitan para tomar las decisiones referentes a su salud. Desde este marco normativo, la etiqueta de los alimentos, incluida la etiqueta de los alimentos genéticamente modificados, es una herramienta de control para hacer efectivo el Derecho a la Alimentación Adecuada y el Derecho a la información.

1.4- Derecho a la información

La Ley 17.250 sobre la Defensa del Consumidor del Poder Legislativo (2000) ha consagrado expresamente como básico, el derecho de éstos a la información. El Artículo 6^{to} establece como derechos básicos de los consumidores los que se detallan a continuación:

- A) La protección de la vida, la salud y la seguridad contra los riesgos causados por las prácticas en el suministro de productos y servicios considerados peligrosos o nocivos.
- B) La educación y divulgación sobre el consumo adecuado de los productos y servicios, la libertad de elegir y el tratamiento igualitario cuando contrate.
- C) La información suficiente, clara, veraz, en idioma español sin perjuicio que puedan emplearse además otros idiomas.
- D) La protección contra la publicidad engañosa, los métodos coercitivos o desleales en el suministro de productos y servicios y las cláusulas abusivas en los contratos de adhesión, cada uno de ellos dentro de los términos dispuestos en la presente ley.

1.5- Etiquetado de alimentos Genéticamente Modificados en Uruguay

El Decreto Presidencial 353/008 del 21 de julio de 2008 es el que regula los aspectos vinculados a la bioseguridad de vegetales genéticamente modificados en Uruguay (MGAP-GNBio, 2015). El artículo 4^{to} de este decreto (Etiquetado) establece que “El Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNBio) promoverá acciones tendientes a la implementación del etiquetado voluntario "GM" o "no GM", aplicable a aquellos alimentos en los que se pueda

comprobar mediante análisis del producto final la presencia de ADN o proteínas genéticamente modificados”. Al día de hoy este etiquetado voluntario no se ha reglamentado a nivel Nacional.

No obstante en Montevideo, se encuentra vigente el Decreto N° 36.554 de fecha 07/12/2017 Artículo D.1774.83 de la Junta Departamental de Montevideo, que establece que “Los alimentos que provienen de organismos genéticamente modificados, o que contengan ingredientes producidos a partir de estos, que superen el 1 % de material modificado genéticamente respecto a la especie vegetal considerada individualmente, deberán ser etiquetados especialmente conforme lo dispuesto en las presentes normas”. Dicho etiquetado se volvió obligatorio a partir de febrero del año 2022.

De acuerdo a la normativa departamental vigente, los alimentos que contengan organismos genéticamente modificados deberán contar con una rotulación distintiva que los identifique. La etiqueta deberá incorporar la letra “T” acompañada de la leyenda “Contiene organismos modificados genéticamente”. Esta debe estar en la cara principal del envase y cumplir con determinadas dimensiones proporcionales a cada paquete. Al comienzo de la implementación del etiquetado, existió la posibilidad de utilizar un logo transitorio que podía ser aplicado sobre envases ya diseñados, mediante una técnica de rápida impresión.

El decreto de etiquetado obligatorio, surgió como una iniciativa del Departamento de Desarrollo Social, Servicio de Regulación Alimentaria, organizaciones de la sociedad civil, empresarios de la alimentación, representantes de la industria, técnicos y referentes de la temática. Esta normativa tiene como objetivo mejorar la calidad de la información para las y los consumidores, siendo una prioridad de los sucesivos gobiernos departamentales, desde su implementación. También adoptó un decreto similar el gobierno departamental de Paysandú (Decreto N° 7362/2016).

1.6- Detección y cuantificación por PCR en tiempo real de OGM

1.6.1- Generalidades

El procedimiento general para la detección de OGM por técnicas de biología molecular comienza con la extracción de ADN del alimento, prosigue con la cuantificación de la calidad del ADN extraído y finaliza con la detección de secuencias transgénicas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe en las figuras 2 y 3 (Miraglia, *et al.*, 2004). Esta detección consiste en tres etapas fundamentales: 1. Rastreo de OGM: se detecta la presencia de OGM, dirigiendo la búsqueda hacia secuencias comunes presentes en distintos eventos (por ejemplo, promotores y terminadores que son secuencias que flanquean al gen que se introducirá en la planta, como por ejemplo p35S, t-NOS, FMV, y bar). 2. Identificación de eventos específicos presentes en la muestra. 3. Cuantificación de los OGM encontrados.

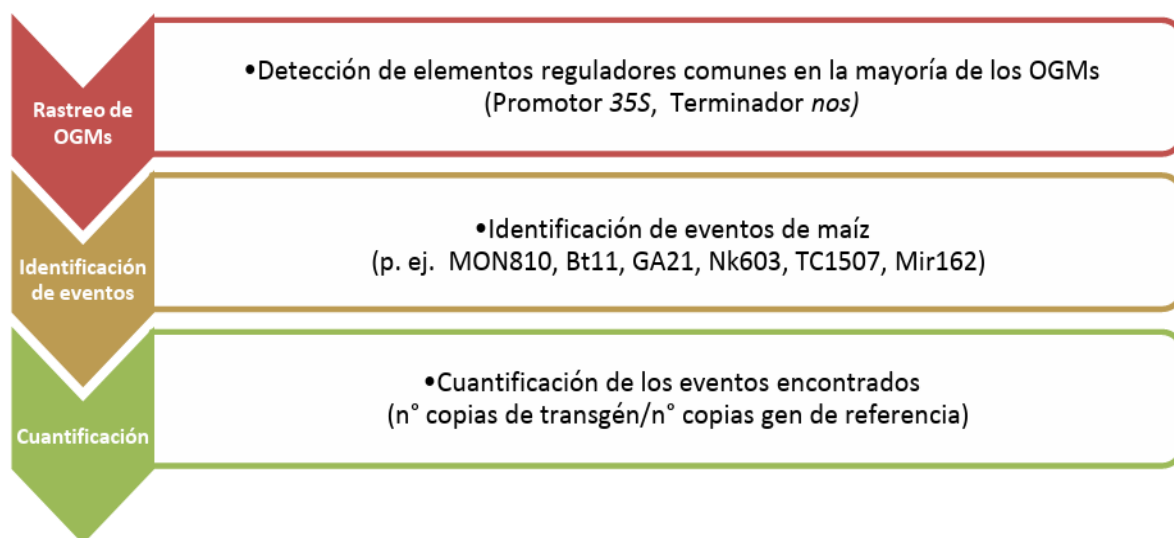


Figura 2: Proceso de detección de OGM en alimentos. Tomado de (Griffiths, K. *et al.* 2002; Markoulatos P. *et al.*, 2004; Arleo, M. 2015).

Para el rastreo de OGM por PCR se pueden utilizar distintas aproximaciones que varían en el nivel de especificidad según el blanco al cual están dirigidos los cebadores (Figura 3). En grado creciente de especificidad se encuentran: rastreo de OGM (*screening*), detección específica de gen, detección específica de construcción y detección específica de evento. (Griffiths, K., *et al.*, 2002; Markoulatos P., *et al.*, 2004; Arleo, 2015).

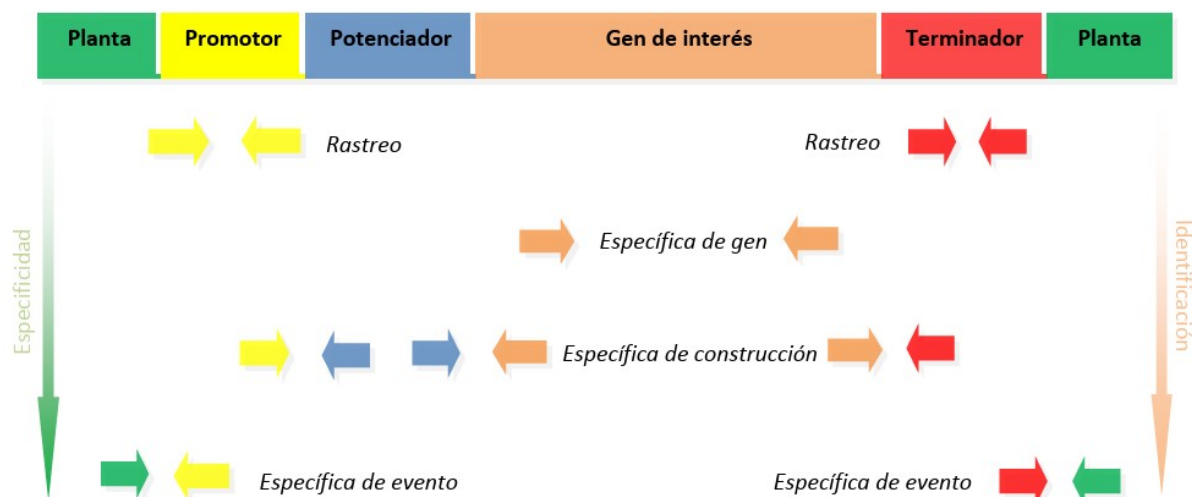


Figura 3. Representación esquemática de un evento transgénico tipo. De arriba hacia abajo se muestran las estrategias de detección e identificación por PCR en grado creciente de especificidad. Las flechas horizontales indican la ubicación de los cebadores. (Tomado y modificado de Holst-Jensen, A. *et al.*, 2003; Arleo, M. 2015).

Estas estrategias pueden llevarse a cabo por la técnica de PCR convencional o en Tiempo Real. La PCR en tiempo real es la técnica elegida por ser más sensible y rápida ya que utiliza agentes o sondas fluorescentes para la detección específica de genes, cuya amplificación se va visualizando en tiempo real (Ahmed, F. 2002). Para que la misma funcione se necesitan dos cebadores que enmarcan la secuencia diana, una enzima (Taq-polimerasa) que actúa como catalizador de la reacción y los nucleótidos que se incorporarán a las nuevas cadenas de ADN (Anklam E. *et al.*, 2002).

Dentro de las ventajas de esta técnica se encuentra el análisis multiplex, que implica el uso de varios pares de cebadores en una misma mezcla de reacción, lo cual permite la detección de múltiples blancos de ADN, haciendo que sea una técnica excelente para la determinación de diversos eventos GM de forma simultánea (Akiyama, H. *et al.*, 2011).

Una desventaja de esta tecnología, es que se necesita el conocimiento detallado de las secuencias de ADN asociadas, dada la necesidad de conjuntos de cebadores con una especificidad muy alta, lo que lleva tiempo de estudio y desarrollo (Van Duijn, G. *et al.*, 2002). En lo que refiere a los OGM esta tarea se dificulta aún más ya que las secuencias no suelen ser públicas y no siempre están accesibles para su estudio. Otra desventaja es que en el caso de la cuantificación de alimentos GM, el método no logra distinguir entre la

presencia de OGM apilados, ó transgenes simples, lo que puede conducir a sobre cuantificaciones del material presente (Anklam, E. *et al.*, 2002; Miraglia, M. *et al.*, 2004).

1.6.2- Screening de secuencias GM

Para los casos de análisis de rutina se han diseñado diversas soluciones, como los Kits comerciales, que dirigen la búsqueda a secuencias comunes de OGM, con sensibilidades que alcanzan el entorno del 0,01 % de material genéticamente modificado (Griffiths, K. *et al.*, 2002). Por ejemplo, los kits de BIOTECON usados en esta tesis permiten la detección de las secuencias comunes: p35S (promotor 35S del mosaico del coliflor), t-NOS (terminador del gen nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*), bar (proviene de *Streptomyces higroscopicus* que codifica para la enzima fosfinotricina acetil-transferasa: PAT) y FMV (promotor del mosaico del higo) (Novack, P. *et al.*, 2009; ISAAA, 2023). La elección de utilizar este kit en particular, se basó en que abarca todos los eventos autorizados comercialmente en Uruguay hasta la fecha (Ver Anexo 1).

El mismo utiliza sondas TaqMan específicas marcadas con fluoróforos distintos para cada secuencia transgénica. Para la detección de OGM también utiliza una sonda específica para un gen genérico de planta, que sirve como control de extracción de ADN de buena calidad y un control interno para verificar que no haya un inhibidor de PCR. En cada corrida se utiliza un control positivo (foodproof GMO Screening Control Template) que corresponde a un plásmido que contiene todas las secuencias transgénicas buscadas y un control negativo (H₂O).

En la siguiente tabla se ejemplifican algunas de las posibilidades de los resultados del *screening* utilizando este kit:

Muestra	Gen planta	p35S	t-NOS	bar	FMV	Control interno	RESULTADO
1	+	-	-	-	-	+	No se detectó la presencia de las secuencias transgénicas comunes p35S, t-NOS, bar, FMV
2	+	+	+	+	+	+	La muestra contiene las secuencias transgénicas comunes p35S, t-NOS, bar, FMV
3	-	-	-	-	-	+	No se pudo extraer material genético de la muestra.

1.6.3- Detección de eventos específicos

Un evento de transformación es una recombinación o inserción particular de una secuencia de ADN que ocurre en el genoma de una célula vegetal. Los eventos difieren unos de otros en los elementos y genes insertados, en los sitios de inserción en el genoma de la planta, en el número de copias del inserto y en los patrones y niveles de expresión de las proteínas de interés. Los eventos pueden además acumularse por cruzamiento convencional, lo que da como resultado a una planta con varias características combinadas, que se conoce como evento apilado (Arleo, M., 2015).

La estrategia de PCR conocida como determinación de eventos específicos permite identificar un único evento de transformación, logrando una alta especificidad al tener como blanco la secuencia comprendida en el sitio de unión entre el ADN transgénico y el genoma del huésped, única para cada evento (Flores, Y. *et al.*, 2007; Arleo, M., 2015). La desventaja de este tipo de estrategia se presenta cuando se quiere detectar OGM en alimentos, ya que los productos procesados pueden contener mezclas de diferentes cultivos transgénicos con distintas transformaciones génicas, ya sea eventos simples o apilados. Es por ello que la estrategia de detección de eventos suele realizarse en materias primas o apelando a la trazabilidad de los cultivos (Holst-Jensen, A. *et al.*, 2006; Arleo, M., 2015).

La detección de eventos específicos por PCR puede realizarse utilizando cebadores específicos en combinación con agentes intercalantes fluorescentes o sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los primeros son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más utilizado es *SYBR® Green* que se intercala a cualquier secuencia de doble cadena. Esta unión inespecífica dificulta la distinción entre el ADN diana y la amplificación de secuencias no objetivo o de dímeros de cebadores. Por esta razón, y para verificar que se está amplificando la secuencia buscada y no otro artefacto, se implementa el análisis de la curva de disociación (*melt curve*) (Figura 5), (Gasparic, M. *et al.* 2010; Hernández, M. *et al.* 2003; Arleo, M. 2015). Este análisis se basa en la comparación de las curvas de disociación de cada amplicón (temperatura de *melting* o T_m), con el correspondiente a un control positivo. La temperatura de *melting* es la temperatura a la cual el 50 % de los pares de bases de un dúplex de ADN se separan. Dicha T_m es característica para cada amplicón, la misma depende del tamaño del ADN de doble

cadena y de su composición en bases nitrogenadas. Cuanto mayor es el contenido de GC y más grande es el tamaño de amplicón, más alta es la temperatura de disociación. Observando las T_m es posible detectar la presencia de una secuencia blanco o la presencia de dímeros de cebadores o secuencias inespecíficas (Flores, Y. *et al.*, 2007; Arleo, M., 2015). En la práctica, la T_m de un amplicón se obtiene una vez que culmina el ciclado de la PCR, aumentando la temperatura a 95°C para que las hebras de ADN de doble cadena se disocien en cadenas simples, permitiendo la liberación de los agentes intercalantes, lo que se observa como una caída de la señal de fluorescencia, que luego se traduce en un pico único y característico de ese amplicón (Figura 5).

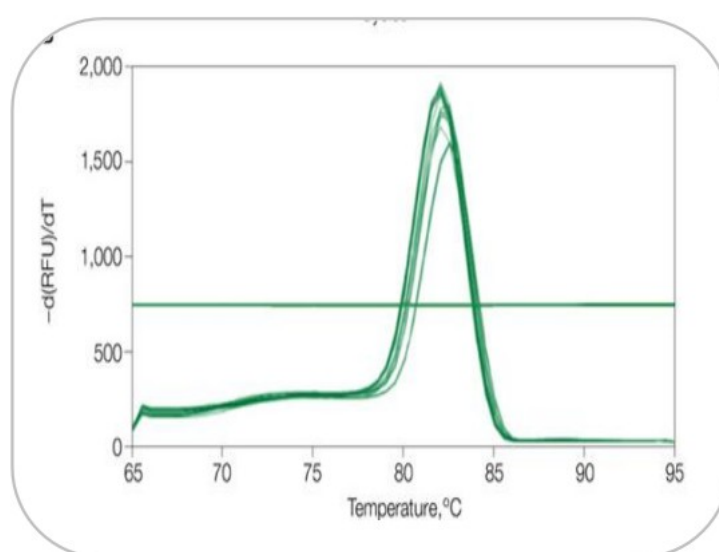


Figura 5. Curva de disociación (*Melt curve*). Curva de disociación típica generada a partir de los datos recolectados del análisis de qPCR utilizando el colorante SYBR® Green. Mediante la comparación de las temperaturas de *melting* de los productos de PCR de cada muestra, se puede detectar la presencia de la secuencia diana, la presencia de un amplicón no objetivo adicional, o la formación de dímeros de cebadores. Tomado de BIO-RAD Laboratories 2012; Arleo, M. 2015).

Con respecto a las sondas específicas, las más utilizadas para PCR en Tiempo Real son las sondas de hidrólisis (TaqMan®). Las sondas TaqMan® suelen ser oligonucleótidos de 20-30 bases de longitud que contienen un colorante fluorescente en el extremo 5' y un colorante inhibidor en el 3' (*quencher*). Cuando la sonda está intacta el *quencher* suprime la señal del

colorante emisor y la misma no fluoresce, pero durante la reacción de PCR la ADN polimerasa, con su actividad exonucleasa 5'-3', degrada la sonda entre el fluoróforo y el *quencher* separándolos y permitiendo la emisión de fluorescencia (Wiseman, G., 2002; Flores, Y. *et al.*, 2007; Arleo, M., 2015). Otro ejemplo de sondas de hidrólisis son las sondas TaqMan®-MGB que son sondas acopladas a una pequeña molécula que se une el surco menor del ADN bicatenario, conocida como MGB del inglés *minor groove binder-DNA*. Esta unión aumenta la estabilidad de la sonda permitiendo un diseño más corto de la misma, le da más especificidad a la hibridación, le permite la discriminación más precisa de las secuencias diana y presentan ventajas para la PCR cuantitativa, especialmente para los ensayos en múltiplex (Koch, W., 2004; Lie, Y. *et al.*, 1998; Kuttyavin, I. *et al.*, 2000; Arleo, M. 2015).

1.6.4- Cuantificación de OGM por PCR

Para determinar el porcentaje de OGM en un sistema basado en la PCR en Tiempo Real, es necesario medir el número de secuencias de ADN específicas del OGM y normalizarlo con el número de secuencias de un gen de referencia endógeno de la especie correspondiente. El gen de referencia endógeno debe escogerse de manera que sea específico de la especie, esté presente en una sola copia por genoma haploide, se encuentre estable en líneas diferentes de la misma especie y sea fácil de amplificar (Arleo, M. 2015).

Para la cuantificación se procede a realizar dos curvas patrón utilizando materiales de referencia; una para el sistema de cuantificación específico del OGM y la otra para la cuantificación del gen de referencia. Para cada muestra, se determinan mediante interpolación con las curvas patrón, las cantidades correspondientes a la diana GM y al gen de referencia. Luego se calcula el porcentaje GM según la fórmula:

$$\% \text{ OGM} = (\text{n}^\circ \text{copias OGM} / \text{n}^\circ \text{copias referencia}) \times 100$$

La manera adecuada y recomendada por las normas internacionales para realizar la cuantificación de OGM en productos alimenticios, es a partir del uso de métodos evento específico. Primeramente se debe identificar cada evento presente en la muestra, luego se lo cuantifica y por último se realiza la suma de los porcentajes. No obstante, la tarea de detectar a todos los eventos que pueden encontrarse en un alimento procesado, resulta casi impracticable,

difícil y muy costosa para un laboratorio de rutina, ya que deberían realizarse cientos de análisis por muestra. Para superar esta dificultad, varios laboratorios se han enfocado en detectar y cuantificar elementos comunes a la mayoría de los eventos liberados, como lo es el Promotor *CaMVp35S*. Este método ya ha sido validado en laboratorios de referencia y se encuentra contemplado en las normas estándares referentes a los OGM (ISO 21568-21571).

La ventaja del método de cuantificación del *CaMVp35S* radica en la reducción significativa del costo del análisis. Sin embargo, el mismo presenta algunas desventajas importantes. Como se comentó anteriormente, no todos los eventos de maíz GM contienen el promotor 35S, por lo que los mismos quedarían excluidos de la cuantificación. A su vez, algunos eventos contienen más de una copia del promotor, por lo que el porcentaje obtenido podría estar sobreestimado. Este punto podría resultar problemático en el caso de que el contenido de OGM se encuentre cercano al umbral normativo para el etiquetado de OGM. Por otro lado, debe considerarse que los métodos de detección y cuantificación de OGM utilizando cualquiera de las estrategias mencionadas, ya sea mediante la búsqueda de secuencias comunes o mediante el enfoque evento específico, no son capaces de distinguir entre un evento “apilado” y la mezcla de los eventos independientes. El desarrollo de los métodos para determinar eventos apilados, continúa siendo un desafío para los organismos de control a nivel mundial (Arleo, M. 2015).

2- Objetivos

2.1- Objetivos generales

El objetivo general del presente trabajo es el análisis del cumplimiento de la rotulación para OGM, según lo establece el decreto departamental vigente N° 36.554, en alimentos que se comercializan en el Departamento de Montevideo.

2.2- Objetivos específicos

- 2.2.1 – Realizar el muestreo en plaza de alimentos sin rotulación para OGM, que contengan en sus ingredientes soja y/o maíz.
- 2.2.2 – Extraer y cuantificar el ADN de las muestras.
- 2.2.3 – Determinar la presencia de material GM mediante *screening* de las secuencias transgénicas comunes p35S, tNOS, FMV y Bar.
- 2.2.4 – Determinar la presencia de eventos específicos en las muestras positivas al *screening*.

3- Metodología

3.1- Muestreo

Se analizaron 102 muestras extraídas del mercado de Montevideo, con presencia de soja y/o maíz entre sus ingredientes declarados, sin rotulación de presencia de transgénicos. Entre estas se eligieron: granolas, mezclas de semillas, salsas, cereales, aceites, panificados, harinas, dulce de leche, patés, mezclas para preparar, productos de copetín. El muestreo se realizó siguiendo el protocolo del Laboratorio de Microbiología – Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo, según lo definido en CODEX 50/2004.

3.2- Extracción de ADN

Se siguió el protocolo del *Kit foodproof® GMO Sample Preparation Kit, BIOTECON Diagnostic* para la extracción de ADN de origen vegetal de alimentos. Cada muestra fue constituida por cinco unidades de un lote. Se pesaron 50 g de cada unidad muestral en bolsa de *stomacher*, de forma de obtener un peso total de 250 g, se homogeneizó, se tomó una muestra analítica con espátula esterilizada, de aproximadamente 200 mg en un tubo de 2.2 ml, para proseguir con la extracción del ADN. Se agregaron 1000 µL de Buffer de Extracción, se invirtió el tubo varias veces a los efectos de lograr un buen mezclado de la muestra; se incubó a 80°C por 30 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 12.000 g. Se tomó con cuidado la fase acuosa, se colocó en un tubo 2.2 ml prellenado con 400 µl de Buffer de enlace, adicionado con 80 µl de Proteinasa K y se mezcló por inversión. Se incubó la muestra por 10 minutos a 72°C, se agregaron 200 µl de isopropanol, mezclando por inversión. Posteriormente, se transfirieron 650 µl de la muestra a un tubo de filtración, se centrifugó 1 minuto a 5000 g. Se repitió la filtración y centrifugación con 650 µl de la muestra remanente. Se descartó el filtrado y se adicionaron 450 µl de buffer de lavado, se centrifugó 1 minuto a 5000 g, y se descartó el filtrado. Se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad (13000 rpm). Se colocó el tubo de filtrado en un nuevo tubo de reacción de 1.5 mL y se adicionó 100 µl de Buffer de elución, precalentado a 70°C durante 5 minutos. Se centrifugó por 1 minuto a 5000 g, obteniéndose en el filtrado el DNA purificado.

3.3- Cuantificación y estimación de la pureza del ADN

La cuantificación del ADN se realizó por medio de un espectofotómetro de microvolúmenes (Fluorímetro Qubit 3.0). Se preparó una mix de trabajo con el fluoróforo y un buffer proporcionado por el *Qubit ds DNA HS Assay "Invitrogen" kit*, en una relación 1:199. Las reacciones para la cuantificación se prepararon con 190 µL de mix de trabajo y 10 µL de ADN o del estándar, (Resultados anexo II).

3.4- Screening de secuencias GM

Se siguió el protocolo del *kit Foodproof® GMO Screening Kit (35S, NOS, Bar, FMV) – 5' Nuclease, BIOTECON Diagnostics*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se prepararon dos mezclas de reacción (Mix), uno para detectar las secuencias transgénicas 35S/tNOS/bar/FMV (MIX 1) y el otro para detectar el gen de planta y el Control interno positivo del kit (MIX 2). El volumen total en cada tubo de reacción fue de 20 µL, compuesto por 18 µL del Master Mix, 1 µL de la solución de enzima polimerasa y 1 µL de la solución (Dye), para el caso de la MIX 1 de OGM, y 1 µL de Control Interno para el MIX 2 de planta. En cada tubo de reacción se agregaron 5 µL de muestra de ADN, agua grado PCR en el control negativo y 5 µL de *foodproof GMO Screening Control Template* para el control positivo. El programa tiempo-temperatura PCR Real-time consistió en una pre-incubación a 37°C por 4 minutos y luego 10 minutos a 95°C; la amplificación fue de 50 ciclos, con dos pasos: el primero a 95°C por 15 segundos y el segundo a 60°C por 60 segundos. La configuración de la detección de fluorescencia fue establecida para el MIX 1 en el canal FAM (para la detección del 35S), el canal VIC/HEX (para la detección del NOS), el canal ROX (para la detección de bar), y el canal Cy5 (para la detección del FMV). Para el MIX 2 se estableció el canal VIC/HEX (para control interno) y el canal FAM (para la detección del ADN de planta). El equipo de PCR utilizado fue el *Applied Biosystem*, modelo: 7500 Real Time PCR System, software 7500, versión 2.0.6.

3.5- Detección de eventos específicos

A partir de las muestras que dieron positivo a la presencia de OGM, se procedió a la detección de los eventos específicos Bt11, TC 1507, Bt176 y NK 603, utilizando cebadores proporcionados por el laboratorio LATRAMA, F. Ciencias, UdelaR, tomados del *JRC GMO-*

Amplicons GMOMETHODS, The European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EU-RL GMFF) (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmoamplicons/>).

Se prepararon los Mix de reacción para la detección de cada evento, teniendo en cuenta que para cada tubo de reacción, el volumen total era de 25 µl. Se tomaron 12.5 µl de buffer SYBR, 1 µl de Primer Forward (cebador directo 10 µM), 1 µl de Primer Reverse (cebador reverso, 10 µM), 5.5 µl de agua mQ c.s.p y 5 µl de ADN. La secuencia de amplificación se programó de la siguiente manera: un ciclo de 10 minutos para la activación de la enzima ADN polimerasa a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, y 1 minuto a 60°C para el *annealing* y la extensión. Luego de finalizada la reacción de amplificación, se prosiguió con el análisis de la temperatura de *melting* (T_m), con 19 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60°C, 30 segundos 95°C y 1 segundo a 60°C (Arleo, M., 2015). El equipo de PCR utilizado fue el *Applied Biosystem*, modelo: 7500 *Real Time PCR System*, software 7500, versión 2.0.6. Las T_m descritas para cada evento fueron las siguientes: Bt11, T_m=72°C; TC 1507, T_m=77°C; Bt176, T_m=80°C; NK 603, T_m=85 (Arleo, 2015)

3.6 Análisis estadístico

Para comparar los resultados obtenidos de los diferentes productos se utilizó la prueba exacta de Fisher, bajo la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre las variables (Fisher, R. 1954). En todos los casos se utilizó un nivel de probabilidad de $p=0,05$ para aceptar o rechazar la hipótesis. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad en línea (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>).

4- Resultados y Discusión

4.1- Resultados del *screening*

En la tabla 2, figura 6, se presentan los resultados del *screening* de las 102 muestras extraídas a partir de los alimentos muestreados en el departamento de Montevideo. En 99 muestras del total de 102, se logró la extracción de ADN y se observó amplificación del gen de planta (97,1 % del total de muestras procesadas).

En 3 muestras no se logró extraer ADN vegetal, el control de planta dio negativo mientras que el control interno dio positivo. Esto indica que la PCR transcurrió adecuadamente pero que no se pudo recuperar ADN de calidad amplificable. En todos los casos donde falló la extracción el procedimiento se repitió al menos una vez. Hay varias causas que pueden explicar este resultado, una de ellas es que muestras con alto contenido en azúcares o con alto contenido de lípidos dificultan la extracción del ADN. También puede ser que el modo de procesamiento del alimento influya en la degradación del ADN como consecuencia de los tratamientos térmicos, la fermentación, el refinamiento, entre otras (Cankar, K., *et al.*, 2006).

En 8 de las 99 muestras a las que se les pudo extraer ADN se obtuvieron resultados positivos, para al menos una de las secuencias evaluadas para la presencia de OGM en alimentos (p-35S, t-Nos. FMV y bar), esto representa el 8.1 % de positivos (en un n=99)

Tabla 2. Se muestran los resultados obtenidos durante esta tesis marcando con fondo naranja los positivos para presencia de GM con los kits utilizados y sobre fondo amarillo los que no se pudo extraer ADN.

N° Muestra	Alimento	p-35S	t-NOS	FMV	bar	Gen planta	Control interno	Resultados
720	Dulce crema de leche	-	-	-	-	+	+	-
721	Granola tradicional con coco	-	-	-	-	+	+	-
722	Premezcla para preparar bizcochuelo	-	-	-	-	+	+	-
723	Salsa de soja	-	-	-	-	+	+	-
724	Salsa de soja	-	-	-	-	+	+	-
725	Almidón de maíz	-	-	-	-	+	+	-
726	Alimento en base de avena, arroz crocante	-	-	-	-	+	+	-
727	Copos de maíz con azúcar	+	+	+	-	+	+	+
728	Polvo para preparar torta sabor vainilla	-	-	-	-	+	+	-

729	Polvo para preparar postre sabor vainilla	-	-	-	-	+	+	-
730	Alfajor con relleno mousse de chocolate	-	-	-	-	+	+	-
731	Alfajor relleno con dulce de leche, con cobertura	-	-	-	-	+	+	-
732	Alfajor de galleta de arroz relleno de mousse	-	-	-	-	+	+	-
733	Salsa sabor warabi	-	-	-	-	+	+	-
734	Salsa para ensalada	-	-	-	-	+	+	-
735	Galletitas tipo soda cracker	-	-	-	-	+	+	-
736	Granola con coco y miel	+	+	+	-	+	+	+
737	Salsa con sabor a ostras	+	+	+	-	+	+	+
738	Galletitas tipo María	-	-	-	-	+	+	-
739	Dulce de leche	-	-	-	-	+	+	-
740	Galletitas minicracker	-	-	-	-	+	+	-
741	Dulce de leche	-	-	-	-	+	+	-
742	Magdalenas sabor limón	-	-	-	-	+	+	-
743	Snack de arroz integral con aceite de oliva sabor pesto	-	-	-	-	+	+	-
744	Papas fritas con sabor a jamón serrano	-	-	-	-	+	+	-
745	Papas fritas sabor jalapeño	-	-	-	-	+	+	-
746	Salsa para ensalada a base de aceite	-	-	-	-	+	+	-
747	Salsa de soja dulce	-	-	-	-	+	+	-
748	Salsa Cesar	-	-	-	-	+	+	-
749	Galletas cracker Salsa de soja	-	-	-	-	+	+	-
750	Salsa de soja	-	-	-	-	+	+	-
751	Salsa de ostras	-	-	-	-	-	+	No se extrajo ADN
752	Dulce de leche	-	-	-	-	+	+	-
753	Harina de maíz	-	-	-	-	+	+	-
754	Galletas snack sabor pizza con queso	-	-	-	-	+	+	-
755	Pasta de atún	-	-	-	-	+	+	-
756	Mezcla deshidratada para preparar hamburguesas	-	-	-	-	+	+	-
757	Harina de maíz blanco	-	-	-	-	+	+	-
758	Amendaim aperitivo	-	-	-	-	+	+	-
759	Producto alimenticio a base de maíz para copetín	+	-	-	+	+	+	+
760	Mostaza	-	-	-	-	+	+	-
761	Mezcla p/preparar filetes de soja tipo milanesa	+	-	+	-	+	+	+
762	Paté de hígado con pasas	-	-	-	-	+	+	-
763	Galletitas con dulce de membrillo	-	-	-	-	+	+	-
764	Galletitas snacks	-	-	-	-	+	+	-
765	Galletitas sin azúcar	-	-	-	-	+	+	-
766	Salsa de tomate y ricotta	-	-	-	-	+	+	-
767	Salsa de soja orgánica	-	-	-	-	+	+	-
768	Aderezo para ensalada	-	-	-	-	+	+	-
769	Salsa para ensalada a base de aceite c/yogur, s/gluten, s/huevo.	-	-	-	-	+	+	-

770	Mezcla de cereales , frutas deshidratadas y frutos secos	-	-	-	-	+	+	-
771	Surtido de semillas c/proteína de soja	+	+	+	-	+	+	+
772	Galletas de harina de maíz s/gluten, s/lactosa	-	-	-	-	+	+	-
773	Budín de naranja orgánico	-	-	-	-	+	+	-
774	Polvo para prepara hamburguesas	-	-	-	-	+	+	-
775	Harina de maíz amarilla	+	+	+	-	+	+	+
776	Mezcla para preparar filetes de soja	-	-	-	-	+	+	-
777	Polvo para preparar torta sabor vainilla	-	-	-	-	+	+	-
778	Aceite de maíz	-	-	-	-	+	+	-
779	Choclo desgranado al natural	-	-	-	-	+	+	-
780	Salsa de soja reducida en sodio	-	-	-	-	+	+	-
781	Salsa de soja	-	-	-	-	+	+	-
782	Salsa estilo Ten yaki	-	-	-	-	+	+	-
783	Galletitas finitas tipo cracker	-	-	-	-	+	+	-
784	Alfajor relleno de dulce de leche y baño azucarado	-	-	-	-	+	+	-
785	Salsa barbacoa	-	-	-	-	+	+	-
786	Salsa Teriyaki	-	-	-	-	+	+	-
787	Pan dulce	-	-	-	-	+	+	-
788	Bizcochos dulces de arroz crocante y horneados	-	-	-	-	+	+	-
789	Pan dulce	-	-	-	-	+	+	-
790	Pasta seca de harina de maíz	-	-	-	-	+	+	-
791	Polvo para preparar postre tipo Catalán	-	-	-	-	+	+	-
792	Onditas sin gluten con mix de semillas	-	-	-	-	+	+	-
793	Aceite de soja	-	-	-	-	-	+	No se extrajo ADN
794	Aceite de soja	-	-	-	-	-	+	No se extrajo ADN
795	Pan con frutas y castañas	-	-	-	-	+	+	-
796	Láminas de lasagna de maíz, arroz, porotos.	-	-	-	-	+	+	-
797	Snack multigrano de quinoa	-	-	-	-	+	+	-
798	Harina de maíz blanco pre-cocida	+	+	+	-	+	+	+
799	Panettone con frutas	-	-	-	-	+	+	-
800	Budín sin frutas	-	-	-	-	+	+	-
801	Torta sabor artificial de leche condensada rellena con leche condensada	-	-	-	-	+	+	-
802	Bocaditos de harina de trigo	-	-	-	-	+	+	-
803	Galletitas Snack sabor original	-	-	-	-	+	+	-
804	Galletitas snacks sabor longaniza con queso	-	-	-	-	+	+	-
805	Azúcar impalpable	-	-	-	-	+	+	-
806	Salsa de soja	-	-	-	-	+	+	-
807	Polvo para preparar postre sabor vainilla	-	-	-	-	+	+	-

808	Galletitas de arroz	-	-	-	-	+	+	-
809	Torradas finas natural	-	-	-	-	+	+	-
810	Alimento a base de avena, azúcar, crispines de arroz, jarabe de glucosa	-	-	-	-	+	+	-
811	Cereales dietéticos con vitaminas	-	-	-	-	+	+	-
812	Pan dulce	-	-	-	-	+	+	-
813	Pan dulce	-	-	-	-	+	+	-
814	Salsa a base de tomate con chile jalapeño	-	-	-	-	+	+	-
815	Aceite de soja	-	-	-	-	+	+	-
816	Almidón de maíz	-	-	-	-	+	+	-
817	Pochoclo con maíz orgánico y sal marina	-	-	-	-	+	+	-
818	Granola sin azúcar agregado	-	-	-	-	+	+	-
819	Panettone	-	-	-	-	+	+	-
820	Mezcla a base de copos de maíz y avena	-	-	-	-	+	+	-
821	Budín de frutas	-	-	-	-	+	+	-
822	Galletas saladas con salvado y semillas de chía	-	-	-	-	+	+	-

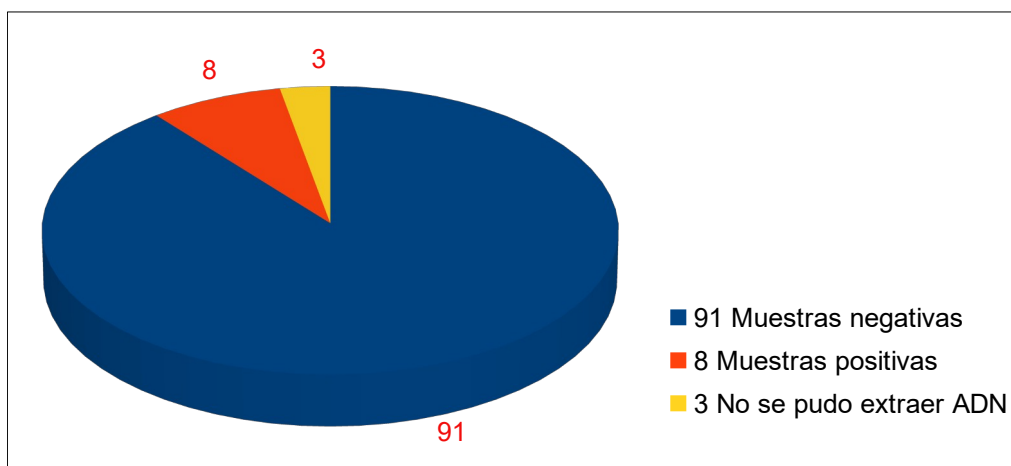


Figura 6. Resultados de *screening* de OGM de 102 muestras ensayadas: En tres casos no se pudo extraer ADN (2,9 % del total de muestras). Un total de 91 muestras de las 99, resultaron negativas a presencia de secuencias de *screening* de OGM (91,9 %) y 8 arrojaron resultados positivos (8,1 %).

En la tabla 3, se presenta la discriminación de las muestras según el país de origen que muestra resultados positivos al *screening*. De las ocho muestras positivas, tres resultaron ser de origen nacional, y cinco fueron importadas, proviniendo de los países China, Argentina y EEUU. La discriminación respecto a los marcadores moleculares para OGM detectados se discuten en párrafos siguientes.

Tabla 3. Estudio según el país de origen de las muestras positivas para OGM.

Muestra	Tipo de muestra	p-35S	t-Nos	FMV	bar	País de origen
727	Copos de maíz	+	+	+	-	Argentina
736	Granola de coco y miel	+	+	+	-	Argentina
737	Salsa con sabor a ostras	+	+	+	-	China
759	Producto para copetín	+	-	-	+	Uruguay
761	Mezcla par preparar filetes de soja	+	-	+	-	Uruguay
771	Surtido de semillas	+	+	+	-	Uruguay
775	Harina de maíz amarillo	+	+	+	-	EEUU
798	Harina de maíz blanco	+	+	+	-	EEUU

En la figura 7 a y b se representa el estudio de la presencia de al menos una secuencia ensayadas para el *screening* de OGM discriminando en dos extractos, en la gráfica a de un total de 26 muestras de origen nacional, tres muestras dieron positivo para dicho *screening* y en la gráfica b de un total de 76 muestras analizadas de origen importado, cinco dieron positivo para al menos una de las secuencias ensayadas para *screening* de OGM).

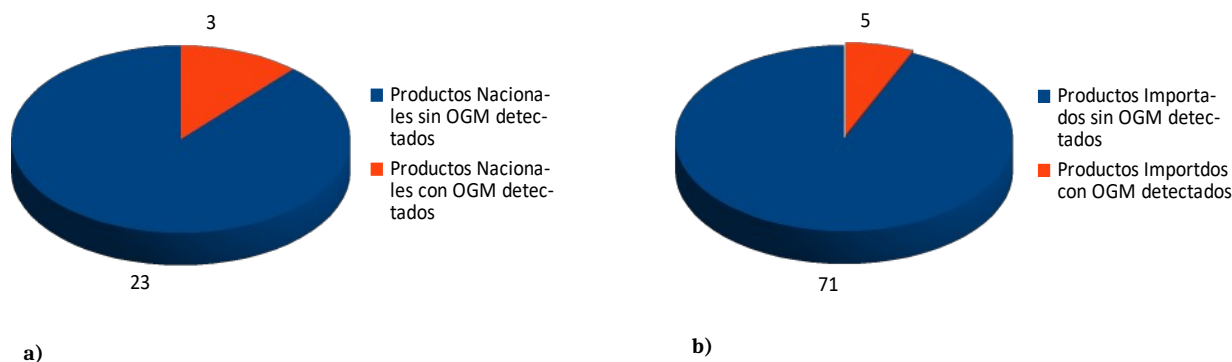


Figura 7. a) izquierda. Representación del número de muestras nacionales con presencia de al menos una de las secuencias ensayadas para el *screening* de OGM en comparación con las muestras nacionales en las cuales no se detectó la presencia de las secuencias de OGM ensayadas. **b) derecha.** Representación del número de muestras importadas con presencia de al menos una de las secuencias ensayadas para el *screening* de OGM en comparación con las importadas en las cuales no se detectó la presencia de las secuencias de OGM ensayadas.

En la tabla 4, figura 8 se presenta una discriminación del total de muestras en las que se pudo extraer ADN (n=99) de acuerdo a si contenían maíz, soja ó ambos ingredientes. Del total de 99 muestras, 36 contenían sólo maíz (36.4 %), 41 muestras contenían solo soja (41.4 %) y 22 muestras declaraban dentro de sus listas de ingrediente ambas especies vegetales, lo que representa el 22.2 % del total de las muestras analizadas. De las 36 muestras que contenían maíz, solo tres resultaron positivas al *screening* de secuencias GM, mientras que 33 no fueron positivas a las secuencias GM ensayadas. De las 41 muestras que contenían soja, solo una resultó positiva al *screening* de secuencias ensayadas para la presencia de GM, en tanto 40 no fueron positivas al *screening* de secuencias ensayadas. De las 22 muestra que contenían maíz y soja entre sus ingredientes declarados, cuatro resultaron positivas a presencia de OGM mientras que 18 resultaron negativas.

Al discriminar según el tipo de alimento, procesado o ultraprocesado, se observa que 17 son procesadas, o sea el 17.2 % del total de muestras analizadas y 82 son ultraprocesados, representando el 82.8 %. Dentro de las muestras procesadas se detectaron cuatro positivas para la presencia de OGM, lo que representa el 4.0 % del total de muestras analizadas. De las 82 muestras ultraprocesadas analizadas, se encontraron cuatro muestras positivas a OGM lo que representa el 4.0 % del total de muestras analizadas para la presencia de OGM. Esto muestra el mismo porcentaje de muestras positiva a alguna de las secuencias ensayadas para presencia de OGM tanto para alimentos procesados como para alimentos ultraprocesados.

Del análisis por tipo de alimento, dentro de los procesados se encontró presencia de OGM en el 50 % de las harinas (dos de las cuatro analizadas), y en el 40 % de las granolas (dos de las cinco analizadas). En el caso de los alimentos ultraprocesados los casos positivos a presencia de OGM fueron el 11,1 % de los polvos (un positivo de los nueve analizados), mientras que el 4,8 % de las salsas analizadas fueron positivas (una de las 21 analizadas), el 20 % de los snack analizados presentaron secuencias GM (uno de cinco analizados) y el 25 % de los cereales (uno de cuatro) presentó resultado positivo para el *screening* de OGM.

Tabla 4. Resultados de las muestras analizadas discriminadas según el tipo de alimento, presencia sólo maíz y/o sus derivados, sólo soja y/o sus derivados, o ambos, y según fuera un alimento procesado ó ultraprocesado.

TIPO DE ALIMENTO	N.º MUESTRAS	NO GM		GM	
		Nº	%	Nº	%
Sólo con derivado de maíz	36	33	91.7	3	8.3
Sólo con derivado de soja	41	37	90.2	1	2.4
Con derivado de soja y de maíz	22	18	81.8	4	18.2
PROCESADOS	17	13	76.5	4	23.5
Granos	3	3	100	0	0
Harinas	4	2	50	2	50
Almidones	2	2	100	0	0
Azúcar impalpable	1	1	100	0	0
Granolas	5	3	60	2	40
Aceites	2	2	100	0	0
ULTRAPROCESADOS	82	78	95.1	4	4.9
Dulces	4	4	100	0	0
Polvo para preparar	9	8	88.9	1	11.1
Salsas	21	20	95.2	1	4.8
Panificados	35	35	100	0	0
Snacks	5	4	80	1	20
Cereales	4	3	75	1	25
Pastas	2	2	100	0	0
Paté y puré	2	2	100	0	0
TOTALES	99	91	91.9 %	8	8.1 %

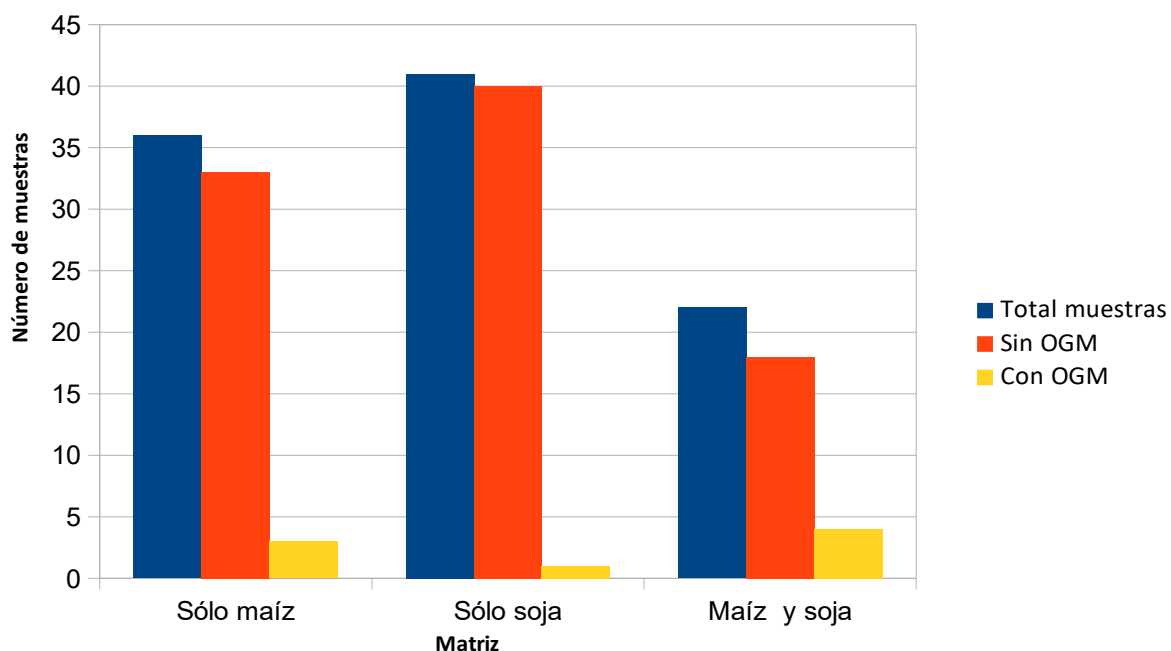
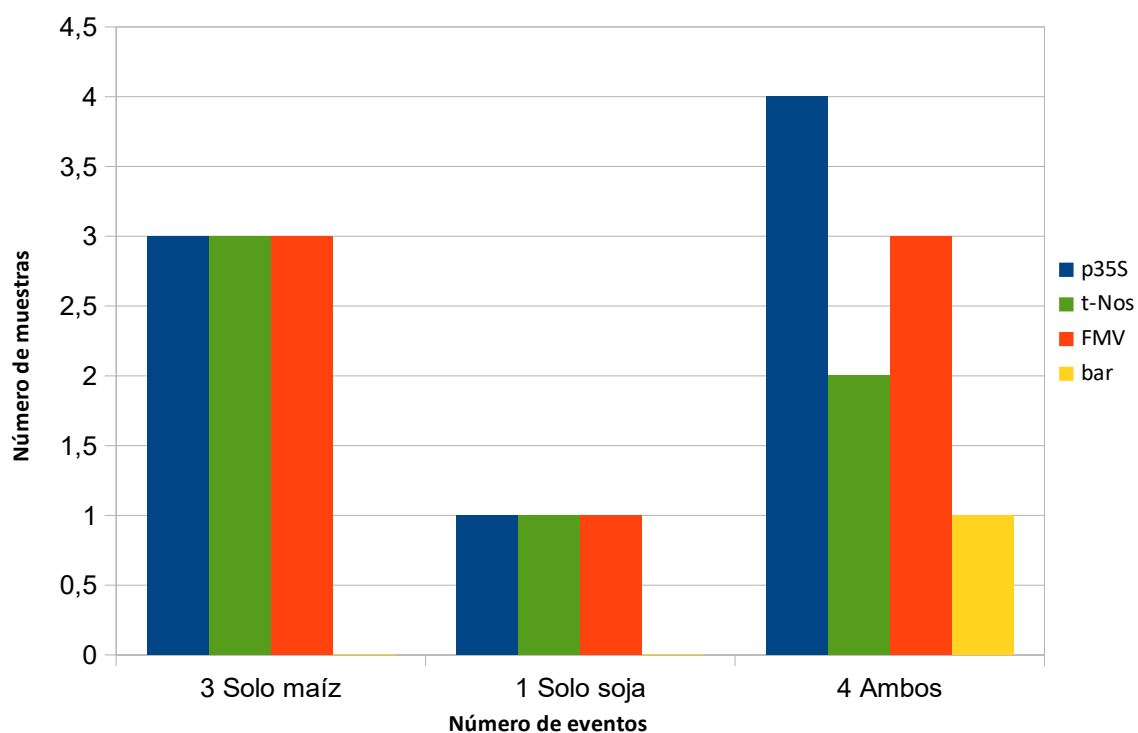


Figura 8. Representación discriminando por matriz de los resultados de *screening* para presencia de OGM.

En la tabla 5, figura 9, se analizan las secuencias detectadas, el p-35S se detectó en las 8 muestras positivas a screening (100 % respecto a las positivas), t-Nos se encontró en 6 de ellas (75 %), FMV en 7 (87.5 %), mientras que bar sólo en 1 muestra (12.5 %), la cual corresponde a un alimento ultraprocesado y de origen nacional, lo que lleva a pensar que la secuencia bar es la menos frecuente, y que la del promotor 35S al estar presente en todas las muestras analizadas sería la más frecuente en los alimentos que circulan en Montevideo, esto está directamente relacionado con los eventos autorizados en nuestro país (GNbio, 2023). No se observaron diferencia respecto a los marcadores moleculares detectados en relación al ingrediente ya que tanto en las muestras que contenían maíz ó soja se detectaron las mismas tres secuencias: p35S, t-Nos y FMV.

Tabla 5. Resultados de las secuencias detectadas, matriz y procesamiento del producto.

TIPO DE ALIMENTO	N.º GM	P35S		T-NOS		FMV		BAR	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sólo con derivado de maíz	3	3	100	3	100	3	100	0	0
Sólo con derivado de soja	1	1	100	1	100	1	100	0	0
Con derivados de soja y de maíz	4	4	100	2	50	3	75	1	25
Procesados	4	4	100	3	75	3	75	0	0
Ultraprocesados	4	4	100	3	75	4	100	1	25
Totales	8	8	100 %	6	75 %	7	87.5 %	1	25 %


Figura 9. Presencia de las secuencias de detección de OGM discriminando por ingrediente.

4.2- Comparación con resultados de estudios anteriores

Si comparamos el porcentaje de productos positivos para el *screening* de OGM de este trabajo, con los resultados obtenidos por el laboratorio entre los años 2015 y 2018, (ver anexo III), (Arleo, M., et al. 2020), desde que se implementó el decreto, se observa un descenso de 28.6 %, de los productos no etiquetados que presentan OGM, ya que se pasó de 36,9 % en 2018 a 8,3 % en el 2023. Si bien el número de muestras no es el mismo (206 vs 102 en 2023) y eso dificulta un análisis estadístico preciso, las diferencias en los porcentajes observados son tan grandes que se puede afirmar que las mismas son significativas. Al comparar los alimentos procesados se observa que en el 2018 el 41.7 % mostró presencia de OGM y en el 2023 el porcentaje fué del 23.5 %, pero no se observaron diferencias significativas entre estos grupos ($p=0,2667$). En el caso de los alimentos ultraprocesados se produce una disminución importante de la presencia de OGM, desde el 34.3 % al 4.9 %, dicho descenso es del 29.4 % (ver figura 10), evidenciándose en este caso diferencias significativas en los conjuntos de datos ($p=0,0001$). (ver anexo IV). De los que presentan maíz y/o sus derivados pasamos de 29.7 % al 8.1 %, correspondiendo al 21.6 % de descenso y para los que contienen soja y/o sus derivados pasamos de 48.7 % al 9.8 % equivalente a 38.9 % menos. El mayor descenso se observó en los alimentos ultraprocesados y los que contienen soja y sus derivados.

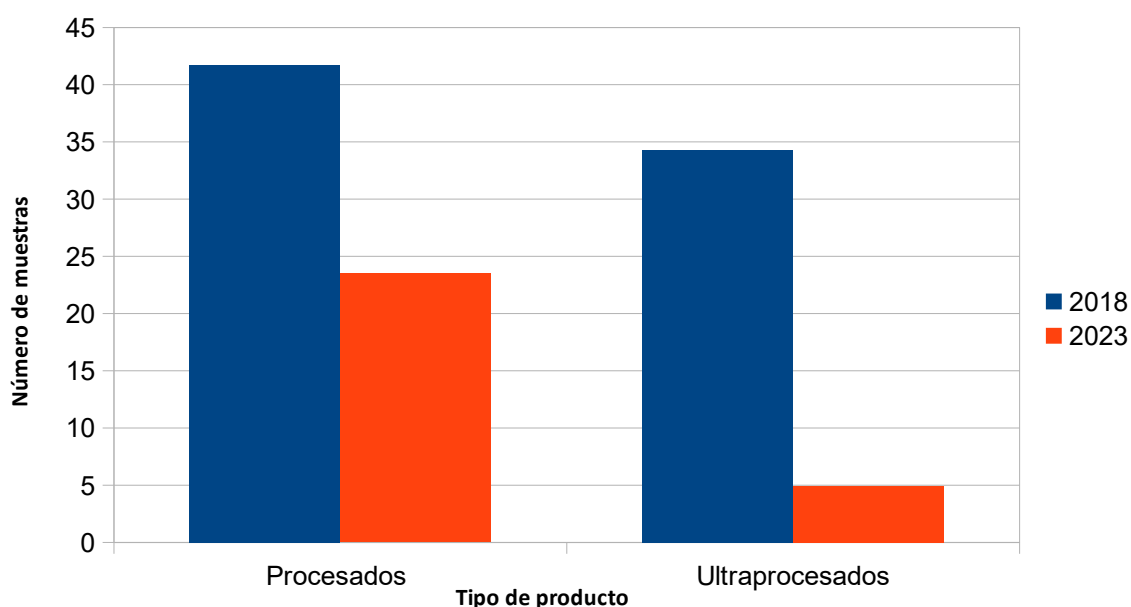


Figura 10. Gráfico de comparación entre los resultados del 2018 y los del 2023, donde se aprecia el descenso de presencia de OGM.⁴

4.3- Resultados de detección de evento específico.

Según los resultados obtenidos para la detección de los eventos específicos MON810, Bt11, NK603 y TC1507 (tabla 6), se puede observar que en el caso de las muestras 727 (copos de maíz) y 775 (harina de maíz), se trata de una mezcla de semillas ó de eventos apilados, ya que según el International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), no se ha desarrollado un evento MON810 x Bt11. De tratarse de un evento apilado, el mismo no estaría autorizado en Uruguay por el Gabinete Nacional de Bioseguridad. Dado que ambas muestras son importadas y no podemos establecer su trazabilidad, ni saber si estamos ante un evento apilado o una mezcla de semillas, en este caso no se procedió a la notificación al Gabinete Nacional. En el caso de la muestra 736 se detecta la presencia de MON810, evento autorizado en Uruguay desde 2003, GNBio, 2023. En los casos de las muestras 737, 761 y 771 no son detectados ninguno de los eventos ensayados. Para el caso de la muestra 759 se detecta presencia del evento Bt11, evento autorizado en Uruguay desde 2004, GNBio, 2023. En el caso de la muestra 798 se detectaron los cuatro eventos estudiados, se trata de una muestra importada de Estados Unidos, por lo que no es posible realizar su trazabilidad, entonces puede deberse a eventos apilados así como resultado de que en la producción de este producto se hayan mezclado semillas de distinto origen. En cuanto a eventos autorizados en Uruguay están Bt11 (autorizado desde 2004 en Uruguay) y por otro lado MON810 x TC1507 x NK603 (autorizado desde 2017 en nuestro país).

Tabla 6. Resultados obtenidos para la detección de los eventos específicos MON810, BT11, NK603 y TC1507 utilizando los primers proporcionados por el *JRC GMO-Amplicons* y siguiendo la puesta a punto realizada por el laboratorio LATRAMA, de los métodos *GMOMETHODS*, diseñados por *The European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EU-RL GMFF)*, utilizando *Real Time PCR SYBR® Green*.

EVENTO	727	736	737	759	761	771	775	798	C (+)	C (-)
	Copos de maíz	Granola de coco y maíz	Salsa con sabor a ostras	Producto de copetín	Mezcla para preparar filetes de soja	Surtido de semillas	Harina de maíz amarillo	Harina de maíz blanco		
MON810	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
BT11	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
NK603	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
TC1507	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

5- Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el método utilizado para la extracción de ADN fue eficaz, ya que se pudo extraer ADN amplificable de 99 de 102 muestras procesadas. Solo en tres casos no se logró la extracción de ADN.

Se observa un bajo número de alimentos positivos para la presencia de OGM, representando el 8.1 % del total de muestras que se les extrajo ADN.

El presente trabajo muestra un marcado descenso de alimentos que contenían OGM y no están etiquetados, en comparación con los resultados anteriores obtenidos por el laboratorio de Bromatología en colaboración con el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de la Facultad de Ciencias, UdelaR (Arleo *et al.*, 2018), lo que podría corresponder a un mayor cumplimiento de la reglamentación departamental vigente. Puede ser que las empresas hayan decidido sustituir los ingredientes transgénicos por otros de origen no transgénico, o que se hayan adecuado a la reglamentación y hayan decidido etiquetar sus productos. Futuros trabajos deberían evaluar estos aspectos.

Dentro de los resultados positivos el 37.5 % de los alimentos correspondieron a productos nacionales (3 de 8) y el 62.5 % a productos importados (5 de 8), pero dado el bajo número de positivos para OGM en las muestras ensayadas, estos resultados no pueden generalizarse.

Se observó que el 23 % de los alimentos procesados fueron positivos para la presencia de secuencias transgénicas (4 en 17 muestras), en tanto el 4.9 % de los alimentos ultraprocesados dieron positivos (4 en 82 muestras ensayadas) lo cual puede deberse a que el ultraprocesamiento del alimento deteriora la calidad del ADN y por tanto no se pueda detectar los marcadores moleculares, o que los mismos provengan de países que no utilizan ingredientes GM.

No se observaron diferencias respecto a los marcadores moleculares detectados en relación al ingrediente ya que tanto en las muestras que contenían maíz ó soja se detectaron las mismas tres secuencias, p35S, t-Nos y FMV.

Los tres marcadores p35S, t-Nos y FMV son buenos marcadores para los eventos circulantes autorizados en nuestro país, no siendo el caso del marcador bar.

Una limitante de los marcadores de OGM utilizados es que no detectan eventos no autorizados, lo que llevaría a una futura perspectiva de trabajo.

La evaluación de eventos específicos determinó que el 43 % de las muestras positivas presentaron eventos apilados o mezclas. Es aquí donde una vez más se observa la importancia de la trazabilidad, pues permitiría saber si el GM corresponde a eventos parentales o apilados y por tanto saber si estos eventos son autorizados o no en nuestro país.

Perspectivas

- Llegar a identificar y cuantificar eventos específicos.
- Evaluar la extracción de ADN en matrices muy complejas.
- Detección de eventos no autorizados en Uruguay.
- Realizar trabajos para analizar las causas del posible descenso del porcentaje de alimentos transgénicos no etiquetados encontrados.

Referencias

- Ahmed, F. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20(5), 215-223.
- Akiyama, H., Sakata, K., Makiyama, D., Nakamura, K. & Teshima, R. 2011. Interlaboratory Study of DNA Extraction from Multiple Ground Samples, Multiplex Real-Time PCR, and Multiplex Qualitative PCR for Individual Kernel Detection System of Genetically Modified Maize, *Journal of AOAC International* Vol. 94, No. 5, páginas 1545-1546.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., van den Eede, G. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organism in agricultural crops and plant derived food products. *European Food Research and Technology* 214, pág. 6.
- Arleo, M. 2015. "Detección y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados en cultivos de maíz y alimentos derivados, mediante análisis molecular", Tesis de maestría, Udelar.
- Arleo, M., Benavente, P., Cardozo, V., Katz, A., Vázquez, S., Da Silva, A., Legnani, M., Martínez, C. 2020. GMO LABELING IN FOOD PRODUCTS IN MONTEVIDEO, URUGUAY. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.17.254243>
- BIO-RAD Laboratories. 2012. Biotechnonology Explorer GMO investigator kit: A quantitative Real Time PCR Extension. Application Note 1-800-4BIORAD (1-800-424- 6723). Disponible en http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/16625_05.pdf
- Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J., Gruden, K. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR--effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol*, 6:37. doi: 10.1186/1472-6750-6-37.
- Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2010. Viviendo en armonía con la naturaleza 2011 - 2020. Decenio de las Naciones Unidas sobre la Biodiversidad, Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica 413, pág 57
- Flores, Y., Herrera, R., Aguilar, C., Carlos, J. & Esquivel, C. 2007. Nuevos métodos para la detección de residuos de organismos genéticamente modificados en alimentos basados en el ADN. *BioTecnología*, Vol. 11, N.º 236 12.
- Galeano, P., Galván, G., Cauci, A., Martínez Debat, C., Oyhançabal, G., Narbondo, I., Barcia, M., Burger, M., Bajsa, N., Evia, V., Bandeira, E., Taroco, L., Rosano, L., Franco Fraguas, L., Toledo, S.. 2014. Informe ampliado "Cultivos transgénicos en Uruguay". CSIC, Art 2 - UdelaR. pág. 21 y 13.

Gasparic, M., Tengs, T., La Paz, J., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T. & Gruden, K. 2010. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2023-2029.

GNBio, (MGAP) – fecha de ascensión 01/11/2023; Página web: <https://www.gub.uy/comunicacion/publicaciones/eventos-autorizados-y-en-proceso-de-analisis> <https://www.gub.uy/bioseguridad/organizacion-institucional-en-bioseguridad-de-ovgms>,.

Griffiths, K., Partis, L., Croan, D., Wang, N. & Emslie, K. 2002. Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food. Australian Government Department of Agriculture Fisheries & Forestry, pág. 66 – 76, página web: <https://www.researchgate.net/publication/242562389>

GUBUY, Sistema Nacional de Bioseguridad (2023) (Página web: <https://www.gub.uy/snb>)

Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., & Pla, M. 2003. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, 323(2), 164-170.

Holst-Jensen, A., Ronning, S., Lovseth, A. & Berdal, K. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375 (8), 985-993.

ISAAA.org., fecha de ascensión 3 de abril de 2023.

ISO/EN/TS 21568, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Sampling strategies

ISO 21569, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods

ISO 21570, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods

ISO 21571, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction

Koch, W. 2004. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(9), 749-761.

Kutyavin, I., Afonina, I. , Mills, A., Gorn, V., Lukhtanov, E., Belousov, E. & Hedgpeth, J. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 28(2), 655-661

Ley 17.250, sobre la Defensa del Consumidor del Poder Legislativo. 2000.

Lie, Y. & Petropoulos, C. 1998. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current opinion in biotechnology*, 9(1), 43-48.

Markoulatos P., Siafakas N., Papathoma A., Nerantzis E., Betzios B., Dourtoglou V. and Moncany, M. 2004. Qualitative and Quantitative Detection of Protein and Genetic Traits in Genetically Modified Food. *Food Reviews International*. Vol. 20, No. 3, pp. 275-296.

Miraglia, M., Berdahl, K. G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E. J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1157-1180.

Norma UNIT ISO/IEC 17025:2005

Novak PK, Gruden K, Morisset D, Lavrac N, Stebih D, Rotter A, Zel J. GMOtrack: generator of cost-effective GMO testing strategies. *J AOAC Int.* 2009 Nov-Dec;92(6):1739-46. PMID: 20166592.

OMS. 2005. Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado. Departamento de inocuidad de los alimentos. Departamento de Inocuidad Alimentaria, Zoonosis y Enfermedades transmitidas por los alimentos, pág. iii, ISBN 92 4 159305 9, clasificación (NLM: WA 695).

Parlamento Europeo, Consejo de la Unión Europea, 22 de setiembre de 2003 . Reglamento de Unión Europea 1829/2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, publicado el 18 /10/2023, Diario Oficial de la Unión Europea, pág 2.

Seguridad Alimentaria y Nutricional, Conceptos Básicos 3ra Edición. 2011. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria - PESA - Centroamérica Proyecto Food Facility Honduras, Pág, 4.

Van Duijn, G., van Biert, R., Bleeker-Marcelis, H., van Boeijen, I., Jama Adán, A., Jhakrie, S., Hessing, M. 2002. Detection of Genetically Modified Organisms in Foods by Protein- and DNA-Based Techniques: Bridging the Methods. *Revista de AOAC INTERNACIONAL*, 85 (3), 787–791. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.3.787>

Wiseman, G. 2002. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *Journal of AOAC International*, 85(3), 792-796.

ANEXO I

Lista de Eventos autorizados y en proceso de análisis, Sitio oficial de la República Oriental del Uruguay, fecha de ascensión del 1/11/2023, aparecen con la denominación: "Comercial".



Especie/Evento	Uso solicitado	Año ingreso	Año Autorizado/ Etapa
Soja 40-3-2	Comercial	1995	1996
Soja A2704-12 (LL)	Comercial	2010	2012
Soja A5547-127 (LL)	Comercial	2011	2012
Soja MON89788XMON87701 (RR2YBt)	Comercial	2011	2012
Soja BPS-CV127-9	Comercial	2011	2014
Soja DAS44406-6	Comercial	2012	2017
Soja MON89788XMON87708	Comercial	2013	2017
Soja FG72	Comercial	2014	2020
Soja FG72XA5547-127	Comercial	2015	2020
Soja MON89788	Comercial	2019	2020
Soja MON87701	Comercial	2019	2020
Soja MON87708	Comercial	2019	2020
Soja MON89788XMON87701XMON87708X MON87751	Comercial	2016	2021
Soja MON89788XMON87708XA5547- 127	Comercial	2017	2021
Soja MON87751	Comercial	2021	2021
Soja SYHT0H2	Comercial	2017	2022
Soja DAS44406-6XDAS81419-2	Comercial	2015	2022
Soja DBN-09004-6	Comercial	2018	Etapas 2
Soja HB4-PAT	Comercial	2019	Etapas 2

Soja HB4-PATXRR	Comercial	2019	Etapas 2
Soja GMB151	Comercial	2019	Etapas 3
Soja DBN08002-3	Comercial	2021	Etapas 2
Soja DBN09004-6XDBN08002-3	Comercial	2021	Etapas 2
Soja DAS81419-2	Comercial	2023	Etapas 3
Maíz MON810	Comercial	2001	2003
Maíz BT11	Comercial	2002	2004
Maíz GA21	Comercial	2009	2011
Maíz GA21XBT11	Comercial	2009	2011
Maíz TC1507	Comercial	2009	2011
Maíz NK603	Comercial	2010	2011
Maíz MON810XNK603	Comercial	2010	2011
Maíz TC1507XNK603	Comercial	2012	2012
Maíz BT11XMIR162XGA21 (*) MIR162 BT11XMIR162 MIR162XGA21	Comercial	2009	2012
Maíz MON89034XTC1507XNK603 (*) MON89034 MON89034XTC1507 MON89034XNK603	Comercial	2012	2012
Maíz dulce	Comercial	2011	2012
Maíz MON89034XM0N88017	Comercial	2010	2017
Maíz MON810XTC1507XNK603 (*)	Comercial	2014	2017
Maíz BT11XMIR162XMIR604XGA21 (*)	Comercial	2012	Retirado (2019)

Maíz MON89034XTC1507XNK603XDAS40278-9 (*)	Comercial	2013	2020
Maíz T25	Comercial	2014	2020
Maíz MZHGOJG (BT11XGA21)	Comercial	2017	Retirado (2021)
Maíz MON89034XTC1507XNK603XMIR162 (*)	Comercial	2016	2021
Maíz MON89034XTC1507XNK603XMIR162X DAS40278-9 (*)	Comercial	2018	2021
Maíz BT11XMIR162XGA21XMON89034 (*)	Comercial	2017	2021
Maíz MON87427XMON89034XMON810XMIR 162X MON87411XMON87419 (*)	Comercial	2018	2021
Maíz MON87427XMON87419XNK603 (*)	Comercial	2019	2021
Maíz MON87427XMON89034XMIR162XNK603 (*)	Comercial	2020	2021
Maíz NK603XT25XDAS40278-9 (*)	Comercial	2020	2021
Maíz 3272XBT11XMIR162XGA21(*)	Comercial	2021	Etapas 2
Maíz MON95379-3	Comercial	2021	Etapas 2
Maíz DP2022216-6	Comercial	2022	Etapas 2
Maíz BT11XMIR162XNK603 (*)	Comercial	2023	Etapas 3
Maíz DP910521-2	Comercial	2023	Etapas 2
Maíz DAS01131-1	Comercial	2023	Etapas 2

Trigo HB4-PAT	Comercial	2015/2017	Proceso detenido
Algodón GHB614XT304-40XGHB119XCOT102 (GLTP) (*) GHB614 T304-40 GHB119 GHB614XT304-40 GHB614XGHB119 GHB614XCOT102 GHB614XT304-40XCOT102 GHB614XT304-40XGHB119 GHB614XGHB119XCOT102 T304-40XGHB119 T304-40XCOT102 T304-40XGHB119XCOT102 GHB119XCOT102	Comercial	2018	Etapas 2
Algodón GHB811 (BCS-GH811-4)	Comercial	2019	Etapas 3
Algodón T304- 40XGHB119XGHB811XCOT102 (GLTIP)	Comercial	2022	Etapas 2
Algodón COT102	Comercial	2023	Etapas 2
Soja MON89788 (RR2Y)	Semilla Exportación	2009	2009
Soja A2704-12 (LL)	Semilla Exportación	2009	2009
Soja MON89788XMON87701 (RR2YBt)	Semilla Exportación	2010	2010
Soja A5547-127	Semilla Exportación	2011	2011
Soja MON89788XMON87708	Semilla Exportación	2012	2012
Soja DAS44406-6	Semilla Exportación	2013	2014
Soja MON89788XDAS68416-4	Semilla Exportación	2013	2014

ANEXO II

Tabla de concentración de ADN extraído

N.º de la muestra	Concentración (µg/mL)
720	0.07
721	2.74
722	Too light
723	0.013
724	0.027
725	0.58
726	9.50
727	1.13
728	Too light
729	0.10
730	7.86
731	1.75
732	0.29
733	0.242
734	0.03
735	7.48
736	6.02
737	0.0132
738	5.62
739	0.0712
740	7.49
741	0.0456
742	2.72
743	0.36
744	2.50
745	4.58
746	0.45
747	0.05 / 0.054
748	0.17
749	4.40
750	0.03
751	0.05 / 0.088
752	0.06 / 1.05
753	3.52
754	4.48
755	1.42 / 0.081
756	3.26
757	3.66
758	2.82
759	3.54
760	0.24
761	4.40
762	3.52
763	763
764	5.26
765	4.86
766	0.334
767	0.0368 / 0.07
768	0.348
769	0.191
770	5.38
771	5.50
772	3.48
773	3.82
774	6.8
775	5.6
776	5.4
777	6.9
778	Muy bajo
779	2.6
780	0.21
781	0.0676
782	0.032 / 0.05
783	6.32
784	4.98
785	0.12

786	0.163
787	6.96
788	3.86
789	6.1
790	5.02
791	0.07
792	1.09
793	0.069
794	0.029
795	0.57
796	5.94
797	3.50
798	7.46
799	0.75
800	1.53
801	0.99
802	3.84
803	8.16
804	8.40
805	0.036
806	0.033
807	1.82
808	4.02
809	4.92
810	6.2
811	0.622
812	2.46
813	4.04
814	0.21
815	0.022
816	0.21
817	Too low
818	4.46
819	2.68
820	4.34
821	0.714
822	6.22

ANEXO III.

Tablas extraídas del trabajo *GMO LABELING IN FOOD PRODUCTS IN MONTEVIDEO, URUGUAY*, Arleo, M. *et al.*, 2018.

Table 4. Result of the search for transgenic sequences in foods made with ingredients derived from corn or soybeans. "GM": positive samples for the presence of transgenic sequences. "p35S": presence of promoter sequence *CaMV35S*. "t-NOS": presence of terminator sequence *nos*. "FMV": presence of promoter sequence *FMV*. "bar": presence of *bar* gene sequence. "NA": not assayed.

Alimentos	GM	p35S	t-NOS	FMV	bar
Corn	38	38 (100%)	37 (97.4%)	14 (36.8%)	0 (0.0%)
Soybean	38	38 (100%)	35 (92.1%)	25 (65.8%)	NA NA
Processed	30	30 (100%)	29 (96.6%)	11 (36.7%)	0 (0.0%)
Ultra- processed	46	46 (100%)	43 (93.5%)	28 (60.9%)	0 (0.0%)
TOTAL	76	76 (100%)	72 (94.7%)	39 (51.3%)	0 (0.0%)

Table 3 . Result of the analysis of transgenic sequences searching in foods made with ingredients derived from corn or soybeans. "GM": positive samples for the presence of transgenic sequences. "Non-GM": negative samples for the presence of transgenic sequences. "> 1 %": content of GM material greater than 1 %. "<1 %": content of GM material less than 1 %.

Alimentos	n	GM	non-GM	>1%	<1%
Corn derived	128	38 (29,7%)	90 (70,3%)	32 (84,2%)	6 (15,8%)
Soybean derived	78	38 (48,7%)	40 (51,3%)	34 (89,5%)	4 (10,5%)
Processed	72	30 (41,7%)	42 (58,3%)	26 (86,7%)	4 (13,3%)
Grains	39	3 (7,7%)	36 (92,3%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)
Flours	17	13 (76,5%)	4 (23,5%)	12 (92,3%)	1 (7,7%)
Starches	6	6 (100%)	0 (0,0%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)
Vegetal proteins	10	8 (80,0%)	2 (20,0%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)
Ultra-processed	134	46 (34,3%)	88 (65,7%)	40 (86,9%)	6 (13,0%)
Cookies	41	13 (31,7%)	28 (68,3%)	13 (100%)	0 (0,0%)
Copetin products	27	13 (48,1%)	14 (51,9%)	10 (76,9%)	3 (23,1%)
"Chacinados"	23	14 (60,9%)	9 (39,1%)	12 (85,7%)	2 (14,3%)
Cereals	22	4 (18,2%)	18 (81,8%)	3 (75,0%)	1 (25,0%)
Sauces and juices	13	2 (15,4%)	11 (84,6%)	2 (100%)	0 (0,0%)
Dry pasta	8	0 (0,0%)	8 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
TOTAL	206	76 (36,9%)	130 (63,1%)	66 (86,8%)	10 (13,1%)

ANEXO IV.

Tabla de los resultados estadísticos utilizando la prueba exacta de Fisher.

Matriz comparada	Variable 1	Variable 2	p	Diferencia significativa
Maíz vs soja	NO GM	GM	0,351 1	NO
Procesado vs ultraprocesado	NO GM	GM	0,027 8	SI
GM 2018 vs GM 2023	Total de procesado	Total de ultraprocesado	0,709 2	NO
Procesados 2018 vs 2023	NO GM	GM	0,266 7	NO
Ultraprocesados 2018 vs 2023	NO GM	GM	0,000 1	Extremada