Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos

Propuesta de procedimientos y parámetros cuantificables para evaluación de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) de alimentos procesados de consumo diario

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR

Elizabeth Alessandra IBERICO ROBLES

ASESOR

Oscar ACOSTA CONCHUCOS

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Iberico E. Propuesta de procedimientos y parámetros cuantificables para evaluación de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) de alimentos procesados de consumo diario [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos; 2018.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Propuesta de procedimientos y parámetros cuantificables para evaluación de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) de alimentos procesados de consumo diario"

Que presenta la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos:

ELIZABETH ALESSANDRA IBERICO ROBLES

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Sobresaliente (17)

en conformidad con el Art. 34.° del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Título Profesional de Licenciado (a) en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 15 de marzo de 2018.

Mg. Mirtha Roque Alcarraz
Presidente

Q.F. Robert Dante Almonacid Román
Miembro

Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar
Miembro

Ing. Danny Domínguez Del Águila
Miembro

SINEACE
SISTEMA NACIONAL DE EVALUACIÓN, ACREDITACIÓN Y CERTIFICACIÓN DE LA CALIDAD EDUCATIVA

ISO 9001
BUREAU VERITAS Certification
Nº BR233265

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a mis abuelos José Luis Villacorta Robles y María Magdalena Razuri Zalazar por enseñarme que uno puede alcanzar cualquier sueño "*Nada es suficientemente difícil para considerarlo imposible"*.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos** y a mi Escuela Profesional de **Ciencia de los Alimentos**, por las experiencias brindadas tanto a nivel profesional como de la vida permitiendo una formación completa.

A mi asesor de tesis, **Oscar Acosta Conchucos**, por brindarme en cada momento una gran inspiración e instruirme con gran paciencia en el campo de la biotecnología molecular.

A **Fernando Quevedo Ganoza**, por su valiosa amistad e inspiración en el campo profesional de la carrera rompiendo todo paradigma de lo usual.

A **Crisólogo Cáceres Valle** y **Julissa Manrique Mancilla** por sus grandes enseñanzas y apoyo incondicional en el desarrollo de la tesis y crecimiento personal.

Al **Departamento de Bromatología** y **Microbiología** en especial a Gladys Arias Arroyo y Nelson Bautista, por motivarme a investigar y agregar el ítem de innovación a cada idea planteada.

Al **Departamento de Bioquímica** por su apoyo en el desarrollo experimental de la tesis.

A mis incondicionales amigos por los momentos compartidos y por enseñarnos mutuamente que la causa es más importante que el interés personal. Especialmente a Corina Berrocal, Stephy Saavedra, Michael Bracamonte, Zorys Jiménez, Cindy Sevilla, Milagros Bravo y Alan Hernández por su invalorable amistad.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Asimismo, fue financiado con el apoyo del Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Código N° 160403067)

ÍNDICE GENERAL

1 RESUMEN 1

2 ABSTRACT 2

3 INTRODUCCIÓN 3

3.1 Objetivos 8

4 MARCO TEORICO 9

4.1 Antecedentes 9

4.2 Seguridad Alimentaria 14

4.3 Análisis de riesgos 16

4.4 Evaluación de riesgos biotecnológicos 17

4.5 Ingeniería Genética 18

4.6 Ácido Desoxirribonucleico (ADN) 18

4.7 Extracción de ADN 19

4.8 Electroforesis en gel de agarosa 20

4.9 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) 22

4.10 Organismos vivos modificados (OVM) 24

4.11 Organismo genéticamente modificado (OGM) 24

4.12 Producción de OGM 25

4.13 Análisis cualitativo de OGM 26

4.14 Promotor 35S CaMV y Terminador *nos* 27

4.15 Soja Roundup Ready (GTS 40-2-2) 27

4.16 Maíz MON 810 28

4.17 Sistemas de abastecimiento y distribución de alimentos (SADA) 29

4.18 Clasificación de alimentos 30

4.19 Alimentos de consumo masivo 33

4.20 Embutidos: Salchichas tipo Hot Dog 34

4.21 Lote de producción 35

4.22 Tipos de muestreo 36

5 MATERIALES Y MÉTODOS 37

5.1 Diseño de procedimientos para evaluación OGM 38

5.2 Desarrollo de piloto para evaluación de OGM 39

5.3 Análisis fisicoquímico 43

5.4 Análisis moleculares 44

6 RESULTADOS 48

6.1 Propuesta de procedimiento de evaluación 48

6.2 Piloto del procedimiento propuesto: Hot Dog 51

6.3 Análisis fisicoquímico 55

6.4 Extracción de ADN 56

6.5 Identificación de Promotor 35S CaMV y Terminador *nos* 58

6.6 Parámetros de evaluación 63

7 DISCUSIÓN 65

8 CONCLUSIONES 76

9 RECOMENDACIONES 77

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 78

11 ANEXOS 93

11.1 ANEXO N° 1: Propuesta de procedimientos para evaluación de OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados de consumo masivo 94

11.2 ANEXO N° 2.- Registro de toma de muestra 119

11.3 ANEXO N° 3.- Procedimiento de extracción de ADN N°1 121

11.4 ANEXO N° 4.- Procedimiento de extracción de ADN N°2 124

11.5 ANEXO N° 5.- Procedimiento de separación e identificación de ADN. 126

11.6 ANEXO N° 6.- Procedimiento de detección cualitativa de ADN transgénico 128

11.7 ANEXO N° 7.- Lista de ingredientes de muestras 130

11.8 ANEXO N° 7.- Lista de ingredientes de productos internacionales tipo Hot Dog 132

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Concentración recomendada de porcentaje (%) del gel de agarosa para separar moléculas de ADN lineales. 22

Tabla 2.- Composición bromatológica de un Hot Dog por cada 100g. 35

Tabla 3.- Secuencia seleccionadas de los cebadores para el Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos* 47

Tabla 4.- Parámetros propuestos para el análisis del impacto de la presencia de OGM en alimentos procesados y ultra-procesados respecto a la seguridad alimentaria nacional. 49

Tabla 5.- Distritos con mayor población en la región de Lima Metropolitana 52

Tabla 6.- Unidades experimentales expendidas en diferentes supermercados ubicados en el distrito de San Juan de Lurigancho en el mes de junio de 2017. 53

Tabla 7.- Evaluación de pH en muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo 55

Tabla 8.- Condiciones de PCR utilizadas para la detección del Promotor 35S CaMV y Terminador *nos* 59

Tabla 9.- Solución maestra para PCR del Promotor 35S CaMV y Terminador *nos* para un total de 25µl. 60

Tabla 10.- Resultados de la identificación de presencia de OGM en muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo en junio de 2017 62

Tabla 11.- Parámetros para evaluar el impacto en la seguridad alimentaria de la comercialización de salchichas tipo Hot Dog de pollo en la región de Lima Metropolitana en junio 2017 63

Tabla 12.- Parámetros propuestos para el análisis del impacto de la presencia de OGM en alimentos procesados y ultra-procesados respecto a la seguridad alimentaria nacional. 96

Tabla 13.- Datos de muestreo de leche evaporada comercialidad en lima metropolitana en enero de 2017 98

Tabla 14.- Parámetros para evaluar el impacto en la seguridad alimentaria de la comercialización de salchichas tipo Hot Dog de pollo en la región de Lima Metropolitana en junio 2017 99

Tabla 15.- Parámetros para identificación cualitativa y cuantitativa de OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados 101

Tabla 16.- Categorías según tamaño poblacional (*) 104

Tabla 17.- Frecuencia anual de muestreo de alimentos procesados o ultra-procesados 105

Tabla 18.- Descripción de la ecuación para selección de tamaño de muestra. 111

Tabla 19.- Preservación de las muestras según categoría de alimento 115

Tabla 20.- Concentraciones en gel de agarosa según primer utilizado para la detección cualitativa de OGM en alimentos 127

Tabla 21.- Ingredientes de las muestras objeto de estudio de la categoría salchichas tipo Hot Dog de pollo 131

Tabla 22.- Ingredientes de productos tipo salchichas tipo Hot Dog de pollo comercializados en los países de San Salvador y Panamá 133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Identificación del cebador para la detección de maíz GM por PCR, 2005. (57).....27

Figura 2.- Representación esquemática del casete del gen de soja Roundup Ready, 1995. (48)...28

Figura 3.- Representación esquemática de la construcción genética cryIA (b) del plásmido pv-zmbk07 utilizado en la transformación de MON810. (48) 29

Figura 4.- Producción de alimentos a nivel nacional entre los años 2000 y 2013. (64).....33

Figura 5.- Producción vs consumo de Hot Dog y jamonada entre los años 1998 y 2007. (64) 33

Figura 6.- Consumo de alimentos a nivel nacional entre 1998 y 2007. (64) 34

Figura 7.- Procedimiento del estudio para la propuesta de evaluación de OGM en alimentos procesados o ultra-procesados.....37

Figura 8.- Procedimiento para la recolección, transporte y almacenamiento de la muestra. 43

Figura 9.- Proceso de acondicionamiento de la muestra “salchichas tipo Hot Dog de pollo". 55

Figura 10.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% para extracción de ADN con los Kit I y II de las muestras de Salchichas tipo Hot Dog de pollo (A03 y A06) a los 35min.....56

Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para extracción de ADN de las muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo almacenadas en cloroformo por 21 días en diferentes pesos iniciales a los 35 min. 57

Figura 12.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para extracción de ADN de muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo almacenadas en cloroformo durante 21 días a los 35 min. 58

Figura 13.- Promotor 35S CaMV: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de muestra A03 a los 25 min.....59

Figura 14.- Promotor 35S CaMV: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo a los 30 min. 60

Figura 15.- Terminador *nos*: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo a los 35 min. 61

Figura 16.- Terminador *nos*: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo a los 30 min. 62

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

EPSPS: Enzima 5 – enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GM: Genéticamente modificado

MgCl2: Cloruro de Magnesio

OGM: Organismo Genéticamente Modificado

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Naciones Unidas

OVM: Organismo vivos modificado

OPS: Organización Panamericana de la salud

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena polimerasa)

PE35S: Promotor 35S CaMV

T-*nos*: Terminador *nos*

1 RESUMEN

La seguridad alimentaria nacional se puede ver afectada por diversos factores como la disponibilidad, accesibilidad, utilización y estabilidad de los alimentos. En el país existe una falta y/o ambigüedad regulatoria respecto al monitoreo de los alimentos envasados en general, y en particular, aquellos que contienen como ingredientes organismos genéticamente modificados (OGM).

En este contexto, la presente investigación plantea una propuesta de procedimientos y parámetros cuantificables para evaluar como los OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados de consumo diario, impactan en la seguridad alimentaria en el tiempo. Asimismo, se ejecutó una prueba piloto del procedimiento planteado en lo referente al análisis molecular en alimentos embutidos tipo salchichas tipo Hot Dog de pollo.

La propuesta de procedimientos involucra los criterios de selección del muestreo desarrollados en otros países y se adapta a la realidad peruana para futuras situaciones reglamentarias y en el contexto de la seguridad alimentaria. En la parte experimental, se detectó los elementos transgénicos Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos* en un 66,7% de las muestras de estudio (Salchichas tipo Hot Dog de pollo) comercializados en la región de Lima Metropolitana en junio de 2017, indicando la posible presencia de OGM lo cual tiene una alta concordancia (75%) con lo declarado en las etiquetas de los productos.

Palabras claves: Hot Dog, OGM, P35S, Perú, Seguridad Alimentaria, T-*nos*.

2 ABSTRACT

Food security can be affected by many factors such as availability, accessibility, stability and use of food. In Peru exist a legal vacuum that does not monitor packaged foods in general, and especially, those that contain genetically modified organisms (GMO).

In this context, this research aims to develop a proposal of procedures and quantifiable parameters to evaluate how GMO present in processed and/or ultra-processed foods for daily consumption impact on food security over time. Moreover, a pilot of this proposal was carried out with molecular analysis on chicken hot dog.

The proposal of procedures involves the criteria developed in other countries and is adapted to the Peruvian reality for future regulatory situations and in the context of food security. On the experimental part, the identification of the 35S promoter and the terminator *nos* was detected in 66.7% of the study population marketed in Lima in June 2017. That results indicate a possible presence of GMO which has a high agreement (75%) with what was declared on products labels.

Keywords: Food Security, GMO, Hot Dog, P35S CaMV, Peru, T-*nos.*

3 INTRODUCCIÓN

A partir de 1973, gracias a la aparición de técnicas de recombinación in vitro de ADN, la biotecnología alcanza una nueva dimensión: Poder aislar genes específicos de un organismo y transferirlos a otro desarrollando los organismos genéticamente modificados (OGM). Los cuales se caracterizan por tener modificaciones de manera dirigida y controlada añadiendo o eliminando algún gen con capacidad de reproducirse y permitiendo introducir una nueva característica a la variedad en cuestión (1).

Estas características adquiridas se presentan como la solución ante la problemática mundial respecto a la inseguridad alimentaria, por sus grandes beneficios como son: menores costos de producción, mayor rendimiento por hectárea, mejoras en el manejo de cultivo, menor uso de pesticidas y agroquímicos (2). Asimismo, algunos realzan la gran cantidad de sus posibles beneficios a la salud que aportan, en especial bajo el actual panorama en el que mientras un 11%

de la población (815 millones de personas a nivel mundial) sufre de hambre existe un 13% que sufre de obesidad (3). Ejemplo de ello es el caso del arroz dorado al cual se le agregó un evento transgénico que le permitía producir altas cantidades de β- caroteno para prevenir la ceguera en África.

Sin embargo, también existe una fuerte oposición debido a su posible impacto negativo, el cual se basa aparentemente en perjuicios a insectos no dañinos, contaminación a variedades tradicionales por polinización cruzada, desarrollo de alimentos alérgenos, resistencia a antibióticos, entre otros (4). Levy y Módena (5), señalan que el punto débil de estos argumentos es la calidad de la evidencia científica que los sustenta. No obstante, el posible impacto a la economía es un factor a considerar debido a que las semillas transgénicas son desarrolladas por empresas multinacionales, las mismas que las ofertan como patentes. Tal acción aumenta la brecha de desigualdad existente entre las grandes empresas y los pequeños productores.

La globalización, la cual refiere a la liberación del comercio, la apertura de las economías y la integración de los mercados internacionales (6), es una realidad. Es importante detenerse en este punto debido a que el comercio mundial de la agricultura y alimentos procesados ha aumentado la competencia en los mercados internos e internacionales imposibilitando la idea de evitar, en un 100%, la comercialización de semillas, productos modificados genéticamente o aquellos que contienen ingredientes transgénicos.

En este contexto, muchos gobiernos se encuentran en la etapa de desarrollar instrumentos legales y sistemas regulatorios que enfoquen este tema. Sin embargo, existen diferentes formas y propuestas de regulaciones de acuerdo con el entorno cultural y social de los países. Ejemplo de esto son los países de la Unión Europea, Japón, Corea del Sur, Nueva Zelanda y entre otros; en los

cuales el etiquetado de productos transgénicos es obligatorio, pero en cada uno de ellos difiere en el umbral de detección a fin de diferenciar aquellos que fueron contaminados accidentalmente de los que contienen como parte de su formulación alimentos transgénicos. En este sentido el umbral puede variar entre 0.9%, 1%, 3% y 5%.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (7), la mayoría de los países en desarrollo tienen sistemas nacionales de control de alimentos. Sin embargo, muchos de ellos no se pueden adecuar para enfrentar los desarrollos de la ciencia y tecnología de los alimentos.

Por otro lado, para Galperin (2) la declaración en la etiqueta es un sinónimo de culpabilidad reduciendo un importante volumen de venta puesto que los consumidores pueden pensar que dicha declaración implica un riesgo en el producto y por tanto prefieren evitarlo. Además, arguye que implica la elección de un método de detección cualitativo y cuantitativo que debe de ser económico, veloz, preciso; y también, se debe definir un umbral de tolerancia máximo. Sin embargo, lo cierto es que muchas empresas, especialmente aquellas que exportan, ya incluyen la declaración de ingredientes transgénicos, y por lo tanto realizan las acciones mencionadas anteriormente, debido a que otros países si lo exigen.

Se debe considerar que la acción de etiquetar adecuadamente representa una garantía del derecho constitucional del consumidor. El cual es poder elegir productos de acuerdo a sus preferencias y criterio de elección (8), fundamentándose en tres de los derechos fundamentales del consumidor reconocidos a nivel universal que son: a) El derecho de la información; b) Derecho a la salud y seguridad; y c) El derecho a la protección de un medio ambiente saludable (4)

A mediados de 1999, el Congreso de la República emite la Ley N° 27104 - Ley de prevención de riesgos derivados de la biotecnología - reglamentada tres años después por el Decreto Supremo

N°108-2002-PCM. Para el año 2011, se declaró la Moratoria debido a que se consideraba que los productos derivados de la biotecnología moderna, como los transgénicos, aumentaban y que los Organismos Sectoriales Competentes (OSC) no contaban con las capacidades técnicas y de infraestructura que les permitiera regular adecuadamente su uso. (9)

Luego de 19 años, Perú aún no cuenta con procedimientos establecidos que permitan el monitoreo y evaluación de alimentos procesados y/o ultra-procesados con ingredientes OGM generando, debido a la falta de dichos datos, posibles vacíos legales y la falta de un análisis de cómo influye los OGM presentes en productos envasados en los aspectos referentes a la accesibilidad, disponibilidad, uso y estabilidad de los alimentos.

Considerando lo expuesto es necesario generar registros del comportamiento en el mercado de los alimentos con OGM de forma tal que se pueda obtener información valiosa con datos representativos para analizar la situación nacional a lo largo del tiempo, así como es el caso de cualquier otro alimento y no solo considerando como único factor que su consumo signifique un riesgo para la salud de los consumidores o al medio ambiente. Asimismo, esta información permitirá evaluar, con los parámetros propuestos, como estos alimentos productos de la biotecnología moderna influyen en la seguridad alimentaria en el aumento o disminución del rendimiento productivo de alimentos, contenido nutricional, uso de pesticidas, entre otros (10). De esta forma se puede analizar si su uso y/o comercialización podrían tener un rol positivo o negativo en la seguridad alimentaria.

De acuerdo a lo mencionado se concluye que: 1) Existe un vacío legal en Perú para el monitoreo de productos procesados y/o ultra-procesados que contienen derivados de OVM; y, 2) No existen registros que permitan medir el nivel de impacto de la comercialización de dichos productos con

OGM, que actualmente están autorizados, en la seguridad alimentaria nacional. Por tanto, hay una necesidad de generar datos para evaluar una realidad de como los OGM que son usados como ingredientes en los alimentos procesados y/o ultra-procesados pueden afectar los aspectos de accesibilidad, disponibilidad, uso y estabilidad de la seguridad alimentaria a nivel nacional, regional o local.

Es importante señalar que el abordaje de este tema es sumamente complejo debido a que no solo se estudia la detección de OGM en los alimentos sino que se centra en los alimentos procesados y ultra-procesados los cuales tienen matrices alimentarias altamente complejas las cuales dificultan la extracción de ADN y que, además, han pasado por diferentes operaciones unitarias, por lo tanto implican cambios de temperaturas, presión, pH, etc.; así como procesos físicos como homogenizado, corte, gasificación, entre otros. Lo anterior sin considerar sus implicancias para con la seguridad alimentaria y evaluada desde la realidad de nuestro país.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer procedimientos y parámetros cuantificables para evaluación de OGM en alimentos procesados de consumo diario y realizar un ensayo piloto técnico experimental bajo el enfoque de seguridad alimentaria.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una propuesta de procedimientos considerando las etapas de muestreo y análisis moleculares;

2. Establecer parámetros cuantificables para analizar el comportamiento de los OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados en el mercado nacional;

3. Evaluar la propuesta desarrollada en un ensayo piloto en salchichas tipo Hot Dog de pollo comercializados en la región de Lima Metropolitana mediante la detección del Promotor 35S CaMV y del Terminador *nos*.

4 MARCO TEORICO

4.1 ANTECEDENTES

Perú cuenta con la Ley N°27104 - Ley de prevención de riesgos derivados de la Biotecnología (11), la cual fue promulgada en 1999. La misma que en su artículo N° 7 inciso *e)* señala que debe mantenerse un registro de OVM y de sus productos derivados autorizados o rechazados en el ámbito nacional. Cabe indicar que, en su Cuarta Disposición Transitoria, sobre la implementación del registro de los OVM, se indica que se debe mantener un registro de los OVM, sus derivados *y los productos* que lo contengan. Esto significa que el organismo competente deberá de tener un registro de cuantos productos a nivel nacional tienen como parte de sus ingredientes un derivado de OVM.

Sin embargo, en el reglamento aprobado mediante el Decreto Supremo N° 108-2002-PCM (12) en su Título IV: Capítulo II sobre el *registro de OVM y sus productos derivados*, no refiere al mantenimiento de un registro de productos con OVM, como es el caso de alimentos procesados o ultra-procesados que contengan como ingredientes derivados de OVM, sino que hace referencia al registro, autorización o rechazo de OVM o sus derivados.

La Ley N° 29811 (9), ley que establece la moratoria al ingreso y producción de OVM al territorio nacional por un periodo de 10 años, en su artículo N° 3 indica que se excluye su aplicación, entre otros, a los OVM y/o sus derivados para fines de alimentación directa humana y animal o para procesamiento. Esto quiere decir que se puede producir y comercializar a nivel nacional alimentos envasados que contengan ingredientes transgénicos. Por lo tanto, la comercialización de productos procesados y/o ultra-procesados con ingredientes transgénicos es permitido, pero no existe un marco normativo para su regulación.

Posteriormente, el 02 de setiembre de 2010 se publicó en el Diario Oficial El Peruano la Ley 29571 (13)– Código de Protección y Defensa del Consumidor - la cual en su artículo N° 37 sobre el *etiquetado de alimentos genéticamente modificados* señala que "los alimentos que incorporen componentes genéticamente modificados deben indicarlo en sus etiquetas". Lo anterior se vuelve aseverar en su Cuarta Disposición Complementaria Final, en la que señala que dicho artículo junto con el N° 36, referente a las grasas trans, entraban en vigencia a los 180 días calendario de la aprobación de la Ley. De igual manera, dicha iniciativa legislativa en su Tercera Disposición Complementaria Final señala que también en el mismo plazo el poder ejecutivo debería expedir sus disposiciones reglamentarias.

Por lo cual, el etiquetado de productos con ingredientes OGM no es de carácter obligatorio. En efecto si bien este es un derecho innato del consumidor, el de estar informado, su implementación permitiría analizar el comportamiento en el mercado de productos con OGM y su impacto en áreas como el de la seguridad alimentaria. Asimismo, la aprobación del reglamento implica determinar umbrales o límites máximos permitidos de detección que permitan diferenciar la presencia accidental de OGM respecto al uso intencional de transgénicos para la formulación. Es importante mencionar que al 2018 existen varias empresas que reportan la presencia de OGM en la etiqueta de sus productos, sin la necesidad de estar obligados por una ley.

Es importante señalar que entre los años 2011 y 2013 el Comité Técnico de Normalización sobre Bioseguridad de OVM del Perú ha desarrollado un trabajo en la adopción de normas internacional como las ISO adecuándolas como Normas Técnicas Peruanas (NTP) o Guías Peruanas (GP) para la regulación de los OVM en Perú. Su alcance implica: la terminología, requisitos generales, métodos de ensayos, vigilancia de plantas GM, muestreo de plantas GM evaluación de la inocuidad de alimentos obtenidos de plantas GM. En este sentido tenemos once NTP y dos GP. (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26)

Por ejemplo, la Unión Europea (UE) cuenta con el Reglamento (CE) N° 49/2000 (27) el cual reduce de 2% a 1% el umbral respecto a la presencia accidental de OGM por cuanto no están obligados a etiquetar en los empaques. Así pues, la UE reconoce el derecho de los consumidores a la información y al etiquetado como instrumento para elegir conscientemente. Por lo tanto, y en el marco del Reglamento (CE) N° 1830/2003 (28), se considera necesario disponer de métodos cualitativos para identificar la presencia de OGM y de métodos cuantitativos para determinar su cantidad y tomar decisiones referentes a los umbrales. Otro país que adoptó el etiquetado de alimentos transgénicos es Brasil, el cual a partir del 24 de marzo de 2003 mediante el Decreto

Supremo N° 4.680 en su artículo 2° se establece un límite de 1% para la presencia de OGM, en el cual de ser superior deberá de declararlo en la etiqueta del producto (29).

De acuerdo a datos de la FAO, Perú se encuentra entre las tasas de crecimiento más altas de ventas de productos y bebidas ultra-procesados de la región entre el 2000 y 2013 (107%) junto con Uruguay (164%) y Bolivia (129,8) (30). En América Latina, en tanto, aumentó un 48%, lo que significa alrededor del 16% de las ventas totales de alimentos procesados y un crecimiento anual del 3,1%, por encima del 2,8% que corresponde al promedio mundial. Siendo América Latina la cuarta región del mundo que mantiene las mayores cifras de ventas de productos ultra-procesados. Por lo expuesto se subraya la importancia del monitoreo de los OGM no solo como OVM y sus derivados, sino que también respecto a su presencia en los alimentos procesados y ultra-procesados.

Castillo (31), halló que de 13 muestras identificadas como productos "naturales", con ingredientes como hojuelas de maíz, granolas o mezclas de cereales, 11 de ellas contenían proteínas modificadas (cry34Ab1, Cry3Bb1).

Carvajal (32), demostró que un 86% de las muestras de alimentos procesadas contenían secuencias transgénicas. En todas ellas se detectó un fragmento del Promotor 35S CaMV con un amplicón observable de aproximadamente 82bp. De las muestras positivas, un 29% no son productos con ingredientes de maíz. Asimismo, respecto al elemento transgénico Terminador *nos*, se observó que un 72% tenían una banda con un peso molecular de 84bp.

Ferreira (33), extrajo ADN utilizando la metodología de CTAB en 16 muestras de harina de trigo de 10 marcas diferentes. Los resultados evidenciaron que en 12 de ellas se identificó el gen CP4 EPSPS, específico para la soja Roundup Ready, evidenciando la utilización de soya genéticamente modificada en dichos productos.

Fernández (34), estudió 18 muestras de polenta mediante PCR. El resultado fue positivo al 100% en el elemento Promotor 35S CaMV. Por otro lado, sus resultados arrojaron que el evento transgénico BT176 no está presente en ninguna de las muestras, pero si se identificó los eventos MON 810(13 muestras) y BT11 (14 muestras).

Mejía (35), analizó 26 muestras de granos de soya comercializadas en diferentes centros de acopio, dos de ellas eran positivas respecto a la presencia del Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos*; y, además, contenían porcentajes mayores a 0,1% de OGM.

Lipp (36), demostró que utilizando el cebador Terminador *nos* se obtuvo un alto número de resultados correctos (sensibilidad 98,2%) en comparación del cebador Promotor 35S CaMV (sensibilidad 96,1%).

Marcellino (37), analizó diferentes muestras de embutidos comercializados en Brasil utilizando los métodos de extracción Wizard modificado y el método de CTAB. De esta forma determinó que analizando muestras de dichos alimentos bien homogenizadas y en cantidades de 100mg se obtiene buena calidad de ADN para la detección y/o cuantificación de OGM.

Taski-Ajdulkovic (38), identificó mediante la técnica de PCR que, de 50 muestras de carnes procesadas comercializadas en Serbia, 20 dieron positivas al Promotor 35S; y además, todas dieron positivo a la presencia del evento transgénico específico para soja Roundup Ready.

Elsanhoty (39), demostró que todas las muestras de carnes procesadas recolectadas en un supermercado del Reino de Arabia Saudita dieron positivo al gen específico de Roundup Ready utilizando PCR en tiempo real.

En base a los estudios expuestos, los OVM han sido objeto de diversos estudios y actualmente existe una normativa peruana para su vigilancia. Sin embargo, dicha base legal no se extiende a los alimentos procesados y/o ultra-procesados con contenido transgénico. Asimismo, la evaluación del impacto de la inclusión de OGM en la formulación de dichos productos en aspectos de la Seguridad Alimentaria como accesibilidad, disponibilidad, uso y/o estabilidad es poco estudiada.

4.2 SEGURIDAD ALIMENTARIA

Según la FAO, "Seguridad Alimentaria" es la situación que se da cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana. Con arreglo a esta definición, puede determinarse cuatro dimensiones de la seguridad alimentaria: disponibilidad de alimentos, acceso físico y económico, utilización de los alimentos y estabilidad a lo largo del tiempo. (40)

> **Disponibilidad:** Es la acción o acciones orientadas a garantizar la existencia de los alimentos en cantidad suficiente para el consumo de la población. También es definida como la cantidad de alimentos provenientes de todos los medios de producción interna, importaciones comerciales y asistencia alimentaria que están físicamente presentes en el área de atención. La misma que está determinada por: producción (alimentos que se producen en el área), comercio (alimentos traídos al área a través de los mecanismos de mercado), existencias (alimentos en inventario de comerciantes y reservas gubernamentales) y transferencias (alimentos suministrados por el gobierno y/o agencias que brindan asistencia) (41)

Acceso: Este pilar existe cuando todos los individuos de los hogares de una población tengan los suficientes recursos para obtener los alimentos apropiados (ya sea a través de producción, venta o donación) para un régimen nutritivo. La misma se refiere a la capacidad de un hogar de adquirir cantidades suficientes de alimentos mediante uno o una combinación de medios, sea producción y existencias propias, compras, prestamos, etc. Una clara diferencia entre disponibilidad y acceso es cuando los alimentos están disponibles, pero no accesibles en cantidad o variedad suficiente en cualquiera de las formas de distribución. (41)

Utilización: Implica la habilidad del cuerpo humano para ingerir y metabolizar alimentos. Dietas nutritivas y seguras, un ambiente biológico y social adecuado, una nutrición efectiva y el cuidado de la salud aseguran una adecuada utilización de alimentos y evitan enfermedades. Asimismo, implica al uso que hacen los hogares a los alimentos. Este pilar incluye: Formas en las que se almacena, procesa y preparan los alimentos, incluyendo el agua y combustible para cocinar, estado de salud de cada miembro, etc. (41)

Estabilidad: Es aquel determinante que afecta a la disponibilidad, acceso y utilización. Tres de sus mayores problemáticas son: La volatilidad de los precios de los alimentos, la presencia de fenómenos naturales y la magnitud de las pérdidas y desperdicios de alimentos.

Asimismo, los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (42), propuesto por la ONU, señalan que para poner fin al hambre, lograr la seguridad y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible; se debe poner como metas, entre otras: 1) Corregir y prevenir las restricciones y distorsiones comerciales en los mercados agropecuarios mundiales, entre otras cosas mediante la eliminación paralela de todas las formas de subvenciones a las exportaciones agrícolas y todas las

medidas de exportación con efectos equivalentes, de conformidad con el mandato de la Ronda de Doha para el Desarrollo; y , 2) Adoptar medidas para asegurar el buen funcionamiento de los mercados de productos básicos alimentarios y sus derivados, y facilitar el acceso oportuno a información sobre los mercados, en particular sobre las reservas de alimentos, a fin de ayudar a limitar la extrema volatilidad de los precios de los alimentos.

4.3 ANÁLISIS DE RIESGOS

El análisis de riesgos se utiliza para elaborar una estimación de los riesgos para la salud y la seguridad humanas, identificar y aplicar medidas adecuadas para controlar los riesgos y comunicarse con las partes interesadas para notificarles los riesgos y las medidas aplicadas. Puede utilizarse para respaldar y mejorar la elaboración de normas, así como para abordar cuestiones de inocuidad de los alimentos resultantes de los nuevos peligros o de desajustes en los sistemas de control de los alimentos (43).

Es un proceso estructurado y sistemático mediante el cual se examinan los posibles efectos nocivos para la salud como consecuencia de un peligro presente en un alimento, o de una propiedad de este, y se establecen opciones para mitigar ese riesgo. El análisis de riesgos se ha convertido en la piedra angular para el establecimiento de medidas de control de los alimentos.

Los tres componentes principales del análisis de riesgos se han definido en el Codex Alimentarius de la manera siguiente: (43)

1. **Evaluación de riesgos:** Proceso científico que consiste en los tres pasos siguientes: i) identificación de peligros; ii) caracterización de peligros; iii) evaluación de exposición, y iv) caracterización de riesgos.
2. **Gestión de riesgos:** El proceso, diferente de la evaluación de riesgos, de analizar la alternativa de políticas en consulta con todas las partes interesadas considerando la evaluación de riesgos y otros datos relevantes para la protección de la salud de los consumidores y para la promoción de prácticas de comercio legítimo y, de ser necesario, seleccionando las opciones de prevención y control que correspondan.
3. **Comunicación de riesgos:** Intercambio interactivo de información y opiniones durante todo el proceso de análisis riesgos con respecto a factores relacionados con los riesgos y percepciones de riesgos entre evaluadores, administradores de riesgos, consumidores, industria, comunidad académica y otras partes interesadas, incluyendo la explicación de los hallazgos de la evaluación de riesgos y la base de las decisiones de administración de riesgos.

4.4 EVALUACIÓN DE RIESGOS BIOTECNOLÓGICOS

De acuerdo con el Codex Alimentarius, los posibles efectos negativos, referidos al desarrollo de toxinas y/o alérgenos, provenientes de los productos biotecnológicos como los OGM deben ser sometidos a evaluación con la finalidad de determinar la existencia de un peligro incluyendo la comparación entre dicho alimento producto de la biotecnología y su par convencional. Por lo tanto, es importante asociar la detección de un peligro nuevo, sea por calidad nutricional u otro, con los posibles riesgos (44)

4.5 INGENIERÍA GENÉTICA

De acuerdo con la FAO, es el conjunto de técnicas de la biología molecular que permiten aislar, manejar y transferir los genes de un organismo a otro (45). Según esta organización, estas técnicas pueden contribuir a elevar la producción y la productividad en la agricultura, la silvicultura y la pesca. No obstante, reconoce la preocupación por los posibles riesgos en la salud humana, sanidad animal y las consecuencias para el medio ambiente. Asimismo, lo considera como la modificación del genotipo, y, en consecuencia, del fenotipo mediante transgénesis que es la introducción de uno o varios genes en células animales o vegetales con lo que el gen introducido (transgén) se transmite a las generaciones sucesivas (44).

La tecnología genética recombinante, la biotecnología moderna más conocida, permite que plantas, animales y microorganismos sean genéticamente modificados (GM) con características novedosas más allá de lo que es posible mediante las técnicas de reproducción y selección tradicionales.

Se reconoce que las técnicas como la clonación, el cultivo tisular y la reproducción asistida por marcadores son con frecuencia consideradas biotecnologías modernas, además de la modificación genética. La inclusión de rasgos novedosos ofrece un potencial aumento de la productividad agrícola, o mejor calidad y características de nutrición y procesamiento, lo que puede contribuir en forma directa a mejorar la salud y el desarrollo humano.

4.6 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

El ADN es una molécula polimérica, la cual es la base química de la herencia, y está organizada en genes que son las unidades fundamentales de la información genética. Las unidades

monoméricas del ADN se mantienen en forma polimérica por medio de enlaces 3,5-fosfodiéster que constituyen una cadena única (46). Watson y Crick propusieron en 1950 un modelo de una molécula de ADN bicatenaria que presenta dos cadenas unidas por enlaces de hidrógeno entre las bases purina y pirimidina de las moléculas lineales respectivas que además son antiparalelas, es decir que una cadena corre en la dirección de 5 a 3 y la otra de 3 a 5, las cuales dependen de enlaces de hidrogeno de A con T y de G con C. (47)

Es importante añadir que las cadenas de una molécula de ADN se separaran en un rango de temperaturas dependiendo de la composición de las bases y la concentración de sales en la solución. Por ejemplo, un ADN rico en pares G-C debido a que tienen tres enlaces de hidrogeno se fusionarían a temperaturas más altas que el de los pares A-T que solo contienen dos enlaces de hidrogeno. Asimismo, estas cadenas que se separan pueden re-naturalizarse o re-asociarse cuando se logra adecuadas condiciones de temperatura y sales fisiológicas, este proceso se llama hibridación (46).

4.7 EXTRACCIÓN DE ADN

Para poder iniciar con los estudios de biotecnología molecular se deben tener ácidos con el mayor grado de pureza y prevenir que no contengan contaminantes inhibidores, es necesario aplicar métodos de extracción adecuados. Por ello, durante la elección de la técnica se deben tomar en cuenta el ácido nucleico diana, el organismo fuente, material de inicio, resultados esperados y el uso posterior. (48)

Según Anklam (49), los resultados de extracción de ADN dependen del tipo de material:

1. Las materias primas no son mezcladas premeditadamente durante la cosecha o el almacenamiento pudiendo invalidar supuestos asociados con el muestreo aleatorio simple;
2. Los alimentos procesados deben contener GMO como parte de un ingrediente o en varios de ellos. Por lo tanto, se puede esperar una varianza fuertemente estratificada.

Sin importar la técnica los métodos de extracción se debe provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de las células. Entre los procedimientos para provocar dicha acción existen:

1. Rotura mecánica (trituración, lisis hipotónica, etc);
2. Tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles, etc); y
3. Digestión enzimática (proteinasa K).

En segundo lugar, para la separación de proteínas y lípidos se utilizan solventes orgánicos y ciclos de centrifugación con la finalidad que la fase acuosa y la orgánica se separaran permitiendo aislar al ADN. Una vez eliminados dichos componentes se debe recuperar el ADN por lo tanto se utilizan solvente con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfatos del DNA volviéndolo insoluble. (50)

4.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para realizar la separación de macromoléculas se aplican diferentes métodos. Uno de ellos es la electroforesis, el cual realiza dicha función según el tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. La electroforesis en gel consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel y de esta forma migrarían hacia el cátodo o ánodo. De esta forma son

los grupos fosfatos del DNA los cuales, cargados negativamente, que lo harán migrar hacia el ánodo (48). Los principales componentes son:

4.8.1 AGAROSA

La agarosa es un polisacárido natural extraído de algas y formado por la repetición de la molécula agaribosa. Al solidificar la agarosa, como un gel, tiene a poseer grandes poros que son la razón de la separación de las moléculas grandes con un peso molecular de más de 200kDa. Sin embargo, su resolución es limitada por que las bandas visibles pueden ser difusas y esparcirse. (48)

4.8.2 TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

Este componente permite la transmisión de la corriente eléctrica en todo el medio de la cámara de electroforesis y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza la corrida. Cabe añadir que esta solución es la misma composición y pH del buffer con el que se prepara el gel de agarosa. (51)

Cabe añadir que en un tampón de elevada fuerza iónica la conductancia eléctrica es muy elevada y se genera una importante cantidad de calor. (48)

4.8.3 CONCENTRACIÓN DE AGAROSA

Uno de los factores del desplazamiento de los fragmentos del ADN es la concentración del gel de agarosa debido a que el tamaño de los poros juega un rol importante. Es decir, a mayor concentración menor tamaño de los poros y viceversa. Por lo tanto, si los poros son pequeños la migración será más lenta.

TABLA 1.- Concentración recomendada de porcentaje (%) del gel de agarosa para separar moléculas de ADN lineales.

% de agarosa	Gamas de tamaños de ADN (pb)
0,75	10 000 – 15 000
1,0	500 – 10 000
1,25	300 – 5 000
1,5	200 – 4 000
2,0	100 – 2 500
2,5	50 – 1 000

Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2007. (48)

4.8.4 MARCADOR DE PESO MOLECULAR

Mezcla de ADN o proteínas de tamaño conocido. En muchos casos suelen ser bacteriófagos o plásmidos sometidos a corte con enzimas de restricción que generan fragmentos de diversos tamaños o moléculas de ADN sintéticas denominadas escaleras. (51)

4.8.5 TAPÓN DE CARGA

El tampón de carga permite visualizar los fragmentos de ADN separados en el gel de agarosa al contener un colorante. Este mismo se emplea para aumentar la densidad de las muestras para que las gotas de ADN caigan uniformemente en el pocillo. Es importante resaltar que si una banda del gel contiene mucha cantidad de ADN puede sobrecargarse y el fragmento se visualizaría borroso. (48)

4.9 REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

La PCR es un método para amplificar una secuencia blanco del ADN basándose en el mecanismo de la replicación in vivo. El proceso consiste en ciclos repetitivos de: 1) Desnaturalización del ADN por altas temperaturas con la finalidad que su doble cadena se desenrolle y pase a ser ADN

monocatenario; 2) Unión (anillamiento) de los oligonucleótidos, utilizados como cebadores, al ADN diana; y 3) Extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando ADN polimerasa como catalizador en presencia de iones de Mg2+. Todo lo anterior constituye un ciclo del presente método de amplificación proporcionando un medio sensible y selectivo siendo posible amplificar secuencias tan cortas como de 50 a 100pb, y tan largas como de 10kb. (48) (46)

4.9.1 PRINCIPIOS (52)

Desnaturalización. La muestra de ADN primero se calienta para separar las dos cadenas formando el ADN monocatenario e inmediatamente se detienen las reacciones enzimáticas. Dicha separación producto de la temperatura de fusión (93°C – 96°C) es denominado desnaturalización. Dicha temperatura varía por el tipo de disolvente, concentración salina y del pH utilizado. Asimismo, dicha temperatura puede verse afectada por la concentración G/C y T/A. Es decir, si una estructura de ADN contiene una elevada proporción de G/C su temperatura de fusión será más alta en comparación de otra que contiene mayor cantidad de la combinación T/A.

Anillamiento del cebador. La unión del ADN se efectúa a temperaturas inferiores que la utilizada en la etapa de desnaturalización (55-65°C). Los cebadores se unen al ADN monocateriano, gracias a los enlaces más estables, y en ese momento el ADN polimerasa se fija y empieza a copiar el ADN molde.

Extensión del cebador. A través de la acción del ADN polimerasa termoestable, *Taq polimerasa* y con los dNTP se inicia la duplicación del ADN blanco. La temperatura ideal para dicha enzima es de 72°C. En este punto es fundamental la adecuada concentración de

MgCl2 en la mezcla final, el cual suele oscilar entre 0,5 y 5,0mM, debido a que estos forman un complejo soluble con los dNTP, estimula la actividad de la enzima polimerasa y aumenta la temperatura de fusión. (53)

4.9.2 PCR ANIDADA

Este método aumenta la sensibilidad y la especificidad de la amplificación del ADN debido que se utilizan conjuntos anidados de cebadores. En este sentido, se utilizan dos procesos de PCR. El primero con un conjunto de cebadores y uno ultimo correspondiente a un fragmento del producto de ADN obtenido del cebador amplificado. (54)

4.10 ORGANISMOS VIVOS MODIFICADOS (OVM)

Un organismo vivo debe entenderse como cualquier entidad biológica capaz de transferir o replicar material genético, incluidos los organismos estériles, los virus y los viroides. (11) Por otro lado, un organismo vivo modificado u OVM es cualquier organismo vivo que contiene una combinación nueva de material genético obtenida mediante la aplicación de la biotecnología moderna. Se exceptúa expresamente los genomas humanos. (11)

4.11 ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OGM)

De acuerdo a la OMS, los organismos genéticamente modificados (OGM) pueden ser definidos como organismos (plantas, animales o microrganismos) en los cuales el material genético ha sido alterado de una forma no natural. Esto permite seleccionar genes individuales para ser transferidos de un organismo a otro, inclusive entre especies que no están relacionadas. Por lo tanto, los

alimentos derivados de los OGM o que usan en sus ingredientes OGM son denominados como alimentos transgénicos. (55)

4.12 PRODUCCIÓN DE OGM

En el año 1996 se cultivaron cerca de 1,7 millones de hectáreas de cultivos transgénicos. Para el año 2007 dicha cifra aumentó a 114,3 millones de hectáreas. Siete años después se ha registrado cultivos de 181,5 millones de hectáreas. (56)

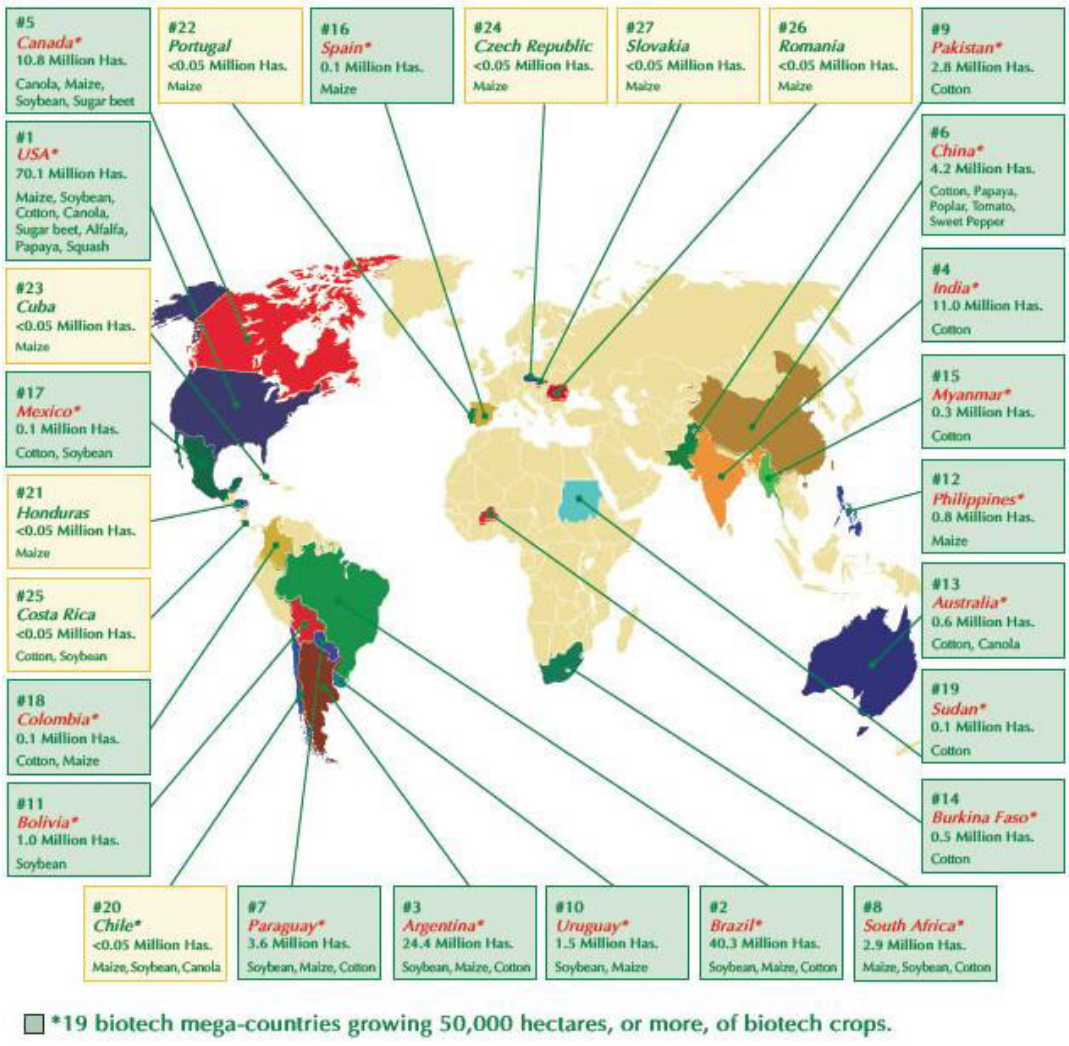


FIGURA 1.- Cultivos biotecnológicos por países, 2014. **(56)**

4.13 ANÁLISIS CUALITATIVO DE OGM

Para la detección de un OGM por PCR es crítico la selección de los cebadores o primers, los mismos que se basan en el objetivo que se quiere analizar. En sentido se puede identificar:

4.13.1 ELEMENTO ESPECÍFICO OGM

Para la identificación de los elementos específicos se utiliza el "método de cribado". Según la OMS (48), dicha técnica permite determinar la presencia de un ADN modificado a través de la identificación de los elementos genéticos de control como son el Promotor 35S (P-35S) derivado del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador *nos* (nos3´) de *Agrobacterium tumefaciens* (57). De acuerdo con la ISO 21569:2005 (58), si se obtienen resultados positivos podría significar la posible presencia de un ADN derivado de OGM o derivado de CaMV. Por lo tanto, es necesario identificar el origen para confirmar la presencia de un OGM. Este método es muy utilizado porque que ambos elementos OGM están presentes en casi todos los vegetales modificados genéticamente reportados en la unión europea. (59)

4.13.2 EVENTO Y CONSTRUCTO ESPECIFICO OGM

Los eventos permiten identificar OGM específicos como la soja *Roundup Ready*, el maíz MON810, maíz Bt-176, entre otros. En el caso del constructo, Para su detección específica el cebador debe detectar una secuencia de ADN foránea insertada. El evento refiere a la intersección entre el gen transgénico y el ADN del organismo original.

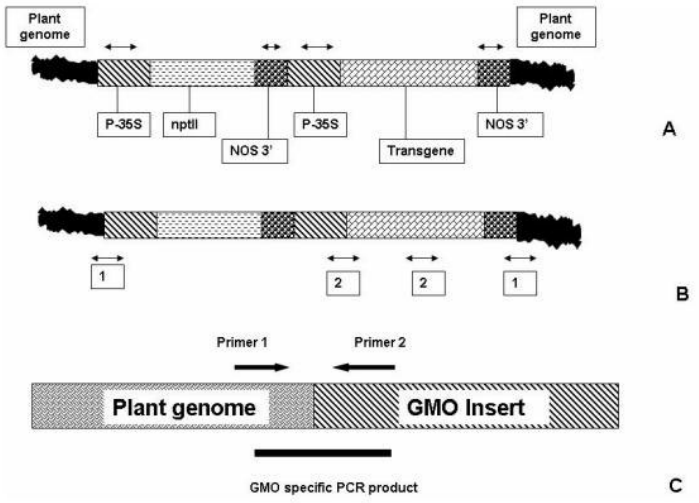


FIGURA 1.- Identificación del cebador para la detección de maíz GM por PCR, 2005. **(57)**

A. Selección de cebador por el método de cribado; **B.** Selección de cebador para la identificación de maíz genéticamente modificado, 1-evento específico, 2-constructo específico; y **C.** Selección de los cebadores para la detección específica de un evento.

4.14 PROMOTOR 35S CAMV Y TERMINADOR *NOS*

Este elemento regula la expresión de los genes de muchos OGM. Según lo reportado por Lipp (36), para su detección específica se utilizan los cebadores p35S-cf3 y p35S-cr4 dando en el amplificado un fragmento de 123pb. Mientras que los cebadores HA-nos-118-f y HA-nos118-r corresponde para el evento terminador *nos* dando una amplificación de 118pb.

4.15 SOJA ROUNDUP READY (GTS 40-2-2)

Este OGM pertenece a la compañía Monsanto Canada Inc. y está desarrollado para permitir la obtención de soja con tolerancia al glifosato -ingrediente activo del producto Roundup Ready- de forma tal que permita el uso del herbicida en el cultivo de la soja, característica añadida mediante tecnología de recombinación de ADN. El glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvilshkimato-3-

fosfato sintasa (EPSPS), la cual es necesaria en la ruta bioquímica de shikimato en la producción de aminoácidos esenciales, provocando la muerte de la planta.

Considerando esto se introdujo a cultivos vegetales un gen insensible al glifosato que permite a la planta la continua producción de aminoácidos críticos para su crecimiento. Como se observa en la Figura 5 se clonó el gen de la tolerancia al glifosato, una secuencia de ADN que codifica un péptido de tránsito (CTP4 de *Petunia hibrida*), al gen EPSPS. Dicho compuesto fusionado con la EPSPS facilita su importación a los cloroplastos inhibiendo la acción del herbicida. (60)



FIGURA 2.- Representación esquemática del casete del gen de soja Roundup Ready, 1995. **(48)**

4.16 MAÍZ MON 810

Planta transgénica perteneciente a la compañía Monsanto Canada Inc. resistente al piral del maíz (*Ostrinia nubilalis*) permitiendo que durante su cosecha no se utilicen plaguicidas. Lo anterior es gracias a la introducción un gen que codifica la proteína insecticida derivada de *Bacillus thuringiensis ssp. Kurstaki* denominada □-endotoxina CRYIA (b). Dicho gen es introducido junto con el Promotor 35S CaMV y la secuencia principal del intrón HSP70 del maíz.



FIGURA 3.- Representación esquemática de la construcción genética cryIA (b) del plásmido pv-zmbk07 utilizado en la transformación de MON810. (48)

4.17 SISTEMAS DE ABASTECIMIENTO Y DISTRIBUCIÓN DE ALIMENTOS (SADA)

La forma en la cual las poblaciones a nivel mundial satisfacen sus requerimientos nutricionales es mediante los sistemas de abastecimiento y distribución de alimentos (SADA) los cuales agrupa producción, manipulación, almacenamiento, transporte, procesamiento, embalaje, ventas por mayor y menor, etc. (61)

Las áreas geográficas cubiertas por los SADA pueden ser (61):

1. **Regional**, incluye las áreas principales a las cuales las ciudades confían el suministro de alimentos y agua.
2. **Metropolitana,** incluye las áreas periurbanas usadas para la producción de alimentos (cultivo, ganado y acuicultura), mercados mayoristas, mataderos, mercados de la ciudad, etc.
3. **Urbana,** incluye las áreas de agricultura urbana, principales mercados de comercialización de alimentos, hipermercados, centros comerciales, etc.,
4. **Local,** incluye todas las ventas de productos alimenticios que abastecen un barrio determinado (mercados permanentes o itinerantes, ventas de alimentos y supermercados)

vendedores ambulantes de alimentos y el comercio informal en general, itinerante o permanente.

Los principales centros de abastecimiento son (61):

1. **Mercados mayoristas**
2. **Grandes mercados minoristas**, pueden formales o informales. Los informales bien expandidos, generalmente se localizan en espacios abiertos a los lados de las carreteras. Su tamaño y forma cambian de acuerdo a las características del sitio, la organización interna del mercado y si son legales o ilegales.
3. **Supermercados**, generalmente son privados y se encuentran en áreas planificadas de la ciudad. Necesitan amplias áreas de acceso, estacionamiento y el tránsito de vehículos livianos y pesados.
4. **Pequeños supermercados,** son aquellos que pueden ser ubicados en la planta baja de edificios de centros comerciales, en locales independientes, en quioscos o estructuras temporales o en piezas de propiedades residenciales.
5. **Vendedores ambulantes** de productos frescos o de alimentos cocinados (incluyendo restaurantes).

4.18 CLASIFICACIÓN DE ALIMENTOS

Para la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) (62), los alimentos pueden ser clasificados y definidos de la siguiente manera:

1. **Alimentos sin procesar:** Alimentos obtenidos directamente de plantas o animales que no son sometidos a ninguna alteración desde el momento en que son extraídos de la naturaleza hasta su preparación culinaria o consumo.
2. **Alimentos mínimamente procesados**: Aquellos alimentos sin procesar que han sido sometidos a limpieza, remoción de partes no comestibles o no deseadas, secado, molienda, fraccionamiento, tostado, escaldado, pasteurización, enfriamiento, congelación, envasado al vacío o fermentación no alcohólica. Los alimentos mínimamente procesados también incluyen combinaciones de dos o más alimentos sin procesar o mínimamente procesados, alimentos mínimamente procesados con vitaminas y minerales añadidos para restablecer el contenido original de micronutrientes o para fines de salud pública, y alimentos mínimamente procesados con aditivos para preservar sus propiedades originales, como antioxidantes y estabilizadores.
3. **Productos alimenticios procesados**: Productos alimenticios de elaboración industrial, en la cual se añade sal, azúcar u otros ingredientes culinarios a alimentos sin procesar o mínimamente procesados a fin de preservarlos o darles un sabor más agradable. Los productos alimenticios procesados derivan directamente de alimentos naturales y se reconocen como una versión de los alimentos originales. En su mayoría tienen dos o tres ingredientes. Los procesos usados en la elaboración de estos productos alimenticios pueden incluir diferentes métodos de cocción y, en el caso de los quesos y panes, la fermentación no alcohólica. Los aditivos pueden usarse para preservar las propiedades de estos productos o evitar proliferaciones de microorganismos.
4. **Productos alimenticios ultra-procesados**: Formulaciones industriales fabricadas con varios ingredientes. Igual que los productos procesados, los productos ultra-procesados contienen sustancias de la categoría de ingredientes culinarios, como grasas, aceites, sal y

azúcar. Los productos ultra-procesados se distinguen de los productos procesados por la presencia otras sustancias extraídas de alimentos que no tienen ningún uso culinario común (por ejemplo, caseína, suero de leche, hidrolizado de proteína y proteínas aisladas de soja y otros alimentos), de sustancias sintetizadas de constituyentes de alimentos (por ejemplo, aceites hidrogenados o interesterificados, almidones modificados y otras sustancias que no están presentes naturalmente en alimentos) y de aditivos para modificar el color, sabor, el gusto o la textura del producto final. Los alimentos sin procesar o mínimamente procesados representan generalmente una proporción muy pequeña de la lista de ingredientes de productos ultra-procesados, que suelen tener 5, 10, 20 o más ingredientes, o están ausentes por completo. En la fabricación de productos ultra-procesados se usan varias técnicas entre ellas la extrusión, el moldeado y el pre procesamiento, combinadas con la fritura. Algunos ejemplos son las bebidas gaseosas, los snacks de bolsa, los fideos instantáneos y los trozos de pollo empanados tipo "Nuggets".

De acuerdo con Moubarac (63), existen dos tipos de alimentos listos para consumir. El primer tipo son los alterados por añadir o introducir sustancias que cambian sustancialmente la naturaleza del alimento o uso. Estos son identificados como alimentos procesados. El otro tipo son formulas industriales, usualmente hechos únicamente o solamente por ingredientes industriales. Estos últimos son identificados como alimentos ultra procesados. Las características en común de acuerdo a estudios en Brasil y Canadá han demostrado que juntos tienen mayor energía, azúcares libres, sodio, grasas saturadas, menor contenido de fibra en comparación de los alimentos no procesados o mínimamente procesados.

4.19 ALIMENTOS DE CONSUMO MASIVO

A continuación, se muestras graficas en base los datos obtenidos por el Instituto Nacional de Estadística e Informática respecto a los alimentos con mayor producción y consumo a nivel nacional.

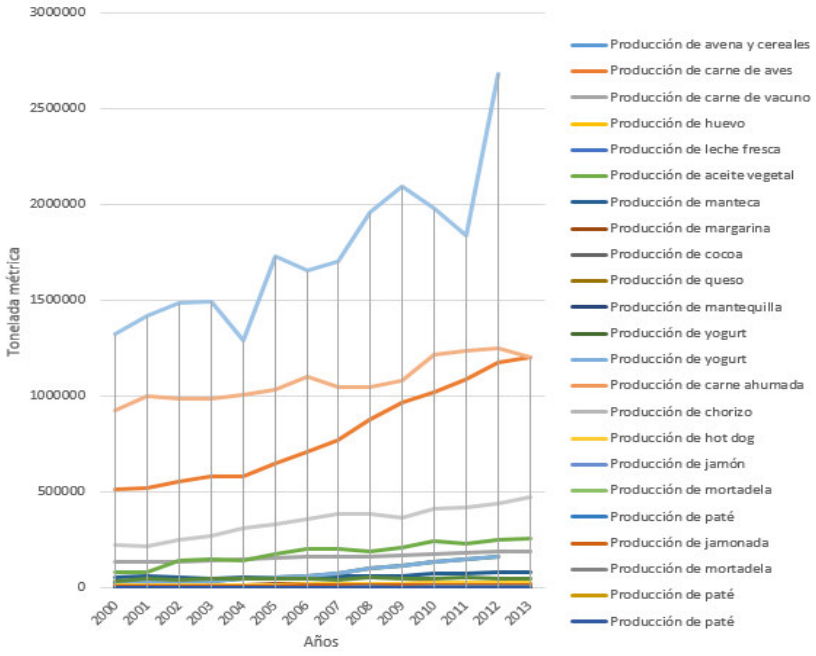


FIGURA 4.- Producción de alimentos a nivel nacional entre los años 2000 y 2013. **(64)**

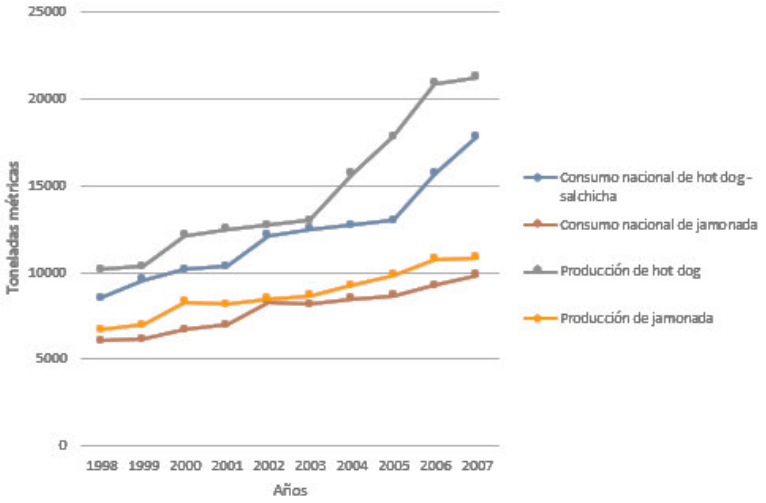


FIGURA 5.- Producción vs consumo de Hot Dog y jamonada entre los años 1998 y 2007. **(64)**

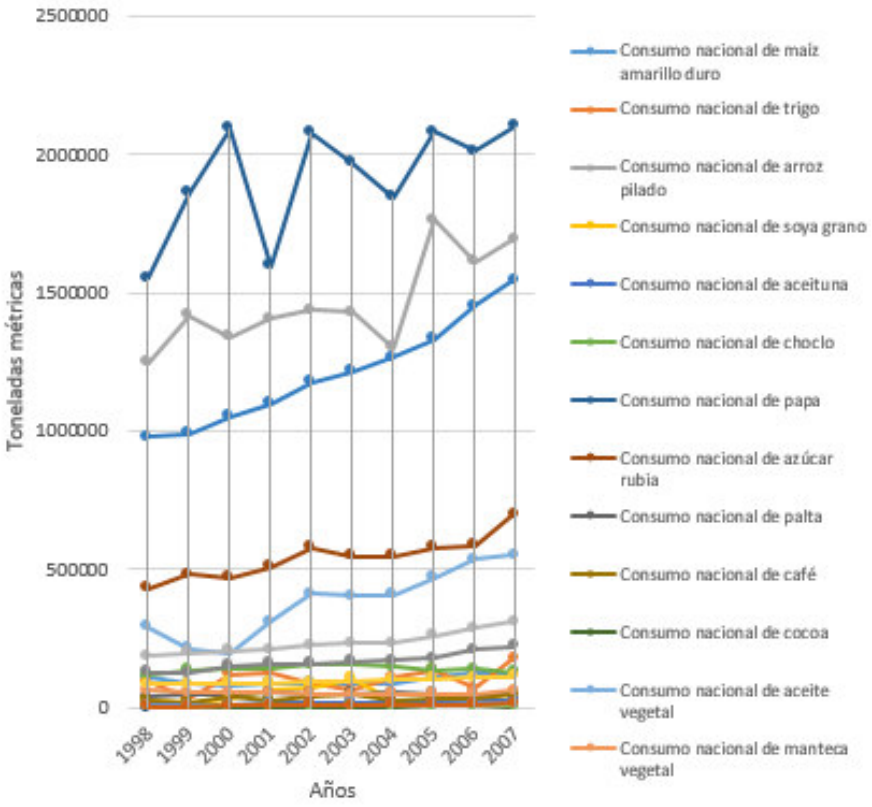


FIGURA 6.- Consumo de alimentos a nivel nacional entre 1998 y 2007. **(64)**

4.20 EMBUTIDOS: SALCHICHAS TIPO HOT DOG

Los embutidos son productos elaborados a partir de carne y grasa con o sin otros productos o subproductos animales aptos para el consumo humano, adicionando o no aditivos alimentarios, especias y agregados de origen vegetal; a los cuales se les embute o no en tripas naturales o artificiales (65). De acuerdo con la FAO, este alimento pasa por las operaciones unitarias de troceado, congelado, molido y picado, mezclado, atado, cocción (50°C/ 10-30 min), ahumado (70 – 80°C / 45min), escaldado (75 – 82°C/ 10min), enfriado y almacenado a 4°C (66). Sin embargo, las temperaturas varían dependiendo del tipo de embutido: **sin tratamiento término** (chorizos, salame, cabanosi, etc) o **con tratamiento térmico**, el cual se divide en escaldados o cocidos.

Según, Bejarano (67) cuando un embutido pasa por un tratamiento térmico entre 80°C y 90°C es denominado cocido (Ejemplo de ello son: chicharon de prensa, morcilla, queso de chancho, etc); mientras que cuando la temperatura es entre los 75°C y 80°C es clasificado como "escaldado" (Ejemplo: jamonadas, salchichas, mortadelas, etc.)

4.20.1 VALOR NUTRICIONAL

De acuerdo a las "Tablas Peruana de Composición de Alimentos" la composición es:

TABLA 2.- Composición bromatológica de un Hot Dog por cada 100g.

Composición	Cantidad*	Cantidad**
Energía (Kcal)	366	292
Agua (g)	49,4	55,2
Proteínas (g)	11,0	11,3
Grasa total (g)	34,3	24,7
Carbohidratos Totales (g)	2,1	6,6
Cenizas (g)	3,2	2,9

*Tablas peruanas de composición de alimentos (68)
** Tablas peruanas de composición de alimentos industrializados (67)

4.21 LOTE DE PRODUCCIÓN

Para seleccionar las muestras en un lote o pila de la unidad experimental debemos tomar en cuenta algunos factores que están implicados en la formación de un lote (69):

a. Los lotes deben ser homogéneos;
b. Los lotes deben formarse de manera que no compliquen su manejo en la inspección; y
c. Los lotes deben ser tan grandes como sean posibles.

4.22 TIPOS DE MUESTREO

4.22.1 ALEATORIO SIMPLE

Donde se asignará un número a cada uno de los "N" artículos del lote o pila y al azar se seleccionan "n" de estos números para determinar que artículos del lote constituyen la muestra. Para la selección de los números se puede recurrir a una tabla de números aleatorios. (69)

4.22.2 ALEATORIO CONGLOMERADO

Cuando los elementos de una población se dividen en forma natural en subgrupos o conglomerados, que son similares entre sí y cuyos elementos tienen una variabilidad similar a los elementos de toda la población, es recomendable tomar una muestra de conglomerados (69). Para realizar un muestreo aleatorio por conglomerados, primero se determinan claramente los subgrupos en los que se divide la población, enseguida se selecciona aleatoriamente "K" de ellos, donde "K" es una constante, y después se analizan todos o una parte de los elementos de los conglomerados seleccionados. Así, en un muestreo de este tipo, al inicio cada unidad de muestreo es una colección de elementos. (69)

5 MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 7 muestra el proceso que se siguió para el desarrollo de la propuesta de procedimientos de evaluación de OGM y su implementación como ensayo piloto en embutidos tipo Hot Dog. Cabe indicar que los análisis moleculares fueron modificados para adaptarlos a la matriz alimentaria seleccionada para la implementación del ensayo piloto.

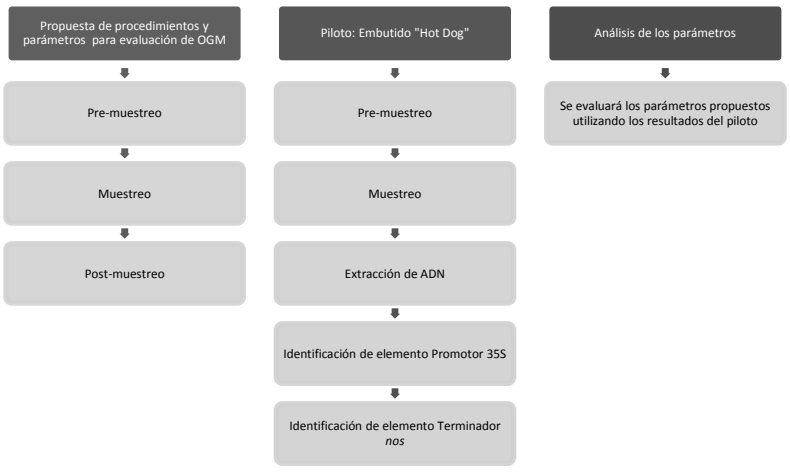


FIGURA 7.- Procedimiento del estudio para la propuesta de evaluación de OGM en alimentos procesados o ultra-procesados.

5.1 DISEÑO DE PROCEDIMIENTOS PARA EVALUACIÓN OGM

Los procedimientos para evaluación son una herramienta importante que sirve como monitoreo para la vigilancia permitiendo registrar datos que sirven para la toma de decisiones. El mismo debe elaborarse para cada situación en particular. Es importante señalar que los planes de monitoreo son instrumentos para mantener un diagnóstico actualizado de una situación o proceso facultando la vigilancia que permite evaluar parámetros de impacto en diversos campos como, en el caso de estudio, en la seguridad alimentaria.

En este sentido, es sumamente importante asegurar el resultado de muestras representativas seleccionando adecuadamente los puntos de muestreo tanto como el tipo de muestra y la frecuencia de recolección. Es importante mencionar que el muestreo debe ser sumamente exacto y preciso, pero carecerán de validez si este no se efectúa adecuadamente. Asimismo, debido a que el objetivo del estudio es la evaluación de OGM en alimentos procesados o ultra-procesados y considerando las diversas matrices alimentarias existentes en que cada procedimiento deberá ser modificado por factores como tipo de alimento, distribución en la cadena de comercialización, hábitos de consumo, entre otros.

5.1.1 MARCO LEGAL

- Constitución Política del Perú. (Artículos 66, 67, 68, 69); (70)
- Ley N° 29571: Código de Protección y Defensa del Consumidor; (13)
- Ley N° 27104: Ley de prevención de riesgos derivados del uso de biotecnología; (11)
- Decreto Supremo: Nº 008-2012-MINAM; (9)
- Política Nacional Ambiental - MINAM; (71)
- Reglamento de la Ley de prevención de riesgos derivados del uso de biotecnología; (72)

- Convenio sobre Diversidad Biológica adoptado en Río Janeiro; (73)
- Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología; (74)
- Ley 29158, Ley Orgánica del Poder Ejecutivo;
- Decreto legislativo N°1060, que regula el Sistema Nacional de Innovación Agraria; y
- Decreto Supremo N° 040-2008-AG, Reglamento del Decreto Legislativo N° 1060.

5.1.2 ÁMBITO DE APLICACIÓN

El protocolo propuesto de procedimientos para la evaluación de OGM en el presente estudio es de carácter voluntario y puede ser aplicado por entidades gubernamentales, empresas, organizaciones civiles y la comunidad científica. Es aplicable a nivel nacional para alimentos procesados y ultra-procesados comercializados en territorio nacional y de consumo diario.

5.1.3 SELECCIÓN DE PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

Los parámetros de evaluación para evaluar el impacto de la presencia de OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados en la seguridad alimentaria toman como concepto la disponibilidad, accesibilidad, utilización y estabilidad de los alimentos en Perú. En este sentido los parámetros tendrán como base la detección cualitativa y cuantitativa de los OGM.

5.2 DESARROLLO DE PILOTO PARA EVALUACIÓN DE OGM

5.2.1 ALCANCE Y APLICACIÓN

El ensayo a escala piloto permite aplicar los procedimientos de evaluación propuestos en una categoría de alimento y zona de intervención específica. En tal virtud, se aplicaron

adecuándolos a una muestra representativa de una categoría de alimentos dentro del rubro de alimentos procesados o ultra-procesados y de consumo masivo. Para la selección de la misma se utilizaron los criterios de inclusión y de no inclusión especificados en el punto 5.2.2.

La ejecución del piloto comprenderá las actividades de pre-muestreo, muestreo, post-muestreo y ensayos moleculares. Para el caso del pre-muestreo y post-muestreo se seguirán las señaladas en el procedimiento, debido a que están diseñadas para la aplicación en cualquier categoría de alimento.

Los análisis moleculares serán descritos en el apartado 5.3 donde el procedimiento general propuesto se modificará de acuerdo a la categoría de alimentos. Por ejemplo, para efectos del desarrollo del piloto, el procedimiento se adecuo a la matriz alimentaria de un embutido salchicha tipo Hot Dog de pollo. Asimismo, dicho ensayo incluirá la selección y modificación de métodos de detección para la extracción de ADN y detección cualitativa de OGM.

5.2.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

La selección de muestras se realizará en base a los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Muestra donde al menos una unidad experimental (una marca) declare contenido transgénico;
- Muestra donde la categoría de alimentos haya sido previamente estudiada;
- Muestra que tenga al menos dos unidades experimentales;

- Muestra cuyas unidades experimentales tenga altos índices de consumo y/o producción en la región; y
- Muestra cuyas unidades experimentales tengan marcas registradas y registro sanitario.

Criterios de exclusión

- Muestra donde ninguna unidad experimental[1] declare contenido transgénico;
- Muestra donde la categoría de alimento no haya sido previamente estudiada;
- Muestra que tenga menos de dos unidades experimentales;
- Muestra cuyas unidades experimentales tenga bajos índices de consumo y/o producción en la región; y
- Muestra cuyas unidades experimentales no tengan marca registrada ni cuentan con registro sanitario.

5.2.3 PRE-MUESTREO

Las actividades implicadas dentro del pre –muestreo deben ser realizada de acuerdo a los criterios señalados en los puntos 11.1.3.1, 11.1.3.2, 11.1.3.3, 11.1.3.4 y 11.1.3.5 del Anexo N° 1, referentes al protocolo propuesto.

[1] Debe entenderse que una unidad experimental hace referencia a una marca.

5.2.4 MUESTREO

El muestreo debe de ser desarrollado de acuerdo a los criterios del punto 11.1.4 del Anexo N° 1. Debe de considerarse que los procedimientos serán aplicados para la región de Lima y específicamente para la ciudad de Lima Metropolitana.

El desarrollo de las actividades de muestreo como selección de punto de muestreo, tamaño de muestra, número de muestra, toma de muestra y el procedimiento de recolección de la muestra se realizarán en base a los criterios del procedimiento diseñado en los apartados 11.1.4.3 y 11.1.4.4.

5.2.4.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

Luego de la recolección de la muestra en los puntos de muestreo seleccionados se deberá de realizar el procedimiento descrito en la Figura 8.

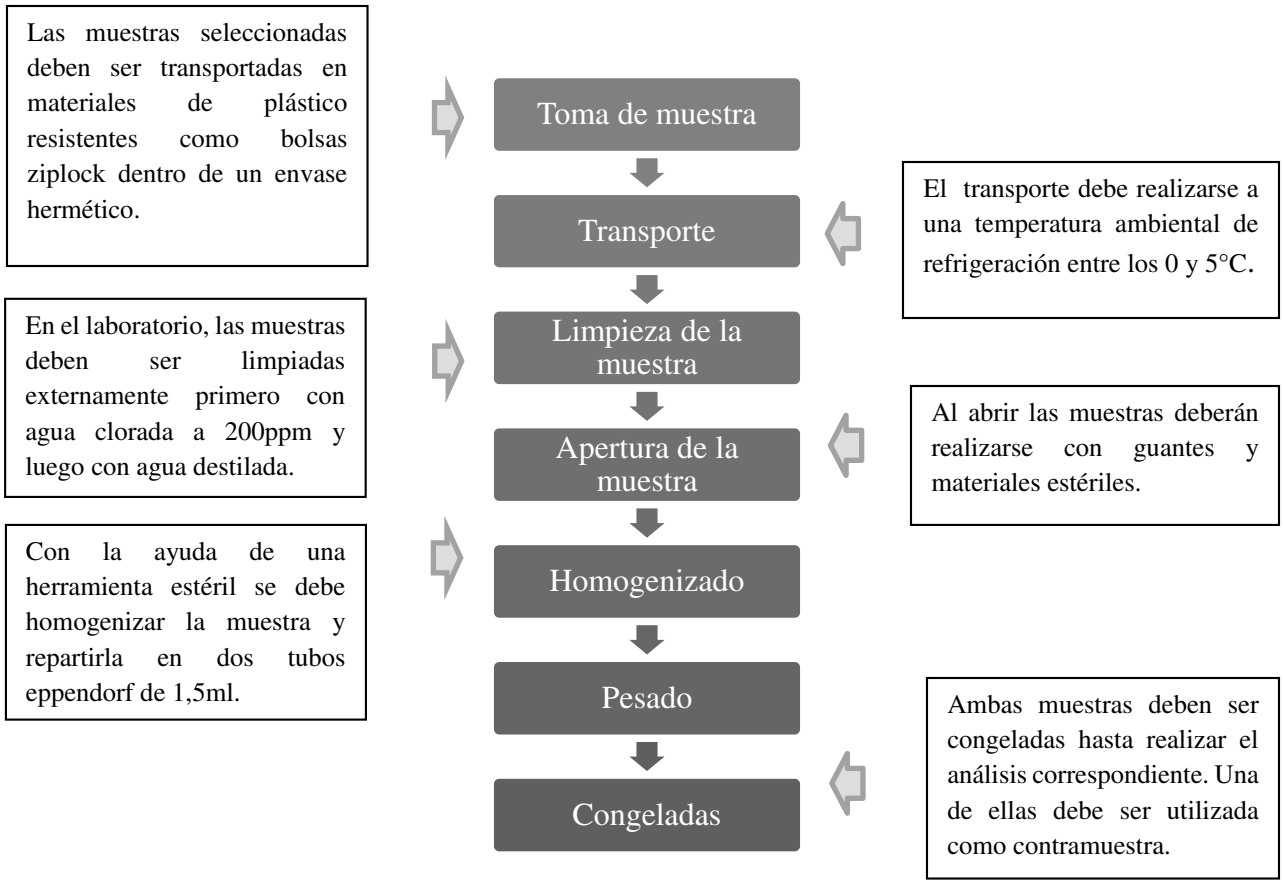


FIGURA 8.- Procedimiento para la recolección, transporte y almacenamiento de la muestra.

5.2.5 POST-MUESTREO

Las actividades implicadas dentro del post – muestreo serán realizadas según los criterios señalados en el Anexo N°1 en los puntos 11.1.5.1, 11.1.5.2, 11.1.5.3, 11.1.5.4 y 11.1.5.5; de acuerdo a lo considerado en el protocolo de evaluación propuesto.

5.3 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

Determinación de pH

Método: Potenciométrico. AOAC (75)

5.4 ANÁLISIS MOLECULARES

El desarrollo del análisis molecular implica la búsqueda, selección y adecuación del método para la extracción de ADN y detección cualitativa de un OGM en una muestra seleccionada.

5.4.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Materiales

- Micropipetas;
- Power Spin BX Centrifuge C883E;
- Tubos eppendorf 1,5ml;
- Cámara de electroforesis horizontal;
- Baño maría DSB-500 220V
- Balanza Kern ABT 220-4M
- Espátulas
- Transiluminador Blue Light AMT-M15
- Agarosa PROMEGA
- O´RangeRuler 100bp ADN ladder
- Tampón de TBE 1X
- Tampón de carga Flourescent Dye
- Kit Gene JET Genomic DNA Purification (Thermo scientific)
- Kit Genomic DNA Purification DNA (Thermo scientific)
- Proteinasa *K* Thermo Scientific

Procedimiento

Se realizaron estudios preliminares para seleccionar el método de extracción de ADN más adecuado considerando la concentración y la calidad. Por lo cual, se compararon los siguientes métodos:

Kit comercial I: Mediante el uso de columnas de purificación**.** El ADN fue aislado mediante el Kit "Gene JET Genomic DNA Purification" siguiendo las instrucciones señaladas por el procedimiento modificado que se encuentra en el Anexo N°3.

Kit comercial II: Mediante el uso de cloroformo. El ADN fue aislado mediante el Kit "Genomic DNA Purification" siguiendo el procedimiento modificado que se encuentra en el Anexo N°4.

Para la separación e identificación del ADN se utilizó el método estándar por electroforesis en gel de agarosa. El procedimiento fue desarrollado mediante la técnica publicada por Sambrook y colaboradores (76) ubicada en el Anexo N°5.

5.4.2 MÉTODO DE CRIBADO

Materiales

- Micropipetas;
- Balanza Kern ABT 220-4M
- Power Spin BX Centrifuge C883E
- Tubos eppendorf 1,5ml;
- Tubos eppendorf para PCR 0.2ml
- Termociclador Mastercycler gradient.
- Transiluminador Blue Light AMT-M15
- Agarosa PROMEGA
- O´RangeRuler 100bp DNA ladder
- O´RangeRuler 50bp DNA ladder
- O´RangeRuler 20bp DNA ladder
- Tampón de TBE 1X
- Tampón de carga Flourescent Dye
- Mix dNTP 4µM
- Maximo Taq polimerasa geneON

- MgCl2 25mM Fermentas
- Buffer *taq* +KCl –MgCl2 Thermo Sientific
- Cebador p35S-cf3/ p35S-cr4
- Cebador HA-nos 118-f/ HA-nos 118-r

Procedimientos

La identificación cualitativa de presencia o ausencia de un OGM en alimentos procesados o ultra-procesados se realizó mediante la detección de los transgenes reguladores del Promotor 35S (derivado de CaMV), el terminador *nos* (derivado de *Agrobacterium tumefaciens*) de acuerdo con metodologías reportadas (36) (77). La identificación positiva de una o más secuencias de los genes de estos reguladores en una muestra, indicaría la posible presencia de un organismo genéticamente modificado en los alimentos analizados. Sin embargo, se deberá confirmar el evento OGM específico.

El procedimiento fue realizado mediante la técnica desarrollada y modificada por Saiki y colaboradores (78) (79) con condiciones de PCR modificadas. El procedimiento utilizado se encuentra descrito en el Anexo N° 6. El procedimiento tuvo ensayos previos para determinar la concentración adecuada de los cebadores y de MgCl2.

TABLA 3.- Secuencia seleccionadas de los cebadores para el Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos*

Cebador	Secuencia (5' – 3')	Gen diana	Longitud del fragmento amplificado
p35S-cf3	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG	Promotor 35S	123 pb
p35S-cr4	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC		
HA-nos 118-f	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG	Terminador *nos*	118 pb
HA-nos 118-r	GACACCGCGCGCGATAATTTATCC		

Las muestras utilizaron un control sin ADN remplazándolo con agua en la misma cantidad. Tras la amplificación mediante la técnica de PCR se analizó los productos por el método estándar de electroforesis en gel de agarosa (Ver Anexo N°5). Se utilizó en cada pocillo 5µl de la reacción de PCR con 2µl del tampón de carga. La migración tomará lugar a 80V por un periodo aproximado de una 25-35min. Al finalizar la electroforesis se visualizó el gel de agarosa mediante una transiluminación ultravioleta.

6 RESULTADOS

6.1 PROPUESTA DE PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN

Los objetivos, el ámbito de aplicación y los conceptos técnicos tomaron como base las normativas legales para la elaboración de los procedimientos para evaluación de alimentos procesados de consumo masivo, los cuales servirán como una opción para el desarrollo de monitoreo a nivel nacional el cual busca cubrir los vacíos legales existentes y evaluar el impacto de los OGM presentes en los alimentos procesados y ultra-procesados respecto a la seguridad alimentaria nacional. El procedimiento se encuentra en el Anexo N° 1.

Uno de los temas centrales tratados refiere a la selección de los parámetros los cuales se pueden visualizar de forma resumida en la Tabla 4 y en su totalidad en la sección 11.1.3 de la propuesta de procedimiento contemplada en el Anexo 1. En dicho apartado se propone utilizar parámetros

cualitativos y cuantitativos los cuales tienen como base lo propuesto por la ISO 21569:2005 (58) y la OMS (48) respecto a los análisis cualitativos cuyo método se centra en la detección de los elementos Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos*, y que deberán de ser verificados posteriormente con la detección de los eventos específicos. De igual manera, se propuso parámetros para medir el nivel de impacto de la comercialización de alimentos procesados y/o ultra-procesados con contenido transgénico en el ámbito nacional en la seguridad alimentaria considerando como un eje importante la soberanía alimentaria. Los resultados de la implementación del procedimiento propuesto permitirán estudiar situaciones como si el uso de ingredientes OGM aumenta la accesibilidad de alimentos a los consumidores, si se disminuye la venta de alimentos convencionales o si el valor nutritivo varía. En estos casos bastaría detectar cualitativamente la presencia o ausencia de OGM y registrar datos como precio, cantidad de productos en almacén, cantidad de ventas, etc. En otros casos, se necesitará tener información de las cantidades en las que los productos contienen OGM para el desarrollo de iniciativas legislativas como es el de determinar los umbrales de detección.

TABLA 4.- Parámetros propuestos para el análisis del impacto de la presencia de OGM en alimentos procesados y ultra-procesados respecto a la seguridad alimentaria nacional.

Pilar de la Seguridad Alimentaria	**Parámetro**	**Interpretación**
Disponibilidad	*Presencia en el mercado de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM*	Porcentaje de productos con detección positiva o negativa de OGM que son ofertados a nivel nacional, regional y/o local respecto al total de la muestra de la categoría de alimentos en estudio
Accesibilidad	*Fluctuaciones de los precios de productos con detección positiva o negativa con ingredientes GM*	Porcentaje de productos con detección positiva o negativa de OGM que han modificado su precio en un periodo de tiempo respecto al total de la muestra de la categoría en estudio en el tiempo inicial
		Porcentaje de variación de precios de productos de la muestra con detección positiva o negativa de OGM en un periodo de tiempo

Accesibilidad	*Adquisición de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM*	Porcentaje de productos con detección positiva o negativa de OGM que son adquiridos por el consumidor a nivel nacional, regional o local respecto al total de la muestra de la categoría de alimentos en estudio
Uso	*Aumento o disminución del valor nutricional de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM*	Porcentaje de variación de contenido de macronutrientes o micronutrientes de productos de la muestra con detección positiva o negativa de OGM en un periodo de tiempo
Estabilidad	*Cumplimiento voluntario de la Ley 29571 respecto a la declaración de contenido de ingredientes modificados en productos con detección positiva o negativa de OGM*	Porcentaje de productos con detección positiva o negativa de OGM con declaración de ingredientes GM en sus etiquetados respecto al total de la muestra de la categoría de alimentos en estudio

En el apartado 11.1.4.2, se propone alimentos que se encuentran en la categoría de alimentos procesados y/o ultra-procesados siguiendo la categorización del Codex Alimentarios (80). Sin embargo, se puede aumentar o disminuir los alimentos propuestos dependiendo de factores como cultura, hábitos de consumos, importación de alimentos envasados, etc; siempre y cuando correspondan a las definiciones de alimentos procesados y/o ultra-procesados. (62)

El mantenimiento de la cadena de frio durante el muestreo es fundamental debido a que los alimentos pueden cambiar sus valores fisicoquímicos, organolépticos y microbiológicos; y por lo tanto modificar su matriz alimentaria. Es por ello que se dividen en dos grupos: Alimentos perecibles y no perecibles. De acuerdo con las disposiciones del Ministerio de Salud del gobierno peruano (81), un alimento perecible es aquel que para su conservación requiere ser almacenados en condiciones de refrigeración o congelación; mientras que, un alimento no perecible es aquel que para su conservación no necesita dichos procesos térmicos, aunque si puede requerir condiciones controladas de humedad, temperatura u otras. Por lo tanto, en caso las muestras correspondan a la categoría de alimentos perecibles es crítico mantener la cadena de frío. De no ser así, los cambios en la composición del alimento podrían implicar un aumento en el pH y el aumento de la flora

microbiana. Ambas situaciones serían un obstáculo en la obtención de una adecuada extracción de ADN.

6.2 PILOTO DEL PROCEDIMIENTO PROPUESTO: HOT DOG

6.2.1 SELECCIÓN DE MUESTRA PARA ENSAYO PILOTO

Considerando los criterios señalados en el apartado 5.2.2, se ha elegido como población de estudio las salchichas tipo Hot Dog de pollo. En este sentido, cada marca de esta categoría de alimento representa una unidad experimental.

La selección de este alimento se basó por tener muestras con declaración de contenido transgénico con estudios previos por Marcellino (37), Kim (82), Taski-Ajdukovic (38), entre otros; en referencia al análisis de OGM y por tener unidades experimentales sin declaración OGM con sus respectivas marcas registradas y registro sanitario. Asimismo, y tal como se aprecia en las ilustraciones 1, 2 y 3, dentro de la categoría de embutidos, los Hot Dog son los que tienen una tendencia alta de crecimiento tanto de producción como de consumo a nivel nacional. (64). Por otro lado, es importante señalar que cada muestra representa a una marca independiente; es decir, no hay dos unidades experimentales en el estudio que representen a una sola empresa.

6.2.2 MUESTREO

6.2.2.1 SELECCIÓN DE PUNTO DE MUESTREO

El ensayo piloto tuvo como lugar de ejecución la región de Lima, específicamente la ciudad de Lima Metropolitana. De acuerdo con los datos del INEI, la población total estimada en Lima en el año 2018 es de 9 millones 320 mil habitantes. (83)

De acuerdo con los criterios señalados en el protocolo propuesto, tal ciudad sería considerada como una "ciudad mayor". Por lo cual, correspondería muestrear en mercados mayoristas, grandes mercados minoristas o supermercados.

Tabla 5.- Distritos con mayor población en la región de Lima Metropolitana

DISTRITO	POBLACIÓN (2013)
San Juan de Lurigancho	1 047 725*
San Martin de Porres	673 149*
Ate	592 345*
Comas	520 403 *

(*) Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática – Perú: Estimaciones y proyecciones de población por sexo, según departamento, provincia y distrito, 2000-2015-Boletín Especial N° 18.

Considerando que la población del sector socioeconómico medio está en incremento y que el distrito de San Juan de Lurigancho es el de mayor población (Ver Tabla 5); la ubicación de muestreo se realizaría en uno de los supermercados de dicho distrito.

De acuerdo con el INEI (84), 6,6 millones de unidades productivas en Perú se desenvuelven en el sector informal. Asimismo, entre las actividades de pesca y agropecuaria el 91% del total de empresas son informales. Sobre la base de la información expuesta, se tomó en cuenta la selección del lugar de muestreo. Asimismo, el centro de abastecimiento donde se realizó el muestreo consideró las

existencias de espacios informales donde el volumen de ventas es mayor que las de un mercado minorista.

6.2.2.2 SELECCIÓN DE TAMAÑO DE MUESTRA

Se visitaron los principales supermercados del distrito de San Juan de Lurigancho y se procedió con el registro de todas las unidades experimentales que se comercializaban en el mes de junio del año 2017. Los resultados se encuentran en la Tabla 6 donde se podrá apreciar las diferentes marcas expendidas codificadas como A01, A02, A03, A04, A05 y A06.

Considerando la fórmula para hallar el tamaño de muestra de una población conocida de embutidos tipo salchichas tipo Hot Dog de pollo con un nivel de confianza de 95%, descrita en el procedimiento propuesto (Anexo N° 1), resulta que deben ser objeto de estudio las seis muestras que se identificaron de acuerdo en la Tabla 6.

TABLA 6.- Unidades experimentales expendidas en diferentes supermercados ubicados en el distrito de San Juan de Lurigancho en el mes de junio de 2017.

Muestra	Supermercado A	Supermercado B	Supermercado C
A01	11	15	16
A02	21	25	19
A03	13	09	14
A04	4	17	23
A05	19	17	11
A06	22	-	-

6.2.2.3 SELECCIÓN DE TOMA DE MUESTRA

Para asegurar la representatividad de la muestra se decidió realizar un muestreo probabilístico aleatorio simple y por conglomerados, según el caso. No se seleccionó ni sistemático ni el estratificado porque en la gran mayoría de los casos la población de estudio tiene menos de 10 unidades experimentales; mientras que en el caso del muestreo aleatorio simple esto no representa un inconveniente. Por otro lado, el muestreo por conglomerado permitió realizar un muestreo en el caso de las muestras que se encuentran agrupadas en un solo envase, como es el caso de los Hot Dog (85). Otro ejemplo de ello es el caso de los "panes de moldes" en los cuales sus presentaciones pueden tener entre 10 a 30 tajadas.

6.2.2.4 ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

La siguiente Figura 9 muestra el proceso de acondicionamiento como en el apartado 5.2.4.1. con modificaciones específicas para la matriz alimentaria de la muestra seleccionada: Salchichas tipo Hot Dog de pollo.

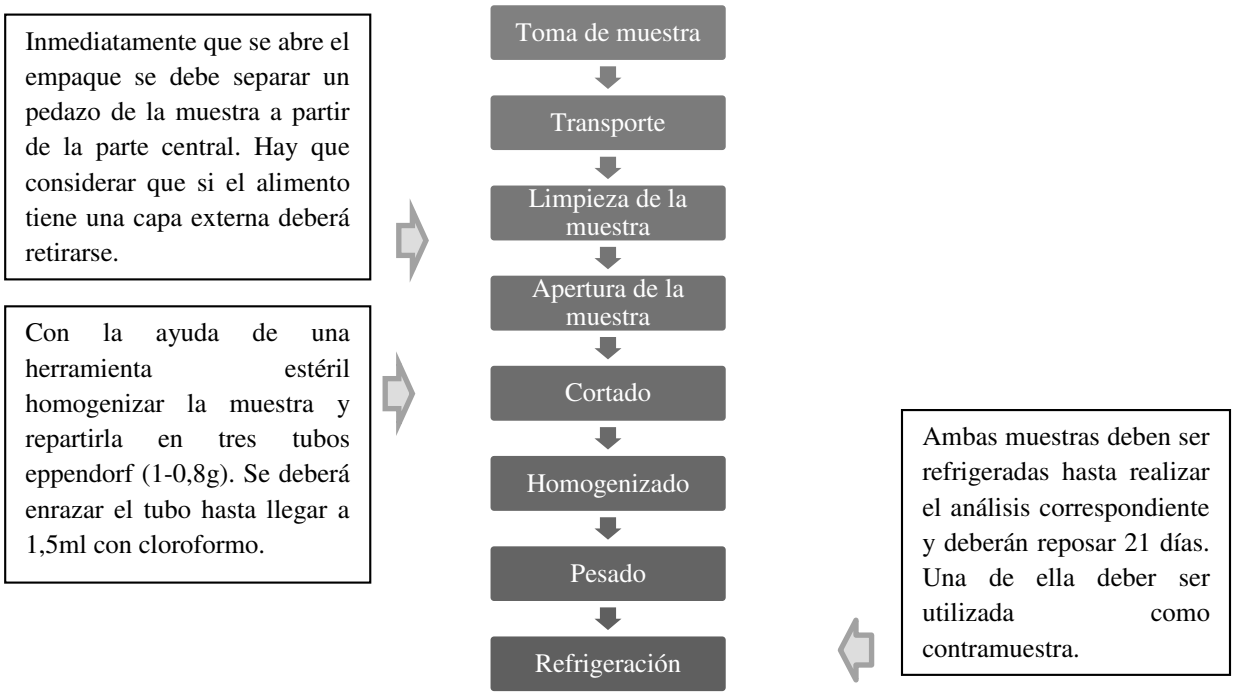


FIGURA 9.- Proceso de acondicionamiento de la muestra "salchichas tipo Hot Dog de pollo".

6.3 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

En la Tabla 7 se puede apreciar los valores de pH de las muestras A01, A02, A03, A04, A05 y A06 determinados mediante el método potenciométrico en el cual se utilizó 5g de muestra homogenizada con 20 ml de agua destilada de primer uso. Las mediciones se realizaron por triplicado.

TABLA 7.- Evaluación de pH en muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo

Muestra	pH
A01	6,01
A02	5,88
A03	5,13
A04	6,1
A05	6,77
A06	6,79

6.4 EXTRACCIÓN DE ADN

En la Figura 10 se puede observar la electroforesis producto del primer ensayo que tuvo por objetivo seleccionar el mejor método de ensayo de extracción de ADN que permita la obtención de bandas claras. Por lo tanto, se utilizaron los Kits I y II. El procedimiento se desarrolló según lo descrito por el fabricante.

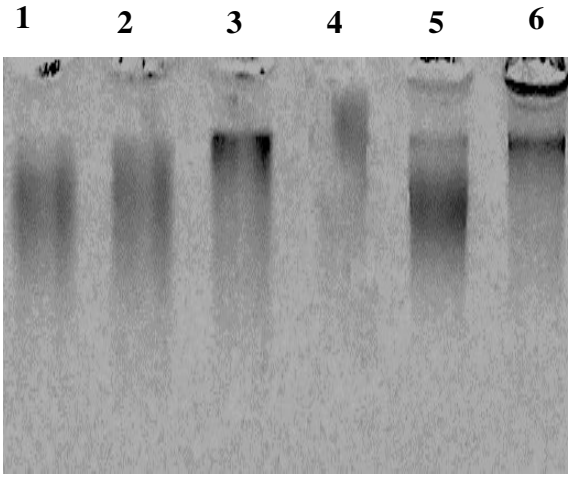


FIGURA 10.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% para extracción de ADN con los Kit I y II de las muestras de Salchichas tipo Hot Dog de pollo (A03 y A06) a los 35min.

1: H2O ***Kit I*** (Carril 2 y 3) **2**: A06, **3**: A03 **4**: H2O ***Kit II*** (Carril 5-6) **5**: A06 **6**: A03

Tal como se ve en la Figura 10, se obtuvo mejores resultados con el Kit II donde las bandas son más definidas y claras en comparación con las que representan al Kit I. Es importante recordar que el cloroformo, el cual es utilizado en el método del Kit II, permite la separación de las fases durante la centrifugación: La fase superior acuosa, donde están presentes los ácidos nucleicos, y la fase inferior, donde se encuentra el cloroformo, y las demás moléculas como proteínas y grasas (86). Por lo tanto, el uso de este solvente polar es crítico debido a la matriz alimentaria del Hot

Dog, tal como se observa en la Tabla 2, las cantidades de proteínas y grasas son significativas siendo 11g y 34,3g respectivamente por cada 100g de muestra.

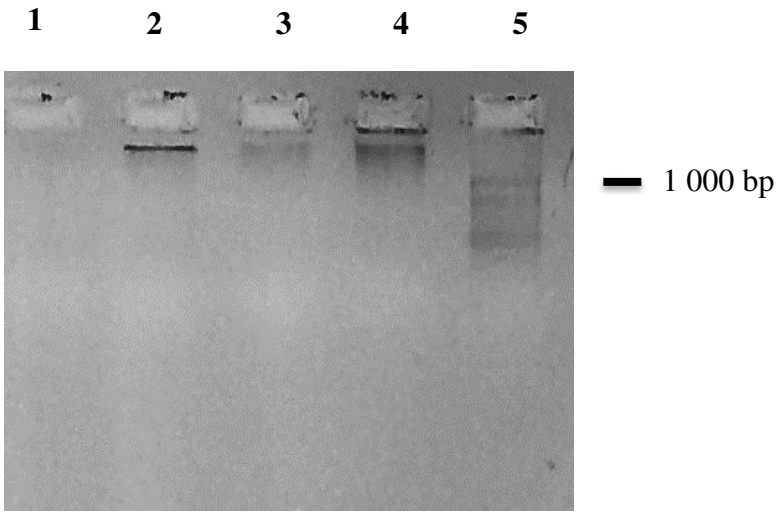


FIGURA 11.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para extracción de ADN de las muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo almacenadas en cloroformo por 21 días en diferentes pesos iniciales a los 35 min.

Peso de muestras 0,08g (Carril 1 y3) **1**: A06 **3**: A03 ***Peso de muestra 0.23g*** (Carril 2 y 4) **2**: A06 **4**: A03 **5**: Peso Molecular

Sobre la base de las ideas expuestas se decidió realizar tres modificaciones: 1) Almacenar las muestras en cloroformo durante 21 días, 2) Agregar proteinasa *K* 20µl a 56°C por 25min, enzima proteolítica que lisa las proteínas de la membrana celular, para que se obtuviera una mejor extracción; y 3) disminuir las cantidades de las muestras (80mg y 230mg). Según Alvis-Arango (86) dichas cantidades influyen en la obtención de ADN. Asimismo, la proteinasa *K* mejora la liberación del ADN al medio acuoso, más aún si la muestra contiene casi un 11% de proteína.

Como se aprecia en la Figura 11, se visualizó en el perfil electroforético bandas definidas en aquellas muestras en las que se pesó 80mg de cada una. Por lo tanto, se procedió a realizar la extracción de ADN de las seis muestras de estudio (A01, A02, A03, A04, A05 y A06) utilizando

el Kit II pero con las modificaciones realizadas (Referente al uso de proteinasa K, disminución del peso de la muestra, almacenamiento de las misma durante 21 días en cloroformo). En la Figura 12 se aprecia el resultado.

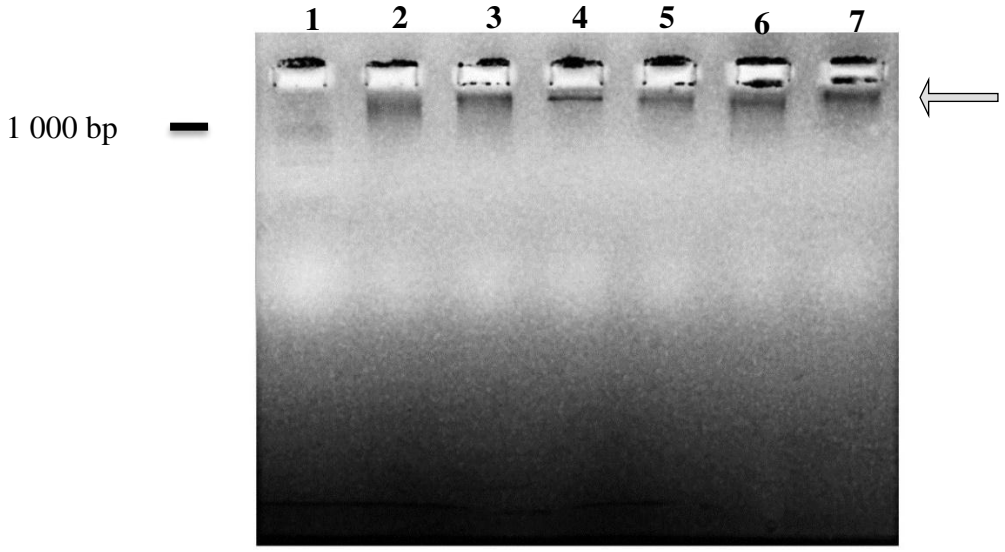


FIGURA 12.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para extracción de ADN de muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo almacenadas en cloroformo durante 21 días a los 35 min.

1: Peso molecular **2**: A01 **3**: A02 **4**: A03 **5**: A04 **6**: A05 **7**: A06

6.5 IDENTIFICACIÓN DE PROMOTOR 35S CAMV Y TERMINADOR *NOS*

Las condiciones utilizadas en el PCR para detección de los elementos Promotor 35S CaMV y Terminador *nos* son las mismas para ambos y se encuentran descritas en la Tabla 8. Asimismo, para determinar los parámetros correctos en el mix de PCR se procedió a realizar diferentes ensayos de concentraciones de cebadores y de MgCl2. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

TABLA 8.- Condiciones de PCR utilizadas para la detección del Promotor 35S CaMV y Terminador *nos*

Cebador	Desnaturalización	Amplificación	N° de ciclos	Extensión final
p35S-cf3/ p35S-cr4 **HA-nos 118-f/ HA-nos 118-r**	3 min – 95° C	25s -95° C; 30s -62° C; 45s – 72° C	50	7 min – 72° C

En el caso del Promotor 35S CaMV se probaron concentraciones de MgCl2 de 2,5mM, 2mM y 1,5mM, mientras que en el caso del cebador se evaluaron concentraciones de 0,5 µM, 0,3 µM y 0,2 µM. En la Figura 13 se obtuvo una banda definida de 123bp a concentraciones de MgCl2 de 2mM y del cebador de 0,5 µM.

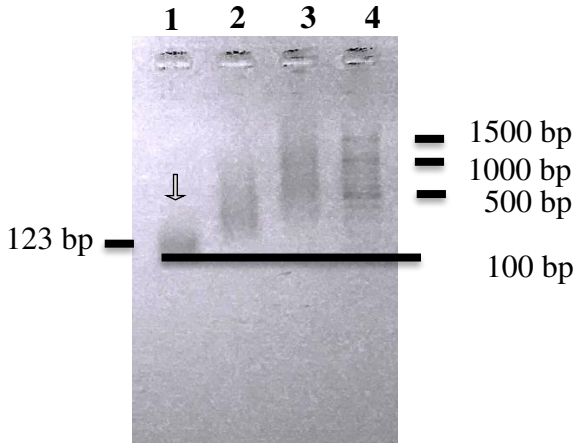


FIGURA 13.- Promotor 35S CaMV: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de muestra A03 a los 25 min.

Cebador 0.5 µM (Carril 1-3) **1**: MgCl2 2mM **2:** MgCl2 2.5mM **3**: H2O **5**: Peso Molecular 100bp

En la Figura 14 se aprecia el resultado de la identificación positiva del Promotor 35S CaMV en las muestras A03, A04, A05 y A06, las cuales siguieron el procedimiento con los parámetros determinados en el ensayo anterior.

Tabla 9.- Solución maestra para PCR del Promotor 35S CaMV y Terminador *nos* para un total de 25µl.

Reactivos	Concentración final	
	Promotor 35S CaMV	**Terminador *nos***
Agua grado BM*	-	-
10X Buffer de PCR	1X	1X
25mM $MgCl_2$	2,5mM	2,5mM
10mM dNTPs	0,2mM	0,2mM
20µM Cebador 1	0,5µM	0,1 µM
20µM Cebador 2	0,5µM	0,1 µM
Taq DNA polimerasa 5U/ µl	1,5 µl	1,5 µl

(*) BM: grado biología molecular

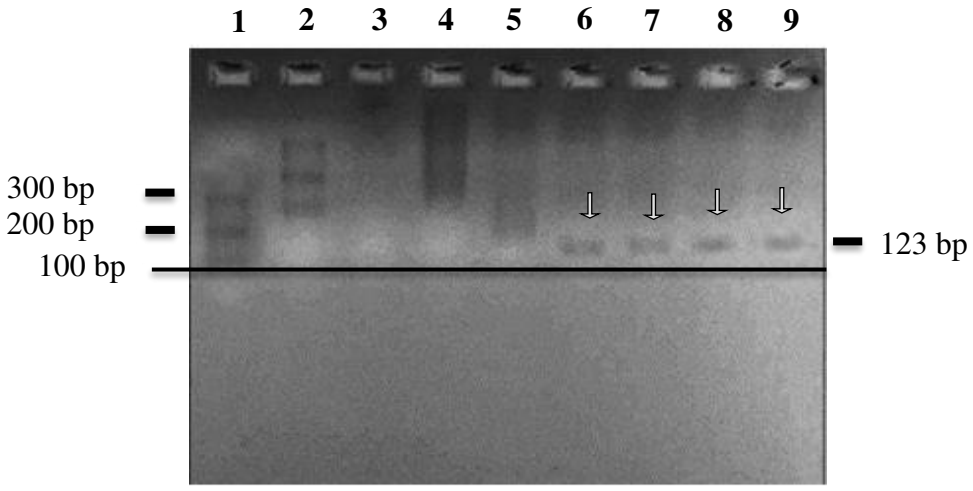


FIGURA 14.- Promotor 35S CaMV: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo a los 30 min.

1: Peso Molecular 20bp **2**: Peso Molecular 50bp **3**: H2O **4**: A01 **5**: A02 **6**: A03 **7**: A04 **8**: A05 **9**: A06

Como se aprecia en la Figura 15, se evaluó las concentraciones óptimas para el elemento Terminador *nos*. Las concentraciones estudiadas fueron para el cebador de 0,1 µM, 0,2 µM y 0,25µM y para el MgCl2 de 2mM, 2,5mM y 3mM. En la misma ilustración se observa que se obtuvo una banda de 118bp cuando las concentraciones del cebador se encontraban en 0,1 µM y

del MgCl2 en 2,5mM. Caso contrario es cuando las concentraciones del cebador se encuentran en 0,2µM y 0,25 µM donde las bandas se encuentran bajo los 118bp y sobre dicho tamaño respectivamente.

Los resultados de las seis muestras, las cuales consideran las concentraciones ensayadas previamente, se pueden ver en la Figura 16 en la cual se identifica un resultado positivo para la identificación del Terminador *nos* en las muestras A03, A04, A05 y A06 con un tamaño de 118bp.

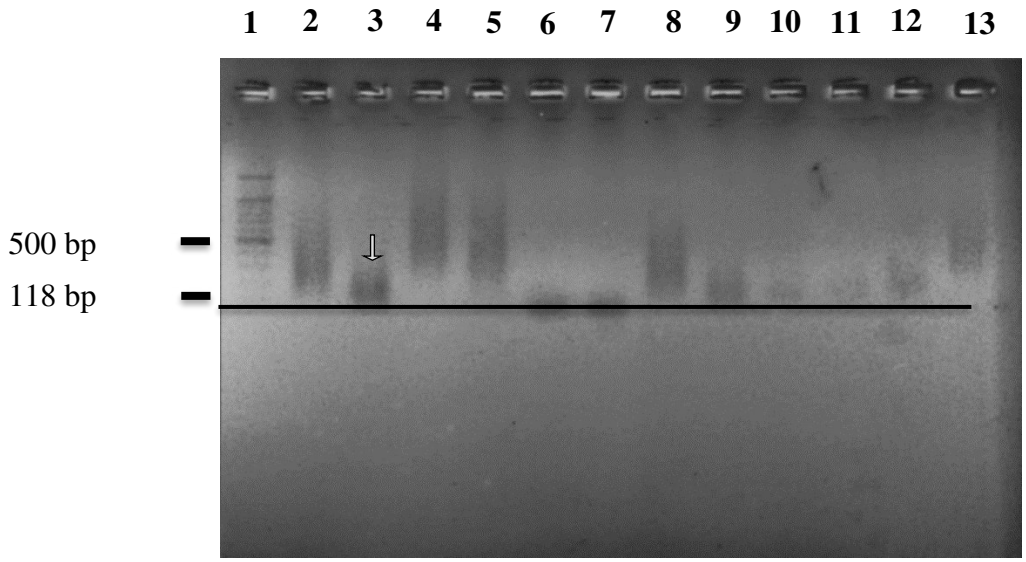


FIGURA 15.- Terminador *nos*: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo a los 35 min.

1: Peso molecular ***Cebador 0,1 µM*** (Carriles 2-5) **2**: MgCl2 2mM 3: MgCl2 2.5mM **4**: MgCl2 3mM **5**: H2O ***Cebador 0,2 µM*** (Carriles: 6-9) **6**: MgCl2 2mM **7**: MgCl2 2,5mM **8**: MgCl2 3mM **9**: H2O ***Cebador 0,25 µM*** (Carriles 10-13) **10:** MgCl2 2mM **11**: MgCl2 2,5mM **12**: MgCl2 3mM **13**: H2O

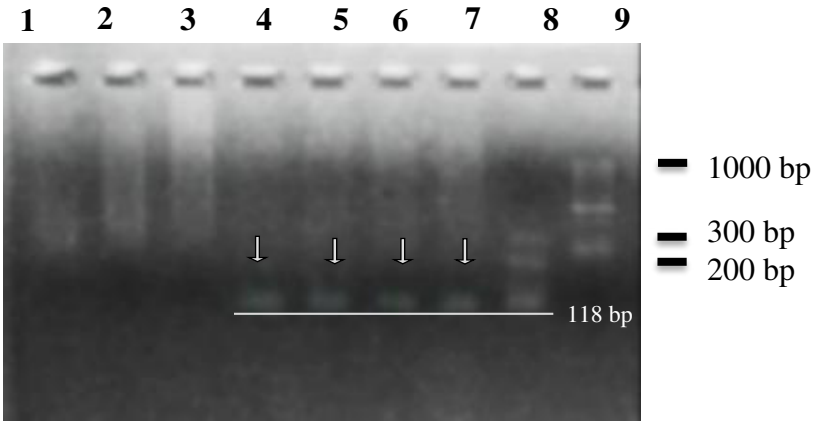


FIGURA 16.- Terminador *nos*: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo a los 30 min.

1: H2O **2**: A01 **3**: A02 **4**: A03 **5**: A04 **6**: A05 **7**: A06 **8**: Peso Molecular 20bp **9**: Peso Molecular 50bp

TABLA 10.- Resultados de la identificación de presencia de OGM en muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo en junio de 2017

Muestra	Promotor 35S CaMV	Terminador *nos*	Declaración OGM	Declaración Proteína de soya	Declaración Fécula	Precio promedio*** 250g	
A01	No Detectado	No Detectado	Si	Si (OGM)	**	3,99	4,10
A02	No Detectado	No Detectado	Si	Si (OGM)	Si (OGM)	5,79	5,79
A03	Detectado	Detectado	Si	Si (OGM)	Si (OGM)	3,8	3,9
A04	Detectado	Detectado	No	-	Si	4,59	4,6
A05	Detectado	Detectado	No*	Si (OGM)	**	3,99	3,89
A06	Detectado	Detectado	Si	Si (OGM)	Si (OGM)	5,10	5,29

*En un re-muestreo a inicios del 2018 se evidenció que la muestra A05 realizó un cambio en su etiquetado mediante el cual ahora declara contenido OGM
**Dicho producto contiene almidón. En el caso de la muestra A01 como almidón de trigo y en el A05 como almidón modificado.
*** Precio promedio de las salchichas tipo Hot Dog de Pollo en junio de 2017 y febrero 2018

Como se observa en la Tabla 10 y 11 se detectó que un 66,7% de las muestras analizadas presentaban posible contenido de OGM los cuales deberán ser verificados mediante la identificación específica de un evento transgénico. El 75% de productos en los cuales se detectó posible presencia de OGM mediante la identificación de los elementos Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos*, presentan los ingredientes de fécula y/o proteína de soya. Sin embargo, no se encuentra diferencia significativa según la prueba exacta de Fisher ($p>0.05$). Asimismo, del total

de muestras se verificó que el 83,3% de ellas tienen declaración de ingredientes transgénicos lo cual significa un comportamiento positivo en el mercado cada vez que, a pesar, que no están obligados a realizarlo, lo declaran de forma voluntaria. Por otro lado, entre las muestras en las que se detectó posible contenido transgénico el 75% lo declaraba en las etiquetas.

6.6 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

TABLA 11.- Parámetros para evaluar el impacto en la seguridad alimentaria de la comercialización de salchichas tipo Hot Dog de pollo en la región de Lima Metropolitana en junio 2017

Parámetro	Interpretación	Fórmula	Aplicación de fórmula	Resultado (%)
Presencia en el mercado de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM	*Porcentaje de salchichas tipo Hot Dog de pollo en los cuales se obtuvo una detección positiva de OGM que son ofertados.*	$\left(\frac{Productos\ con\ detección\ positiva\ de\ OGM\ de\ la\ muestra\ (productos\ ofertados)}{Tamaño\ de\ la\ muestra\ de\ los\ productos\ ofertados}\right) \times 100$	$\frac{4}{6} \times 100$	*66,7%*
	Porcentaje de salchichas tipo Hot Dog de pollo en los cuales se obtuvo una detección negativa de OGM que son ofertados.	$\left(\frac{Productos\ con\ detección\ negativa\ de\ OGM\ de\ la\ muestra\ (productos\ ofertados)}{Tamaño\ de\ la\ muestra\ de\ los\ productos\ ofertados}\right) \times 100$	$\frac{2}{6} \times 100$	*33,3%*
Fluctuaciones de los precios de productos con detección positiva o negativa con ingredientes GM	*Porcentaje de salchichas tipo Hot Dog de pollo en los cuales se obtuvo una detección positiva de OGM que han modificado su precio entre junio de 2017 y febrero de 2018*	$\left(\frac{Productos\ con\ detección\ positiva\ de\ OGM\ en\ el\ tiempo\ inicial\ que\ modificaron\ sus\ precios\ en\ un\ periodo\ de\ tiempo}{Tamaño\ de\ la\ muestra\ en\ el\ tiempo\ inicial\ del\ periodo\ en\ estudio}\right) \times 100$	$\frac{6}{6} \times 100$	*100%**
	Porcentaje de salchichas tipo Hot Dog de pollo en los cuales se obtuvo una detección negativa de OGM que han modificado su precio entre junio de 2017 y febrero de 2018	$\left(\frac{Productos\ con\ detección\ negativa\ de\ OGM\ en\ el\ tiempo\ inicial\ que\ modificaron\ sus\ precios\ en\ un\ periodo\ de\ tiempo}{Tamaño\ de\ la\ muestra\ en\ el\ tiempo\ inicial\ del\ periodo\ en\ estudio}\right) \times 100$	$\frac{2}{6} \times 100$	*0%*
	Porcentaje de variación de precios promedios de salchichas tipo Hot Dog de pollo con detección positiva de OGM que son comercializadas entre junio de 2017 y enero de 2018	$100 * \frac{(O_f - O_\circ)}{O_\circ}$	$\frac{(4.42 - 4.37)}{4.37} \times 100$	1,14%
	Porcentaje de variación de precios promedios de salchichas tipo Hot Dog de	$100 * \frac{(C_f - C_\circ)}{C_\circ}$	$\frac{(4.94 - 4.89)}{4.89} \times 100$	*1.02% **

	pollo con detección negativa de OGM que son comercializadas entre junio de 2017 y enero de 2018			
Adquisición de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM	*Porcentaje de salchichas tipo Hot Dog de pollo con detección positiva o negativa de OGM que son adquiridos por el consumidor*	$\left(\frac{\text{Productos con detección positiva de OGM de la muestra (productos comprados por el consumidor)}}{\text{Tamaño de la población que son ofertados}}\right) \times 100$ $\left(\frac{\text{Productos con detección negativa de OGM de la muestra (productos comprados por el consumidor)}}{\text{Tamaño de la población que son ofertados}}\right) \times 100$	**	**
Aumento o disminución del valor nutricional de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM	*Porcentaje de variación de contenido de macronutrientes o micronutrientes de salchichas tipo Hot Dog de pollo detección positiva o negativa de OGM entre junio de 2017 y enero de 2018*	$100 * \frac{(OV_f - OV_\circ)}{OV_\circ}$ $100 * \frac{(CV_f - CV_\circ)}{CV_\circ}$	***	***
Cumplimiento voluntario de la Ley 29571 respecto a la declaración de contenido de ingredientes modificados en productos	*Porcentaje de salchichas tipo Hot Dog de pollo con declaración de ingredientes GM en sus etiquetados*	$\left(\frac{\text{Productos de la muestra con declaración en la etiqueta de contenido de OGM entre los ingredientes}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$	$\frac{5}{6} \times 100$	*83,3%*
	Porcentaje de salchichas tipo Hot Dog de pollo sin declaración de ingredientes GM en sus etiquetados	$\left(\frac{\text{Productos de la muestra sin declaración en la etiqueta de contenido de OGM entre los ingredientes}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$	$\frac{1}{6} \times 100$	*16,7%*

*Es importante señalar que dentro de los productos en los cuales no se detectó el promotor 35SCaMV y el Terminador *nos* dichos productos si declaraban contenido de ingredientes GM. Ver tabla 10.

**Dicho parámetro no pudo ser valuado debido a que no se encuentra disponible información sobre la cantidad de productos de la muestra que es adquirida por los consumidores en junio de 2017.

** Dicho parámetro no pudo ser evaluado puesto que ninguna de las muestras en estudio declaró información nutricional.

7 DISCUSIÓN

Para desarrollar propuestas que contribuyan a la seguridad alimentaria se debe analizar sus cuatros pilares – accesibilidad, disponibilidad, utilización y estabilidad – de forma tal que se desarrollen mecanismos que permitan a un país su logro. En la actualidad, los productos de la biotecnología moderna son parte de la dieta alimentaria de los consumidores y, por tanto, como cualquier otro alimento, puede tener un impacto sea negativo o positivo. Durante años se ha estudiado como los productos envasados, los estilos de vida, la comida rápida, entre otros; impactan en la seguridad alimentaria con factores como: si tienen un adecuado valor nutricional, son de menores costos, están estratégicamente ubicados a nivel nacional, predisponen a una persona a sufrir enfermedades, etc. Los transgénicos no deben ser apartados del mismo análisis. Por otro lado, Perú tiene diversas iniciativas legales para el monitoreo de los OVM, pero no hace hincapié en la vigilancia de los

derivados de OGM o de los productos que los contienen que son parte de la formulación de los alimentos procesados y ultra-procesados.

Atendiendo a estas consideraciones, la presente tesis tiene como objetivo desarrollar una propuesta de procedimientos que permita, entre otros, a las entidades del gobierno tener una base para realizar monitoreos de forma tal que se tengan suficientes datos que sirvan para evaluar cómo impacta en la seguridad alimentaria el uso de ingredientes OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados de consumo diario.

Por ello la primera parte del estudio fue el desarrollo de dicho protocolo en el cual se consideró diferentes documentos legales implementados en varios países para el monitoreo de los OGM. Los parámetros propuestos referentes a la variación de la oferta, demanda, precios, valor nutricional y la declaración de OGM permiten evaluar algunos indicadores de la seguridad alimentaria respecto a disponibilidad, acceso y uso de los alimentos en nuestro país coincidiendo con el planteamiento de la FAO (41) para evaluarla. Sin embargo, el enfoque de dicha institución es diferente debido a que su intención es evaluar el mercado bajo una situación en riesgo. Es importante resaltar que los parámetros propuestos son utilizados para medir otros indicadores macros como son para el caso de la disponibilidad, por ejemplo, el suministro de energía alimentaria promedio, prevalencia de subalimentación, volatilidad de los precios nacionales de los alimentos, etc. (87)

La segunda parte del estudio refiere al desarrollo de un ensayo piloto del protocolo propuesto descrito para alimentos procesados y ultra-procesados. En el caso de la presente tesis la población de estudio fueron los “salchichas tipo Hot Dog de pollo”. La exposición a altas temperaturas es un factor importante para la detección de OGM debido a que este tipo de alimento recibe tratamientos térmicos de escaldado lo cual implica estar expuesto a temperaturas entre 75°C y 80°C (65). Tal

como comenta González-Morales (88), utilizando PCR es posible detectar elementos transgénicos como el Promotor 35S y el gen cry1 en alimentos procesados lo que sugiere que dichos fragmentos son resistentes a cambios de pH y temperatura. Sin embargo, el mismo estudio concluye que las proteínas cry1AB/1AS son más susceptibles, factores que son necesarios considerar para la elección del método de detección de OGM. Asimismo, Vijayakumar (89) demostró una alta correlación entre procesos térmicos y la calidad del ADN extraído y por ello el efecto del procesamiento en la degradación del ADN debe ser entendido claramente para elegir los métodos de detección dado que la exposición del ADN a temperaturas altas podría provocar mayor degradación y, por tanto, una deficiente extracción.

Otro factor que considerar es la variación en los ingredientes lo cual influye en las modificaciones en las metodologías para la obtención de un ADN más puro. Si evaluamos las conclusiones y metodologías realizadas por diversos autores en varios países, sus condiciones para la extracción de ADN varían (86) (90) (38) (91) según matriz alimentaria. En el caso de los embutidos comercializados en Perú sus ingredientes son diferentes en comparación con los que se venden en los países de El Salvador y Panamá (Anexo 7), y por lo tanto, la matriz alimentaria es diferente. Por ejemplo, los Hot Dog comercializados en ambos países de Centroamérica contienen tipos de fécula diferentes y adicionan en su gran mayoría grasas.

En la Figura 12, la variación en la definición de las bandas puede deberse, entre otros factores, por la variación del pH de la unidad experimental. Los resultados del análisis fisicoquímico mostraron que el rango de pH de las muestras analizadas se encontraba entre 5,13 – 6,79, lo cual probablemente influyó en la claridad de las bandas, en especial en la muestra A01. Según lo reportado por Bauer (92), el ADN debe ser detectable en alimentos ácidos especialmente cuando

han pasado por un tratamiento térmico. Por otro lado, Bauer indicó que se encontraron fragmentos de ADN superiores de 714bp en productos ultra-procesados de soya.

Para la extracción se compararon dos kits de extracción (Gene JET y Genomic DNA) la diferencia entre ambos es el procedimiento. El primero utiliza columnas de purificación mientras que el segundo cloroformo. En la Figura 10 podemos observar que se obtuvo bandas más definidas en las dos muestras cuando se utilizó el Kit II, el cual utiliza el solvente apolar. Estos resultados coinciden con lo reportado por Taski-Ajdukovic (38) el cual utilizó el método CTAB que incluye el uso de cloroformo el cual permite la separación de la fase acuosa y orgánica.

La claridad de las bandas que se observan en la Figura 11 es gracias a la adición de la enzima proteinasa *K*, como ocurrió con el análisis de Marcellino (37). En dicho estudio se utilizaron dos métodos de extracción de ADN para muestras de embutidos, uno de ellos fue el método modificado de Wizard en el cual se usó proteinasa *K* y el otro fue el método CTAB. Sus resultaron mostraron que a pesar de que en ambos casos de obtuvo una buena calidad de ADN el método modificado de Wizard se degradó menos, presentó fragmentos más largos y menos contaminantes en comparación del método CTAB

Sin embargo, dicha enzima se ve influenciada en gran medida por el pH. De acuerdo con las especificaciones del producto es estable en un rango de pH de 4,0 – 12,5 pero su grado óptimo es de 7,5 – 8,0 (93). Como se comentó anteriormente las muestras tienen un pH entre 5,13 – 6,79 por lo cual posiblemente esto haya sido un factor para no obtener bandas totalmente claras. Por lo tanto, para mejorar la definición de las bandas se procedió a almacenar las muestras en cloroformo por 21 días considerando que dicho solvente desnaturaliza las proteínas y la alta cantidad en que los

embutidos las contienen. También facilita la disgregación de proteínas y grasas mejorando la optimización de la lisis y la enzima proteinasa K. (48).

En la Figura 11, se aprecia que las muestras que utilizaron un peso inicial de 80mg, junto con las modificaciones discutidas en las líneas anteriores, presentaron bandas definidas y claras en comparación cuando se utilizó 230mg. Estos resultados son similares a lo reportado por Marcellino (37) en el cual usando muestras de embutidos de 100mg adecuadamente homogenizadas se optimizó el método de extracción de ADN.

Para la detección de contenido transgénico se pueden utilizar métodos basados en proteínas o en ADN. La metodología planteada utilizó el segundo debido a que la primera presenta dificultades para matrices complejas de alimentos como son los alimentos procesados y/o ultra-procesados en los cuales sus operaciones unitarias desnaturalizan la proteína y, por tanto, los métodos de inmunoensayos no pueden discriminar entre proteínas recombinantes expresadas de forma similar provocando falsos positivos. Lo anterior coincide con los métodos utilizados por investigadores como Shin (90), Ferreira (33), Carvajal (32), Mejía (35), Lipp (36), etc.

El método de cribado fue utilizado para la detección cualitativa de ADN GM mediante la identificación de los elementos reguladores Promotor 35S CaMV y el Terminado *nos*. Este método es considerado tanto por la Unión Europea (48), ISO 21569:2005 (58) y Suiza (94). En todos ellos se detalla que la detección de OGM mediante este método debe de ser confirmado mediante la identificación específica del OGM por PCR. Es importante mencionar que el promotor 35SCaMV derivado del virus mosaico de la coliflor es el elemento transgénico más abundante en ingeniería genética el cual está presente en 22 de 28 plantas. (94)

El protocolo propuesto para el monitoreo de OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados determina en su apartado 11.1.4.1, referente a la "selección de parámetros", que dependiendo de los objetivos se deberá de utilizar la identificación cualitativa y/o cuantitativa de OGM en alimentos. Por ejemplo, no se deberá realizar ensayos de cuantificación si primero no se detectó la presencia de elementos y/o eventos transgénicos, y solo en caso los parámetros lo requieran para medir adecuadamente su impacto en la seguridad alimentaria. Lo anterior coincide con las conclusiones de Ahmed (95) quien además de reportar que la metodología de identificación cualitativa de OGM por PCR, incluyendo nested PCR y GMO chips, tienen una alta sensibilidad y menor costo en comparación con el método de PCR en tiempo real, puntualiza que las regulaciones de la Unión Europea en este tema deben iniciar realizando métodos cualitativos por PCR para la identificación de alimentos GM.

Se seleccionó como cebadores para el Promotor 35S CaMV: 35S-cf3/35s-cr4 (123bp) y para el Terminador *nos*: Ha-*nos*-118f/Ha-*nos*-118r (118bp). Dicha elección coincidió con el análisis de Lipp (36) quien concluyó que, en el caso del Promotor 35S CaMV, otros cebadores utilizados como el 35S-1/35S-2 son menos eficientes y con un tamaño de amplificación más largo. Respecto al Terminador *nos*, tanto los cebadores Ha-*nos*-118f/Ha-*nos*-118r como nos-1/nos-2 tienen alta sensibilidad sin embargo el tamaño del amplificado del primero es más pequeño (118bp).

Los ADN extraídos de las muestras fueron analizados inicialmente con concentraciones para la solución maestra del PCR descritos en el manual para el análisis de la presencia de OGM en muestras de alimentos del Centro Común de Investigación de la Comisión Europea (JRC) y la OMS (48). Sin embargo, se obtuvieron amplificados con un tamaño de 300bp y no de 123bp y 118bp, los cuales identifican al Promotor 35S y al Terminador *nos*. Dicho resultado puede deberse probablemente porque las condiciones propuestas en dicho manual estaban optimizadas para

muestras de alimentos tipo leche de soya en polvo, galletas y harinas. Más aun considerando que si la estructura de ADN de los embutidos contuviera mayor proporción de los nucleótidos G/C, la temperatura de fusión mediante el cual el ADN pasa a ser monocatenario debería ser más alta. Es importante subrayar que otro factor son las limitaciones que el método de extracción modificado propuesto para esta categoría de alimentos pueda tener más aun cuando los principales inhibidores de la PCR para los embutidos son las sales de nitrato y la hemoglobina presente (96), quienes se encuentran en altas cantidades en los Hot Dog.

Considerando que para Innis, las concentraciones óptimas para el mix de PCR se obtiene empíricamente (53) y que otros estudios reportaron que dichas concentraciones para la identificación cualitativa del promotor 35S CaMV y el Terminador *nos* debe tener concentraciones entre 3,0 – 1,5mM para el MgCl2 y entre 0,1- 0,.5µM para cada cebador (39) (38) (37) (33), se procedió a modificar las concentraciones de ambos componentes hasta obtener la óptima para su identificación en muestras de Salchichas - Hot Dog de pollo.

Las concentraciones bajas de Mg+2 provocan un rendimiento bajo de amplificación, mientras que las concentraciones elevadas hacen que se acumulen productos inespecíficos; asimismo, concentraciones altas de los cebadores pueden provocar falsos positivos (96). Tomando en cuenta dichas aseveraciones se procedió a ensayar concentraciones de MgCl2 de 3,0mM, 2,5mM y 2,0mM y del cebador de 0,1µM, 0,2 µM, 0,3 µM. y 0,5 µM para ambos elementos transgénicos.

Las concentraciones óptimas obtenidas para el Promotor 35S CaMV fueron para sus cebadores de 0,5 µM y de 2mM.para el MgCl2. Mientras que para el Terminador *nos* las concentraciones optimas de sus cebadores fueron de 0,1 µM y 2,5mM para el MgCl2. Las concentraciones coinciden con lo reportado por Carvajal (32) quien utilizó la misma concentración de MgCl2 para la detección

del Promotor 35S CaMV en diferentes alimentos comercializados en Costa Rica. Lipp (36), por otro lado, utilizó concentraciones del cebador de 0,6 µM para la detección del promotor 35S y el Terminador *nos*, sin embargo, para cada uno modificó las concentraciones no solo del MgCl2 sino también de los dNTP y las condiciones del PCR.

Por otro lado, Marcelino (37) reportó que para la identificación del Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos* utilizó concentraciones de 0,2 µM para los cebadores y de 2mM para el MgCl2 en muestras de embutidos comercializadas en Brasil. La diferencia con nuestras concentraciones optimas reportadas posiblemente se deben a que Marcellino utilizó cebadores diferentes a los empleados por el presente estudio, teniendo en su caso amplicones de 195bp para el Promotor 35S CaMV y de 180bp para el Terminador *nos*. Además, en su estudio las condiciones del PCR fueron diferentes para cada elemento transgénico diferenciándose principalmente en la temperatura de hibridación donde se utilizó 62°C para el promotor 35S CaMV y 68°C para el Terminador *nos* pero disminuyendo 1°C por cada ciclo hasta llegar a 58°C.

Los resultados mostraron que se identificó el Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos* en cuatro (A03, A04, A05 y A06) de las seis muestras representando el 66,7% del total de la población de estudio. De acuerdo con la OMS (48) y la ISO 21569:2005 (58) la identificación de uno o ambos de los elementos sugiere la presencia de OGM en alimentos. Sin embargo, se debe identificar los eventos transgénicos específicos como son los conocidos soja Roundup Ready y MON 810. Es importante señalar que en la soja Roundup Ready, pueden detectarse tanto el Promotor 35S CaMV como el Terminador *nos*, mientras que en las líneas de maíz Bt-176 y MON810 sólo se da la presencia del Promotor 35S CaMV. Por tanto, según los análisis realizados el 66,7% de las muestras presentaban posible contenido transgénico en el producto final con alta concordancia (75%) con lo declarado en la etiqueta.

En la Tabla 10 se señala que, del total de muestras analizadas las cuales fueron adquiridas en junio de 2017 en la región de Lima, el 66,7% declaraban contenido transgénico, pero se hace hincapié que dicha cifra aumentó (83.3%) a inicios de 2018 mostrando un comportamiento positivo del mercado al declarar productos OGM a pesar de que en la actualidad la legislación no lo exija. Sin embargo, esta conclusión solo es válida en los productos tipo "salchichas tipo Hot Dog de pollo" por lo que es necesario verificarla comparándola con otros productos en el mercado de alto consumo como son las leches evaporadas, cereales, snacks, etc.

Igualmente, se observa que dentro de las muestras en las cuales se detectó posible presencia de contenido transgénico una de ellas (A04) no declaraba. Dicho resultado no se debe necesariamente a la presencia de OGM, puesto que esto debe ser identificado posteriormente, pero de encontrar un resultado positivo podría deberse a una contaminación no intencional en caso su formulación no contenga ingredientes OGM. Por tal motivo, en estos casos se justifica la necesidad de desarrollar umbrales de detección. Al mismo tiempo debe considerarse que según lo reportado por Lipp (36) para la validación de su método propuesto identificó la existencia de un 1,9% de falsos negativos en la identificación cualitativa del Promotor 35S CaMV y un 2,1% respecto al Terminador *nos*.

En el caso de las muestras A01 y A02 en las cuales no se detectó la posible presencia de OGM, pero el producto si declaraba ingredientes GM posiblemente se debió a que el producto haya sido sometido en su proceso de producción a altas temperatura. En el caso de la A01 puede deberse a que entre los ingredientes declarados se encuentra la proteína OGM, la cual no es detectada por el método PCR planteado. Sin embargo, dicha muestra si presenta almidón de trigo el cual podría no ser transgénico o su ADN se vio afectado por las temperaturas. No obstante, podemos identificar en la Tabla 7 que en el caso de la muestra A02, la cual, si contiene fécula con declaración OGM, tiene un pH bajo en comparación con las otras muestras afectando de igual manera las condiciones

del PCR (96). Asimismo, las limitaciones del método y la posible presencia de inhibidores afectarían el resultado.

Por otro lado, la Tabla 10 nos muestra que el 83,3% de los productos tipo salchichas tipo Hot Dog de pollo contiene ingredientes con declaración OGM siendo el caso de la proteína de soya y/o fécula los cuales se encuentran en la totalidad de las muestras. Estos resultados coinciden con lo reportado por Vilijoen (91) en el cual se detectó que de los productos con ingredientes como harina de soya y/o proteína de soya tenían un resultado positivo al 100% de alimentos OGM.

Vinculando los resultados a los parámetros propuestos para medir su impacto en la seguridad alimentaria nacional podemos concluir que, de tener una identificación positiva de los eventos específicos de transgénicos como la soja Roundap Ready o MON 810, el 100% de los productos salchichas tipo Hot Dog de pollo contienen ingredientes GM. De este modo se puede evaluar que posiblemente las empresas que manufacturan dichos alimentos se proveen solo de ingredientes OGM y por tanto esto podría significar posibles cambios en los precios de los productos volviéndolos más accesibles para los consumidores. Sin embargo, esto podría significar, de la misma manera, un impacto económico en los proveedores de ingredientes no GM.

Por otro lado, en la Tabla 11 observamos que el porcentaje de variación de precios de salchichas tipo Hot Dog de pollo es de 1,14% entre junio de 2017 y enero de 2018. De acuerdo a datos proporcionados por el INEI (97), Perú sufrió una inflación de precios entre noviembre y enero de 2017 ocasionando un alza, por ejemplo, de hasta 6.81% en el precio final al consumidor. Sin embargo, esto claramente no afectó de la misma manera a la industria que manufactura el tipo de alimentos que es objeto de estudio el cual, de verse afectado por la inflación, pudo pasar de un precio promedio por Kg de 17,30 soles a 18,5 soles. Por otro, lado en la misma tabla se visualiza

que entre los productos en los cuales no se detectaron los elementos reguladores Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos* la variación de los precios fue de 1.02%. Lo anterior también es sujeto del mismo análisis de entre los productos en los cuales si se detectó la presencia de los elementos transgénicos debido a que las muestras en su etiquetado declaran contenido de ingredientes GM.

En cuanto a la cantidad de productos que declaran contenido transgénico podemos observar que dentro del grupo de alimentos de salchichas tipo Hot Dog de pollo que son comercializadas en Lima Metropolitana el 83,3% de total de unidades experimentales indicaban contenido transgénico en su empaque siendo esto una declaración voluntaria por parte de las empresas puesto que hasta el momento Perú no cuenta con un reglamento que regule el etiquetado de los OGM a pesar que si está contemplado en la Ley de Protección y Defensa del Consumidor (13). En el caso del valor nutricional, este no puede ser evaluado porque ninguno de los productos declara la información nutricional.

Por tanto, tener analizado la información obtenida del monitoreo de productos ultra-procesados y/o procesados permite tener un panorama de su comportamiento en el mercado a lo largo del tiempo. El registro de esta información en base a parámetros no solo facultara a quien lo implemente a poder corroborar la información proveída por las empresas, sino que también permite analizar indicadores que evalúan el impacto de la comercialización de estos alimentos en la seguridad alimentaria nacional.

En síntesis, esta investigación es un aporte dentro del contexto de la seguridad alimentaria considerandos vacíos legales referentes al monitoreo de los OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados. Sin embargo, todavía es necesario la implementación de normas y técnicas moleculares complementarias.

8 CONCLUSIONES

1. La propuesta de procedimientos involucra las etapas de muestreo y análisis moleculares con los criterios desarrollados en otros países y se adapta a la realidad peruana para futuras situaciones reglamentarias en base a los resultados obtenidos del piloto técnico experimental que se realizó en embutidos tipo "s*alchichas tipo Hot Dog de pollo*" comercializados en la región de Lima.
2. Se estableció parámetros cuantificables para analizar el comportamiento de los OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados en el mercado nacional relacionados a los pilares de la seguridad alimentaria referentes a la accesibilidad, estabilidad, uso y disponibilidad. El ensayo piloto aportó evidencia preliminar al respecto.
3. El perfil electroforético presentó seis bandas visibles correspondientes a ADN genómico de las muestras de salchichas tipo Hot Dog de pollo utilizando un kit de extracción modificado con cloroformo, 0,1mg de muestra y la enzima proteinasa *K*.
4. Se logró adecuar la técnica molecular para la identificación del Promotor 35S CaMV y el Terminador *nos* a la matriz alimentaria en estudio obteniendo cuatro bandas correspondientes de 123bp y 118bp en las muestras A03, A04, A05 y A06 mediante la optimización de las condiciones de PCR modificando las concentraciones de los cebadores y del MgCl2.
5. En general, se identificó la presencia de los elementos reguladores Promotor 35S CaMV y Terminador *nos* indicando posible presencia de OGM en un 66,7% de la población de estudio "Salchichas tipo Hot Dog de pollo" comercializados en la región de Lima Metropolitana en junio de 2017 lo cual tiene una concordancia al 75% con lo indicado en las etiquetas del producto pudiendo implicar un impacto en la accesibilidad a los alimentos en el contexto de la seguridad alimentaria.

9 RECOMENDACIONES

Considerando los resultados hallados se recomienda:

1. Verificar la presencia de OGM en los alimentos que forman parte del presente estudio mediante la identificación de eventos específicos como son el casete genético CTP/EPSPS en la soja Roundup Ready y casete del Promotor E35S/exón-intrón de hsp70 del maíz MON 810;
2. Implementar otras técnicas moleculares para la de detección de OGM en diferentes categorías de alimentos; y
3. Se recomienda evaluar los resultados obtenidos con futuras investigaciones de forma tal que podamos analizar el comportamiento en el mercado de la presencia de OGM en alimentos ultra-procesados tipo “salchichas tipo Hot Dog de pollo” en el contexto legal y de la seguridad alimentaria.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Académia Mexicana de Ciencias. Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados. México:, Comité de Biotecnología; 2007.

2. Galperín C, Fernández L, Doporto I. El comercio exterior argentino y el etiquetado de transgénicos: una evaluación de la fragilidad del complejo sojero. Documento de trabajo. Argentina: Universidad de Belgrano, Departamento de investigaciones; 2001. Report No.: ISSN 1850-2512.

3. El Mundo. El Mundo. [Online].; 2017 [cited 2018 Enero. Available from: http://www.elmundo.es/sociedad/2017/09/15/59bc18e446163f2f7a8b4662.html.

4. Manrique L, Delgado J, Takemoto J, Remsberg C, Yáñez J. Riesgos, implicancias, y la situación actual de los organismos genéticamente modificados (OGM). Lima: UNALM; 2007.

5. Levy G, Módena N. Impacto sanitario y ambiental de la soja transgénica a la luz del conocimiento. Argentina:; 2001.

6. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo - PNUD. Human Develoment Report 2003: Millennium Development Goals: A compact among nations to end human poverty. New York: Oxford University Press, Inc.; 2003. Report No.: ISBN 0-19-521915-5.

7. Organización Mundial de la Salud. Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias. Suiza: OMS, Departamento de Inocuidad

Alimentaria, Zoonosis y Enfermedades Transmitidas por los alimentos; 2005. Report No.: ISBN 92 4 159305 9.

8. Halloran, Jean ; Hansen, Michael. Why we need labelling of genetically engineered food. Estados unidos: Consumers International; 1998. Report No.: ISBN 1-902391-06-3.

9. MINAM. Decreto Supremo: Nº 008-2012-MINAM. Aprueban reglamento de la Ley que establece la Moratoria al Ingreso y Producción de Organismo Vivos Modificados al Territorio Nacional por un periodo de 10 años. 2012..

10. Bonny S. Will biotechnology lead to more sustainable agriculture? In Massachusetts U. Proccedings of NE-165 Conference. Washington; 1999. p. 24-25.

11. Congreso de la República del Perú. Ley de prevención de reisgos derivados del uso de la biotecnología. 1999..

12. PCM. Decreto Supremo N° 108-2002-PCM. Reglamento de la Ley de Prevención de Riesgos Derivados del uso de la Biotecnología. 2002..

13. Congreso de la República. Ley N° 29571 - Código de protección y defensa del consumidor. 2010..

14. INACAL. NTP 731.001:2012 BIOSEGURIDAD EN ORGANISMOS VIVOS MODIFICADOS: Terminología básica. 2012..

15. INACAL. NTP ISO 24276:2012 PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados: Requisitos generales y definiciones. 2012..

16. INACAL. NTP ISO 21571:2011 PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados. Extracción de ácidos nucleicos. 2011..

17. INACAL. NTP ISO 21569:2012 PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados: Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos. 2012..

18. INACAL. NTP ISO 21570:2013 PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en los ácidos nucleicos. 2013..

19. INACAL. NTP ISO 21572:2012 PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados: Métodos basados en proteínas. 2012..

20. INACAL. NTP 731.002:2013 PRODUCTOS ALIMENTICIOS. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados. Estrategias de muestreo. 2013..

21. INACAL. NTP 731.003:2013 BIOSEGURIDAD EN ORGANISMOS VIVOS MODIFICADOS. Organismos modificados de aplicación en el medio ambiente.

Lineamientos para las estrategias de vigilancia aplicables a la diseminación deliberada de plantas genéticamente modificadas. 2013..

22. INACAL. NTP –CODEX CAC/GL44 ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS MODERNOS. Principios para el análisis de riesgo de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos..

23. INACAL. NTP –CODEX CAC/GL45 ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS MODERNOS. Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas genéticamente modificadas o de ADN recombinante..

24. INACAL. NTP –CODEX CAC/GL46 ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS MODERNOS. Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos producidos utilizando microorganismos de ADN recombinante..

25. INACAL. GP 023:2012 BIOSEGURIDAD EN ORGANISMOS VIVOS MODIFICADOS. Organismos modificados de aplicación en el medio ambiente. Guía para las estrategias de muestreo para la diseminación deliberada de plantas genéticamente modificadas. 2012..

26. INACAL. GP 024:2013 BIOTECNOLOGÍA MODERNA. Bioseguridad en Organismos Vivos Modificados. Recomendaciones sobre el confinamiento de plantas genéticamente modificadas para laboratorios de investigación, desarrollo y análisis. 2013..

27. CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) no 49/2000. 2000..

28. CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA. REGLAMENTO (CE) No 1830/2003. 2003..

29. Gobierno Federal de Brasil. Decreto n° 4.680. 2003..

30. FAO y OPS. Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional: América Latina y el Caribe 2016. Santiago:; 2017. Report No.: ISBN 978-92-5-309608-4.

31. Castillo Castillo S. Determinación de proteínas transgénicas en cereales para el desayuno de maíz etiquetado como libres de OGM. Tesis Magister. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agraria; 2017.

32. Carvajal P, Ureña H, Umaña J, Sancho C, Solano F, Arleo M, et al. Detección molecular de secuencias de ADN transgénico en alimentos de consumo humano y animal en Costa Rica. Agronomía Costarricense. 2017; 41(1).

33. Ferreira R, Branquinho M, Cardarelli-Leite P. Soja geneticamente modificada em alimentos contendo farinha e preparados à base de farinha de trigo. Detecção e adequação à legislação de rotulagem. Brazilian Journal of Food Technology. 2009 Julio; 12(3).

34. Fernández Campos M. Análisis de transgénesis mediante PCR de 20 polentas que se encuentran en el Mercado Uruguayo. Tesis. Uruguay: Universidad de la República, Bioquímica; 2010.

35. Mejía Castañeda ML. Estandarización de un protocolo para detección de OGMs: Evaluación de la presencia de OGM en granos de soya colectados en diferentes Centros de Acopio de Ecuador. Tesis. Cumbayá: Universidad San Frnacisco de Quito; 2011.

36. Lipp M, Bluth A, Fabrice E, Kruse L, Schimmel H, Van den Eede G, et al. Validation of a method based on polymerase chain reaction for detection of genetically modified organisms in various process foodstuff. Eur Food Res Technol. 2001; 212(497-504).

37. Marcellino F, Guimaraes M, De-Barros E. Detection and quantification of Roundap Ready soybeans residues in sausage samples by conventional and real time PCR. Ciencia y tecnología de alimentos. 2008;(28).

38. Taski-Ajdukovic K, Nikolic Z, Milosevic M, Ignjatov M, Petrovic D. Detection of genetically modified organisms in processed meat products on the Serbian food market. Elsevier. Meat science. 2009; 81(230-232).

39. Elsanhoty RM. Genetically modified Roundap Ready soybean in processed meat products in the Kingdom of Saudi Arabia. Annals of Agricultural Science. 2013; 58(2).

40. FAO, FIDA, OMS, PMA y UNICEF. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2017. Roma: FAO; 2017. Report No.: ISBN 978-92-5-309888-0.

41. Programa Mundial de Alimentos de las Naciones Unidas. Manual para la Evaluación de la Seguridad Alimentaria en Emergencias. Italia:; 2009.

42. Naciones Unidas. Objetivos de Desarrollo Sostenible. [Online].; 2017 [cited 2018 Enero. Available from: http://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/.

43. FAO y OMS. Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos. Guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. Roma:; 2007. Report No.: ISBN 978-92-5-305604-0.

44. FAO. Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados. Instrumento para capacitadores. Roma:; 2009.

45. FAO. Glossary on forest genetic resources. Roma: Forest Genetic Resources Working Papers, Forestry department; 2003.

46. Murray R, Bender D, Botham K, Kennelly P, Rodwell V, Weil PA. HARPER Bioquímica Ilustrada. 28th ed. México: McGraw Hill Interamericana editores S.A.; 2010.

47. Watson J. La doble hélice. 2nd ed.; 2007.

48. Organización Mundial de la Salud. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Italia:; 2007. Report No.: ISBN-978-92-79-04831-9.

49. Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H, Vqan Den Eede G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. European Food Research and Technology. 2002 January; 214.

50. Cornejo Romero A, Serrato Diaz A, Rendón Aguillar B, Rocha Munive M. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. 1st ed. México; 2014.

51. Salazar Montes A, Sandoval Rodriguez A, Armendariz Borunda J. Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. 2nd ed.; 2016.

52. Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory Manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

53. Innis M, Gelfand D. Optimization of PCRs. In PCR Protocols: a Guide to Methods an Applications. New York: Academic Press; 1990. p. 3-12.

54. Newton C, Graham A. PCR. BIOS Scientific Publishers. 1994.

55. Organización Mundial de la Salud. Organización Mundial de la Salud: Food Safety. [Online].; 2014 [cited 2018 Enero. Available from: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/Frequently_asked_questions_on_gm_foods.pdf?ua=1.

56. Sistema Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA). ISAAA. [Online].; 2014 [cited 2018. Available from: http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/.

57. Tripathi L. Techniques for detecting genetically modified crops and products. African Journal of Biotechnology. 2005 December; 4(13).

58. International Organization for Standardization. ISO 21569:2005. 2014..

59. Hemmer W. Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods. Biosafety Research and Assesment of Technology Impacts of the Swiss Priority Program Biotechnology. 1997; 2/97.

60. Windels P, Taverniers I, Depicker A, Van Bockstaele E, De Loose M. Characterisation of the Roundap Ready soybean insert. European Food Research Technology. 2001; 213(107-112).

61. FAO. Abastecimiento y distribución de alimentos en las ciudades de los países en desarrollo y de los países en transición. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación., Dirección de Infraestructura Rural y Agroindustrias (AGS); 2007.

62. Organización Panamericana de la Salud. Modelo de perfil de nutrientes de la Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPS/OMS; 2016. Report No.: ISBN 978-92-75-11873-3.

63. Moubarac JC, Batal M, Borteletto Martins AP, Bertazzi Levy R, Cannon G, Monteiro C. Processed and Ultra-processed Food Products: Consumption Trends in Canada from 1938 to 2011. ; 2014.

64. Instituto Nacional de Estadistica e Informática. INEI. [Online]. [cited 2018 Enero. Available from: http://webapp.inei.gob.pe:8080/sirtod-series/home.jsf.

65. NTP 201.006. 1999. Carne y productos cárnicos. Embutidos con tratamiento térmico después de embutir o entoldar. Definición, Clasificación y Requisitos. 2da edición...

66. FAO-PRODAR. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Online].; 2014 [cited 2018 Enero. Available from: http://www.fao.org/3/a-au165s.pdf.

67. Bejarano I. E, Bravo A. M, Huamán D. M, Huapaya H. C, Roca N. A, Rojas Ch. E. Tabla de composición de alimentos industrializados. Lima: Centro Nacional de Alimentación y Nutrición; 2002. Report No.: ISBN 9972-857-32-8.

68. Ministerio de Salud. Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2009.

69. Pulido HG. Calidad Total y Productividad. Tercera ed. Vázquez PR, editor. Mexico: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A; 2010.

70. Congreso de la República del Perú. Constitución Política del Perú. 1993..

71. MINAM. D.S. 012 - 2009 - MINAM. 2009..

72. Presidencia del Consejo de Ministros. D.S 108 - 2002- PCM: Reglamento de la ley N° 27104. 2002..

73. Congreso de la República del Perú. Resolución legislativa N° 26181: Aprobación de convenio sobre Diversidad Biológica adoptado en Río Janeiro. 1993..

74. Congreso de la República del Perú. Resolución legislativa N° 28170: Aprobación del Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la Biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica.. 2004..

75. Official Methods of Analysis. Official Methods of Analysis. 19th ed. Jr. GwL, editor.; 2012.

76. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. Molecular cloning: a Laboratoy Manual. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. Report No.: Chapter 6.

77. Meyer R, Jaccaund E. Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. 1997..

78. Saiki RK, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239 (4839): p. 487-491.

79. Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of ß-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985; 230 (4732): p. 1350-1354.

80. Codex Alimentarius. Norma general para los aditivos alimentarios. CODEX STAN 192-1995. 2016..

81. Ministerio de Salud. Norma Sanitaria para el almacenamiento de alimentos terminados destinados al consumo humano. 2015..

82. Kim JH, Song JY, Kim HY. Monitoring of genetically modified soybean events in sausage products in South Korea. Food control. 2016 September; 67.

83. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Gestión. [Online].; 2018 [cited 2018 Enero. Available from: https://gestion.pe/economia/lima-cumple-483-anos-fundacion-12-datos-estadisticos-ciudad-reyes-225198.

84. INEI. El Comercio. [Online].; 2016 [cited 2017 Diciembre. Available from: https://elcomercio.pe/economia/peru/inei-impresionantes-numeros-sector-informal-peruano-229623.

85. Babbie E. Fundamentos de la investigación social. 1st ed. editor It, editor. Buenos aires; 2000.

86. Alvis-Arango A, Giraldo-Vasquez L. Evaluación de los métodos fenol-cloroformo y columnas de silice para extracción de ADN a partir de tejido oseo. 2015 Setiembre; 2(1).

87. FAO. Estadística: Indicadores de la Seguridad Alimentaria. [Online].; 2017 [cited 2018 Enero. Available from: http://www.fao.org/economic/ess/ess-fs/indicadores-de-la-seguridad-alimentaria/es/#.Wn9rbKjT7IU.

88. González-Morales S, Cruz-Requena M, Rodríguez-Vidal A, Aguilar-Gonzáles C, Rebolloso-Padilla Ó, Rodríguez-Herrera R. Persistence of transgenic genes and proteins during soybeans food processing. Elselvier: Food Bioscience. 2015; 2.

89. Vijayakumar KR, Martin A, Gowda L, Prakash V. Detection of genetically modified soya and maize: impact of heat processing. Elselvier: Food Chemestry. 2009; 117.

90. Shin HJ, Heo EJ, Moon JS, Kim JH, Kim YJ, Park HJ, et al. Validation of Korea Meat Products and processed Cheese for the detection of GMO using p35S and tNos primers. Korean J. Food Sci. Ani. REsour. 2011; 31(5).

91. Vilijoen CD, Dajee BK, Botha GM. Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labelling. African Journal of Biotechnology. 2006; 5(2).

92. Bauer T, Weller P, Hammes WP, Hertel C. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. Eur Food Res Technol. 2003; 217.

93. ThermoFisher Scientific. Proteinase K, recombinant, PCR grade. [Online]. [cited 2017 Diciembre. Available from: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EO0491?gclid=Cj0KCQiAnuDTBRDUARIsAL41eDpMj8V5EE13ufTNo61ODQTbzlcQ7ncy5D0Z2OEcPG1q5FrJl1gcbAoaAiHnEALw_wcB&s_kwcid=AL!3652!3!212595325169!p!g!proteinase%20k&ef_id=Wl VLeAAAA6oIQIkB:20180205133702:s.

94. Wolfram Hemmer. Food Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods BATS A, editor.: Center BATS; 1997.

95. Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in Biotechnology. 2002 May; 20(5).

96. WILEY-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA. Genetically engineered Food. Tercera ed. Heller KJ, editor. Germany; 2006.

97. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Información económica. Precios al Consumidor por producto. [Online].; 2018 [cited 2018 Enero. Available from: http://iinei.inei.gob.pe/iinei/siemweb/publico/.

98. Rojas R. Guía para la vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano. Lima: Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias de Ambiente (CEPIS); 2002. Report No.: OPS/CEPIS/PUB/02.79.

99. CODEX ALIMENTARIUS. Norma general del CODEX para los aditivos alimentarios. ; 1995.

100. Moubarac JC, Parra DC, Cannon G, Monteiro CA. Food Classification System Based on Food Processing: Significance and implications for Polices and Actions: A System Literature Review and Assessment. Springer Science+Business Media. 2014 Febrero.

101. Cochran WG. Sampling Techniques. Tercera ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc; 1977.

102. Monteiro CA, Moubarac JC, Cannon G. Ultra-processed products are becomming dominant in the global food system. Sao Paulo:; 2013.

103. MINAM. Resolución Ministerial: R.M. n.° 355-2015-MINAM. 2015..

104. MINAM. Resolución Ministerial: R.M. n.° 83-2014-MINAM. 2014..

105. Querci M, Jermini M, Van den Eede G. The analysis of food samples for the. European Commision, Joint Research Centre. 2006;(ISBN: 92-79-02242-3).

106. Wagner DB, Furnier GR, Saghay-Maroof MA, Dancik , Dancik , Allard. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. Proceedings of the National Academy of Science USA. ; 1987. Report No.: 84, 2097–2100.

107. Meyer R, Chardonnens F, Hubner P, Luthy J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und - Forschung A. 1996;(203): p. 339-344.

108. FAO. Instrumentos de la FAO sobre bioseguridad. Roma:; 2007. Report No.: ISBN 978-92-5-305729-0.

109. PNUMA/CDB. Convenio sobre la Diversidad Biológica. 1992. Artículo 8 (g).

110. FAO. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA) Centroamérica. [Online].; 2011 [cited 2018 Enero. Available from: http://www.fao.org/in-action/pesa-centroamerica/temas/conceptos-basicos/es/.

111. Gordillo G, Méndez Jerónimo O. Seguridad y soberanía alimentaria. FAO; 2013.

112. OMS. Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias. Suiza: OMS, Departamento de inocuidad de los alimentos; 2005. Report No.: ISBN 92 4 159305 9.

11 ANEXOS

11.1 ANEXO N° 1: PROPUESTA DE PROCEDIMIENTOS PARA EVALUACIÓN DE OGM EN ALIMENTOS PROCESADOS Y/O ULTRA-PROCESADOS DE CONSUMO MASIVO

PROPUESTA DE PROCEDIMIENTOS PARA EVALUACIÓN DE OGM EN ALIMENTOS PROCESADOS Y/O ULTRA-PROCESADOS DE CONSUMO MASIVO

A continuación, se presenta el desarrollo de los procedimientos propuestos para la evaluación del impacto del uso de ingredientes OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados en la seguridad alimentaria de forma tal que se puedan tener datos representativos y adecuados a la realidad nacional para la toma de decisiones.

11.1.1 DEFINICIÓN

El programa de evaluación de OGM de alimentos procesados comprende las acciones de pre-muestreo, muestreo, y el post-muestreo.

11.1.2 OBJETIVOS

11.1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar procedimientos para la evaluación de OGM de alimentos procesados de consumo masivo en un momento determinado.

11.1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar procedimientos con fundamento científico y estadístico para la evaluación de OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados;
- Conocer si los alimentos ultra-procesados y/o procesados comercializados en un determinado lugar y tiempo contienen o no OGM; y
- Conocer su impacto en la seguridad alimentaria nacional.

11.1.3 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

La selección de parámetros mostrados en la Tabla 12 dependerá de los objetivos de quien lo ejecute el procedimiento propuesto de evaluación de OGM en alimentos procesados de consumo diario

TABLA 12.- Parámetros propuestos para el análisis del impacto de la presencia de OGM en alimentos procesados y ultra-procesados respecto a la seguridad alimentaria nacional.

PARÁMETROS DE MERCADO Y CONSUMO **Interacción entre consumidor y mercado en los sistemas de distribución** **Fuente: Registro de información proveída de los sistemas de abasto y la propia información del producto**				
Pilar de la Seguridad Alimentaria	**Parámetro**	**Interpretación**	**Fórmula**	**Unidad de medida**
Disponibilidad	*Presencia en el mercado de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM*	Porcentaje de productos con detección positiva o negativa de OGM que son ofertados a nivel nacional, regional y/o local respecto al total de la muestra de la categoría de alimentos en estudio	$\left(\frac{\text{Productos con detección positiva de OGM de la muestra (productos ofertados)}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$ $\left(\frac{\text{Productos con detección negativa de OGM de la muestra (productos ofertados)}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$	%
Accesibilidad	*Fluctuaciones de los precios de productos con detección positiva o negativa con ingredientes GM*	Porcentaje de productos con detección positiva o negativa de OGM que han modificado su precio en un periodo de tiempo respecto al total de la muestra de la categoría en estudio en el tiempo inicial	$\left(\frac{\text{Productos con detección positiva de OGM en el tiempo inicial que modificaron sus precios en un periodo de tiempo}}{\text{Tamaño de la muestra en el tiempo inicial del periodo en estudio}}\right) \times 100$ $\left(\frac{\text{Productos con detección negativa de OGM en el tiempo inicial que modificaron sus precios en un periodo de tiempo}}{\text{Tamaño de la muestra en el tiempo inicial del periodo en estudio}}\right) \times 100$	%
		Porcentaje de variación de precios promedios de productos de la muestra con detección positiva o	$100 * \frac{(O_f - O_\circ)}{O_\circ}$ (**)	%

		negativa de OGM en un periodo de tiempo	$100 * \frac{(C_f - C_\circ)}{C_\circ}$ (**)	
Accesibilidad	*Adquisición de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM*	Porcentaje de productos con detección positiva o negativa de OGM que son adquiridos por el consumidor a nivel nacional, regional o local respecto al total de la muestra de la categoría de alimentos en estudio	$\left(\frac{\text{Productos con detección positiva de OGM de la muestra (productos comprados por el consumidor)}}{\text{Tamaño de la población que son ofertados}}\right) \times 100$ $\left(\frac{\text{Productos con detección negativa de OGM de la muestra (productos comprados por el consumidor)}}{\text{Tamaño de la población que son ofertados}}\right) \times 100$	%
Uso	*Aumento o disminución del valor nutricional de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM*	Porcentaje de variación de contenido de macronutrientes o micronutrientes de productos de la muestra con detección positiva o negativa de OGM en un periodo de tiempo	$100 * \frac{(OV_f - OV_\circ)}{OV_\circ}$ (***) $100 * \frac{(CV_f - CV_\circ)}{CV_\circ}$ (***)	%
Estabilidad	*Cumplimiento voluntario de la Ley 29571 respecto a la declaración de contenido de ingredientes modificados en productos*	Porcentaje de productos con o sin declaración de ingredientes GM en sus etiquetados respecto al total de la muestra de la categoría de alimentos en estudio	$\left(\frac{\text{Productos de la muestra con declaración en la etiqueta de contenido de OGM entre los ingredientes}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$ $\left(\frac{\text{Productos de la muestra sin declaración en la etiqueta de contenido de OGM entre los ingredientes}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$	%

*En todos los casos basta con una detección cualitativa por el método de cribado y su verificación con los eventos transgénicos específicos.
** $O_\circ$: Precio promedio de productos con detección positiva de OGM en el tiempo inicial.
O_f: Precio promedio de productos con detección positiva de OGM en el tiempo final.
$C_\circ$: Precio promedio de productos con detección negativa de OGM en el tiempo inicial.
C_f: Precio promedio de productos con detección negativa de OGM en el tiempo final.
*** $O_\circ$: Cantidad promedio de macronutrientes o micronutrientes en mg de productos con detección positiva de OGM en el tiempo inicial.
O_f: Cantidad promedio de macronutrientes o micronutrientes en mg de productos con detección positiva de OGM en el tiempo final.
$C_\circ$: Cantidad promedio de macronutrientes o micronutrientes en mg de productos con detección negativa de OGM en el tiempo inicial.
C_f: Cantidad promedio de macronutrientes o micronutrientes en mg de productos con detección negativa de OGM en el tiempo final.

A continuación, se presentan una serie de ejemplos de la aplicación e interpretación respectiva por cada uno de los parámetros propuestos:

Caso supuesto:

Se seleccionó como objeto de estudio la categoría de alimentos de leche evaporada en presentaciones de tarro de 500g que es comercializada en la región de Lima Metropolitana en enero de 2017. Considerando que el tamaño de la población es de 10 y que siguiendo la fórmula contemplada en el procedimiento propuesto para hallar el tamaño de muestra de una población conocida con un nivel de confianza de 95% resulta que deben ser objeto de estudio las 10 unidades experimentales.

Por lo tanto, se tienen los siguientes datos:

TABLA 13.- Datos de muestreo de leche evaporada comercialidad en lima metropolitana en enero de 2017

Muestra	Promotor 35S CaMV	Terminador *nos*	Declaración OGM	Precio promedio* 500g		Cantidad de proteínas declaradas en la información nutricional del producto		Cantidad de productos vendidos ***
				P1	P2	C1**	C2**	
P01	Detectado	Detectado	No	3,5	3,4	12	12	114
P02	No Detectado	No Detectado	No	4,75	4,8	13	13	112
P03	Detectado	Detectado	No	3,99	3,80	12,5	13	109
P04	Detectado	Detectado	Si	4,50	4,60	13,8	13,8	99
P05	Detectado	Detectado	No	4,99	4,99	11,7	11,7	144
P06	No Detectado	No Detectado	Si	5,10	4.99	13,8	13,8	86
P07	No Detectado	No Detectado	No	3,80	3,70	10,7	10,9	76
P08	Detectado	Detectado	No	3,99	3,89	11,9	11,9	117
P09	Detectado	Detectado	No	2,99	2,50	12,1	12,1	103
P10	No Detectado	No Detectado	No	3,5	3,60	12,8	12,4	57

* Precio promedio de las salchichas tipo Hot Dog de Pollo donde P1 refiere al precio promedio en enero 2017 y P2 al precio promedio en abril de 2017.
**C1: Cantidad promedio del producto objeto de estudio en enero de 2017 expresado en miligramos (mg).
C2: Cantidad promedio del producto objeto de estudio en abril de 2017 expresado en miligramos (mg).
*** Cantidad de productos vendidos a los consumidores en el mes de enero de 2017.

Por lo tanto, se obtienen los siguientes resultados

TABLA 14.- Parámetros para evaluar el impacto en la seguridad alimentaria de la comercialización de salchichas tipo Hot Dog de pollo en la región de Lima Metropolitana en junio 2017

Parámetro	**Interpretación**	**Fórmula**	**Aplicación de fórmula**	**Resultado (%)**
Presencia en el mercado de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM	*Porcentaje de leche evaporada en los cuales se obtuvo una detección positiva de OGM que son ofertados.*	$\left(\frac{\text{Productos con detección positiva de OGM de la muestra (productos ofertados)}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$	$\frac{6}{10} \times 100$	*60,0%*
	Porcentaje de leche evaporada en los cuales se obtuvo una detección negativa de OGM que son ofertados.	$\left(\frac{\text{Productos con detección negativa de OGM de la muestra (productos ofertados)}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$	$\frac{4}{10} \times 100$	*40,0%*
Fluctuaciones de los precios de productos con detección positiva o negativa con ingredientes GM	*Porcentaje de leche evaporada con OGM en los cuales se obtuvo una detección positiva de OGM que han modificado su precio entre junio de 2017 y febrero de 2018*	$\left(\frac{\text{Productos con detección positiva de OGM en el tiempo inicial que modificaron sus precios en un periodo de tiempo}}{\text{Tamaño de la muestra en el tiempo inicial del periodo en estudio}}\right) \times 100$	$\frac{5}{10} \times 100$	*50,0%*
	Porcentaje de leche evaporada en los cuales se obtuvo una detección negativa de OGM que han modificado su precio entre junio de 2017 y febrero de 2018	$\left(\frac{\text{Productos con detección negativa de OGM en el tiempo inicial que modificaron sus precios en un periodo de tiempo}}{\text{Tamaño de la muestra en el tiempo inicial del periodo en estudio}}\right) \times 100$	$\frac{4}{10} \times 100$	*40,0%*
	Porcentaje de variación de precios promedios de leche evaporada con detección positiva de OGM que son comercializadas entre junio de 2017 y enero de 2018	$100 * \frac{(O_f - O_\circ)}{O_\circ}$	$\frac{(3{,}86 - 3{,}99)}{3{,}99} \times 100$	$-3{,}25\%$
	Porcentaje de variación de precios promedios de leche evaporada con detección negativa de OGM que son comercializadas entre junio de 2017 y enero de 2018	$100 * \frac{(C_f - C_\circ)}{C_\circ}$	$\frac{(4{,}27 - 4.27)}{4{,}27} \times 100$	*0.0% **

Adquisición de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM	*Porcentaje de leches evaporadas con detección positiva de OGM que son adquiridos por el consumidor en enero de 2017.*	$\left(\frac{\text{Productos con detección positiva de OGM de la muestra (productos comprados por el consumidor)}}{\text{Tamaño de la población que son ofertados}}\right) \times 100$	$\frac{686}{987} \times 100$	*69,5%*
	Porcentaje de leches evaporadas con detección negativa de OGM que son adquiridos por el consumidor en enero de 2017.	$\left(\frac{\text{Productos con detección negativa de OGM de la muestra (productos comprados por el consumidor)}}{\text{Tamaño de la población que son ofertados}}\right) \times 100$	$\frac{331}{987} \times 100$	*30,5%*
Aumento o disminución del valor nutricional de productos con detección positiva o negativa de ingredientes GM	*Porcentaje de variación de contenido de macronutrientes o micronutrientes de leches evaporadas con detección positiva de OGM entre junio de 2017 y enero de 2018*	$100 * \frac{(OV_f - OV_\circ)}{OV_\circ}$	$\frac{100}{} * \frac{(12{,}42 - 12{,}5)}{12{,}5}$	*-0,64%*
	Porcentaje de variación de contenido de macronutrientes o micronutrientes de leches evaporadas con detección negativa de OGM entre junio de 2017 y enero de 2018	$100 * \frac{(CV_f - CV_\circ)}{CV_\circ}$	$\frac{100}{} * \frac{(12{,}52 - 12{,}58)}{12{,}58}$	*-0.48%*
Cumplimiento voluntario de la Ley 29571 respecto a la declaración de contenido de ingredientes modificados en productos	*Porcentaje de leche evaporada con declaración de ingredientes GM en sus etiquetados*	$\left(\frac{\text{Productos de la muestra con declaración en la etiqueta de contenido de OGM entre los ingredientes}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$	$\frac{8}{10} \times 100$	*80,0%*
	Porcentaje de leche evaporada sin declaración de ingredientes GM en sus etiquetados	$\left(\frac{\text{Productos de la muestra sin declaración en la etiqueta de contenido de OGM entre los ingredientes}}{\text{Tamaño de la muestra de los productos ofertados}}\right) \times 100$	$\frac{2}{10} \times 100$	*20,0%*

Asimismo, en la Tabla 12 se proponen parámetros cualitativos y cuantitativos que pueden aplicarse a dicho procedimiento dependiendo de sus objetivos.

Tabla 15.- Parámetros para identificación cualitativa y cuantitativa de OGM en alimentos procesados y/o ultra-procesados

Parámetros		Unidad de medida
Cualitativos	**Promotor 35S CaMV**	Presencia Se identificará el tamaño del elemento en bp
	Terminador *nos*	Presencia Se identificará el tamaño del elemento en bp
	Verificación Evento específico	Presencia Se identificará el tamaño del evento en bp
	Proteína GM	Presencia
Cuantitativos	**Evento específico**	%
	Proteína GM	%

11.1.4 ACTIVIDADES PRE-MUESTREO

Estas actividades se desarrollan cumpliendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y los procedimientos acreditados que aseguren la calidad de los resultados.

Previamente a la recolección de la muestra se ha de definir:

11.1.4.1 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Los equipos e instrumentos de medición *in situ* deben estar limpios y calibrados antes de ir al campo, dejándolos en el mismo estado al finalizar el muestreo.

11.1.4.2 LIMPIEZA Y CALIBRACIÓN DE LOS EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Para garantizar la calidad del análisis se debe limpiar y calibrar los equipos y/o instrumentos que se utilizaran como parte de los preparativos del trabajo de campo. También debe limpiarse y/o equipo al finalizar el trabajo de campo y mantenerse en óptimo estado de limpieza y en buenas condiciones de funcionamiento. Los equipos e instrumentos deben contar con un plan de mantenimiento preventivo, así como llevar un registro de calibración, mantenimiento, cambio de partes o accesorios, remplazo de piezas y/o accesorios; así como cualquier problema de fallas o mal funcionamiento. Se debe de verificar que cada instrumento cumpla con los estándares de calibración antes de ir al campo.

11.1.4.3 RECIPIENTES DE MUESTREO

El personal de muestreo y laboratorio deberá de tomar las precauciones para evitar la contaminación de las muestras, seleccionando el recipiente apropiado, lavándolos, si es el caso, y manipulándolos adecuadamente.

11.1.4.4 PREPARACIÓN DE MUESTRA "BLANCO VIAJERO"

Antes de salir al campo, se debe de seleccionar el 10% de cada tipo de recipiente para la recolección de la muestra.

Esta selección será utilizada como "Blanco viajero". Los recipientes deberán de llenarse con agua destilada y preservarse de manera similar a las muestras de campo,

almacenándose hasta que sean entregadas al laboratorio, junto con las otras muestras, para análisis.

No deben de existir restos orgánicos o inorgánicos detectables. Los resultados indicaran si existe contaminación dentro de los recipientes.

11.1.4.5 LISTA DE REQUERIMIENTOS

Se le recomienda nombrar una lista de equipos, materiales, reactivos, hojas de datos de campo, formularios, etc., que serán llevados al campo. En dichas listas se debe incluir:

- Envases para muestras;
- Envases para la muestra blanco;
- Algunos envases adicionales en caso de ruptura o muestras duplicadas;
- Persevantes (Por ejemplo: Contenedor de envases que mantengan la temperatura en 0- 5°C);
- Etiquetas y plumones indelebles;
- Formatos de registro de muestreo;
- Termómetro;
- Accesorios tales como: Toalla, papel absorbente, etc;
- Ropa de protección, como: Mameluco o ropa de trabajo (durante el muestreo), guantes, mascarilla, y tapa boca, etc; y
- Cronograma de muestreo.

11.1.5 MUESTREO

11.1.5.1 FRECUENCIA

La frecuencia para la evaluación tiene como principal objetivo definir la continuidad del seguimiento que debe efectuarse. Por lo cual, se debe tomar en cuenta el tamaño poblacional de cada una de las zonas de abastecimiento. De esta manera, en las zonas de abastecimientos con alta población, las muestras deben ser tomadas con mayor frecuencia en las zonas con menor población.

Tabla 16.- Categorías según tamaño poblacional (*)

TAMAÑO POBLACIONAL	
Cantidad de habitantes por zona	**Categoría de población**
> 200 000 hbt	Ciudades mayores
50 000 – 200 000	Ciudades medianas
10 000 – 50 000	Ciudades pequeñas
2 500 – 10 000	Pueblos
100 – 2 500	Localidades rurales

(*) Categorías definidas según informe de la OPS. (98)

La frecuencia de evaluación de OGM en alimentos procesados se presentan en las siguientes tablas según tipo de alimento (99), la cual fue delimitada de acuerdo con la definición de alimentos procesados y/o alimentos ultra-procesados (100) (63); así como, por aquellos alimentos de consumo masivos a nivel nacional. (64)

Cada frecuencia ha sido dividida en dos tipos: frecuencia estándar y frecuencia reducida. La categoría de estándar se refiere al número de muestras en las que se debe extraer de las zonas de abastecimiento a fin de determinar el contenido de OGM en alimentos procesados de consumo masivo. La condición reducida es

adoptada cuando después de un número determinado de muestreos se mantienen los valores determinados anteriormente. Si encuentra por algún motivo, presencia de contenido de OGM se deberá aumentar la frecuencia. Es decir, si se encuentra en la condición reducida deberá pasar a la condición estándar; así como, si se encuentra en la condición estándar deberá aumentar en un 50 -100% la cantidad de frecuencia.

Tabla 17.- Frecuencia anual de muestreo de alimentos procesados o ultra-procesados

Zona de abastecimiento (según tamaño poblacional)	**Frecuencia**	
	Reducida	Standar
> 200 000 hbt	4	7
50 000 – 200 000	3	6
10 000 – 50 000	2	4
2 500 – 10 000	1	2
100 – 2 500	1	2

En la Tabla 15 se proponen la frecuencia anual de muestreo para las siguientes muestras:

Productos lácteos y productos análogos

- Leches y bebidas lácteas
- Bebidas lácteas aromatizadas y/o fermentadas

Grasas y aceites y emulsiones grasas

- Grasas y aceites prácticamente exentos de agua
    - Grasas y aceites vegetales
- Emulsiones grasas, principalmente del tipo agua en aceite
    - Mantequilla (manteca)

Cereales y productos a base de cereales, derivados de granos de cereales, de raíces y tubérculos, legumbres, leguminosas y médula o corazón blando de palmera, excluidos los productos de panadería

- Harinas y almidones
- Cereales para el desayuno, incluidos los copos de avena
- Pastas y fideos y productos análogos (p. ej. Fécula de arroz en hojas, "vermicelli" de arroz, pastas y fideos de soja)
- Mezclas batidas para rebozar (p. ej. Para empanar o rebozar pescado o carne de aves de corral)
- Productos a base de soja (excluidos aderezos y condimentos a base de soja de la categoría de alimentos 12.9)

Productos de panadería

- Pan y productos de panadería ordinaria

Carne y productos cárnicos, incluidos los de aves de corral y caza

- Productos cárnicos, de aves de corral y caza elaborados, en piezas enteras o en cortes
- Productos cárnicos, de aves de corral y caza picados y elaborados
- Tripas comestibles (p. ej. Para embutidos)

Bebidas, excluidos los productos lácteos

- Bebidas no alcohólicas

- Bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas
- Bebidas alcohólicas, incluidas las bebidas análogas sin alcohol y con bajo contenido de alcohol
- Cerveza y bebidas a base de malta

11.1.5.2 UBICACIÓN DE PUNTO DE MUESTREO

El muestreo tiene por finalidad conocer en un momento determinado la situación actual del contenido de OGM en alimentos procesados de consumo masivo. Por este motivo, es necesario seleccionar puntos de muestreo en la red de distribución de alimentos procesados de consumo masivo, de manera tal que permita tomar testigos representativos de la muestra en cuestión.

Para la selección de puntos de muestreo se ha tenido en cuenta el concepto de zona o lugar de abastecimientos de alimentos procesados de consumo masivo. De forma tal que se consideren los siguientes criterios de inclusión:

- Representar el sistema de abastecimiento de alimentos procesados masivos en su conjunto y sus principales componentes;
- Representar los lugares de mayor consumo masivo de alimentos procesados;
- Ser representativos de la zona de abastecimiento de alimentos procesados de consumo masivo;
- Estar uniformemente distribuidos de en toda la zona de abastecimiento; y
- Tener una cierta proporcionalidad al número de habitantes de cada zona de abastecimiento.

Asimismo, debe de tomar en consideración los siguientes aspectos:

- Áreas de alta densidad poblacional;
- Áreas con diferentes clases sociales según estrato económico (áreas con mayor accesibilidad y áreas marginadas económicamente); y
- Tendencias de los consumidores según tipo de alimentos.

En lo que respecta a las características del punto de muestreo, tradicionalmente, se han considerado a fin de reducir los problemas inherentes a la representatividad de la muestra de alimentos procesados de consumo masivo en el sistema de distribución, los puntos de muestreo deben estar conformados por instalaciones destinadas específicamente a este fin.

Para tal efecto los puntos de muestreo serán:

- Mercados mayoristas,
- Grandes mercados minoristas,
- Supermercados,
- Pequeños supermercados (ubicados en la planta baja de edificios de centros comerciales, en locales independientes, en quioscos o estructuras temporales o en piezas de propiedades residenciales).

11.1.5.2.1 MERCADOS MAYORISTAS, GRANDES MERCADOS MINORISTAS O SUPERMERCADOS.

El criterio de selección para elegir como punto de muestreo estos tipos de establecimiento será si el tamaño poblacional corresponderá

a ciudades pequeñas (10 000 hbt – 50 000hbt), medianas (50 000 hbt-200 000hbt) o mayores (> 200 000 hbt).

Si en la zona de muestreo existe más de un tipo de establecimiento, para la elección del mismo se tomarán los siguientes criterios de selección:

- Mayor asistencia de consumidores;
- Mayor ingreso diario;
- Venta de todos los alimentos de consumo masivo;
- Diferentes marcas según cada tipo de alimento identificado como alimentos procesados de consumo masivo; y
- Representativo de la zona donde se desarrollará la evaluación.

Los criterios de exclusión son:

- Poca asistencia del público en general
- Poco ingreso diario
- No expenden todos los alimentos procesados de consumo masivo.
- Venta de una única marca según cada tipo de alimento o de muy poca variedad de marcas.

11.1.5.2.2 PEQUEÑOS SUPERMERCADOS

El criterio de selección para elegir como punto de muestreo un pequeño supermercado será si el tamaño poblacional corresponderá

a pueblos (2 500 hbt -10 000 hbt) o localidades rurales (100 hbt – 2 500 hbt).

Si en la zona de muestreo existe más de un establecimiento, para la elección de este se tomarán los siguientes criterios de selección:

- Mayor asistencia de consumidores;
- Mayor ingreso diario;
- Venta, en su mayoría, de todos los alimentos de consumo masivo;
- Diferentes marcas, de preferencia, según cada tipo de alimento identificado como alimentos procesados de consumo masivo; y
- Representativo de la zona donde se desarrollará la evaluación

Los criterios de exclusión son:

- Poca asistencia del público en general;
- Poco ingreso diario;
- No expenden ninguno o muy pocos los alimentos procesados de consumo masivo;
- Venta de una única marca según cada tipo de alimento; y
- Poco representativo o muy lejano.

11.1.5.3 PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

11.1.5.3.1 TAMAÑO DE MUESTRA

Para saber el tamaño de muestra se utiliza la formula señalada en líneas inferiores, que aplica a una variable categórica (presencia o ausencia) con un tamaño de población finito (101):

$$n = \frac{N * Z_{(1-\propto)}{}^2 * p * q}{d^2 * (N-1) + Z_{(1-\propto)}{}^2 * p * q}$$

Siendo:

Tabla 18.- Descripción de la ecuación para selección de tamaño de muestra.

Símbolo	Descripción	Dato
$\boldsymbol{n}$	Tamaño de muestra	Valor para encontrar
$\boldsymbol{N}$	Tamaño de población	Cantidad total de una unidad experimental
$\boldsymbol{Z_{(1-\propto)}}$	Valor tipificado	1,96
$\propto$	Nivel de significancia	5%
$\boldsymbol{1-\propto}$	Nivel de confianza	95%
$\boldsymbol{p}$	Prevalencia	0.1
$\boldsymbol{q}$	$1-p$	0.9
d	Margen de error	5% (0,05)

Por ejemplo, si la población de estudio es “Bebidas gasificadas” la cual tiene 24 marcas en comercialización, utilizando la formula descrita, se utilizarían 23 muestras (dato con un nivel de 95% de confianza). Caso contrario sería si la población de estudio sería la categoría de “Bebidas”, dentro de la cual están las gasificadas, alcohólicas y sin gasificar, en este caso si se tuvieran un tamaño de

población de 110 productos se tomaría (con un nivel de confianza de 95%) 86 productos para su estudio. Asimismo, es importante señalar que para cada unidad experimental se muestrea por triplicado.

11.1.5.3.2 TOMA DE LAS MUESTRAS

La toma de muestra deberá realizarse de manera que las unidades seleccionadas sean representativas. En tal virtud, la selección de las muestras de la unidad experimental se realizará por un muestreo aleatorio simple. En el caso de aquellos productos que vengan empaquetados con varias unidades, pero similares entre sí, se utilizará primero un muestreo aleatorio simple, para selección cual empaque, y luego un muestreo por conglomerados, para seleccionar cuál de las muestras dentro del empaque.

11.1.5.3.3 INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

El procedimiento anterior deberá ser registrado a través del Anexo 2 en el cual se registrará la información según tipo de establecimiento de donde se obtuvo la muestra y otros datos de interés.

11.1.5.4 RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE LA MUESTRA

La recolección de la muestra se realizará según la temperatura en la que el producto se encuentra almacenado. Considerándose que para efecto de los alimentos procesados de consumo masivo se tenga las siguientes categorías:

Productos expuestos a temperatura de ambiente

1. *Limpieza*

Remover todo tipo de material extraño alrededor de la unidad experimental, así como toda suciedad que se encuentre cerca de la abertura del envase. Finalmente, esperar que el envase se encuentre seco.

Para efectos de este procedimiento el manipulador deberá de colocarse guantes estériles y previamente haber realizado un procedimiento de lavado de manos.

2. *Apertura de envases de plástico esterilizadas*

Retirar el cierre de las bolsas esterilizadas con el tamaño respectivo según la cantidad del producto.

3. *Toma de muestra*

Introducir la unidad experimental en el envase con cuidado y rapidez.

4. *Cierre del envase*

Luego de la toma de muestra cerrar automáticamente el envase y el mismo colocarlo dentro de un contenedor de envase de plástico de mayor capacidad para su protección.

Luego de la recolección de muestra se añade la acción adecuada para preservar la muestra hasta su análisis.

Productos expuestos a refrigeración o en congelación

1. Limpieza

Remover todo tipo de material extraño alrededor de la unidad experimental, así como toda suciedad que se encuentre cerca de la abertura del envase. Asimismo, quitar todo tipo de materia extraña provocada por la humedad en el área superficial como por ejemplo hielo o gotas de agua.

2. Apertura de envases de plástico esterilizados

Retirar el cierre de las bolsas esterilizadas con el tamaño respectivo según la cantidad del producto.

3. Toma de muestra

Introducir la unidad experimental en el envase con cuidado y rapidez.

4. Cierre del envase

Luego de la toma de muestra cerrar automáticamente el envase y el mismo colocarlo dentro de un envase de mayor capacidad para su protección.

Luego de la recolección de muestra se añade la acción adecuada para preservar la muestra hasta su análisis.

11.1.5.5 PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

La manipulación y preservación de muestras tienen como principal finalidad evitar cualquier cambio significativo en la composición de la muestra antes de su análisis.

En tal virtud, se debe de tomar en cuenta que debido a que es un análisis molecular la rigurosidad en el muestreo debe ser alta para que ningún factor biológico, químico o físico pueda afectar el análisis final.

Tabla 19.- Preservación de las muestras según categoría de alimento

Tipo de producto	Tipo de recipiente de primer uso y hermético	Cantidad y tamaño de recipiente	Temperatura
Productos lácteos y análogos	Envase de plástico	2 Mediano y grande	Refrigeración entre 0°C y 5 °C
Grasas y aceites y emulsiones grasas	Envase de plástico	2 Mediano y grande	Refrigeración entre 0°C y 5 °C
Cereales y productos a bases de cereales	Envase de plástico	2 Mediano y grande	Refrigeración entre 0°C y 5 °C
Productos de panadería	Envase de plástico	2 Mediano y grande	Refrigeración entre 0°C y 5 °C
Carne y productos cárnicos, incluidos los de ave de corral y caza	Envase de plástico	2 Mediano y grande	Refrigeración entre 0°C y 5 °C
Salsas	Envase de plástico	2 Pequeño y mediano	Refrigeración entre 0°C y 5 °C
Bebidas, excluidos los productos lácteos	Envase de plástico	2 Mediano y grande	Refrigeración entre 0°C y 5 °C
Alimentos preparados	Envase de plástico	2 Pequeño y mediano	Refrigeración entre 0°C y 5 °C

Durante la manipulación de las muestras, se deberá tener precaución con las condiciones ambientales, es decir, mantener la temperatura en estado de refrigeración entre 0°C – 5°C. Por lo cual, el momento de colocación de los envases en los contendores debe ser rápidamente para mantener la cadena de frio.

11.1.5.6 ROTULADO DE LAS MUESTRAS

Cada muestra debe de llegar al laboratorio con una identificación o etiqueta numerada. Los contenedores y envases deberán de ser rotulados correctamente. Tal rotulación deberá ser realizada al medio del contenedor y envase, y no a una esquina. Para cada código o enumeración deberá ser registrada de manera que le corresponda los datos siguientes:

- Número o código de muestra;
- Parámetro de análisis;
- Ubicación geográfica (punto de muestreo);
- Fecha y hora de recolección;
- Nombre del responsable de la toma de muestra;
- Preservación realizada; y
- Observaciones.

En el ítem de observaciones es necesario colocar las características resaltantes que ocurra durante el muestreo. Por ejemplo, si se encontró que el producto tenía una mancha ajena que luego de la desinfección no se borró.

Cada contenedor, deberá registrar una lista de las muestras que contiene especificando el tipo de análisis a realizar, datos de hora y fecha de recolección, así como, de ser el caso, nombre del laboratorio destinado.

11.1.6 ACTIVIDADES POST-MUESTREO

11.1.6.1 EMBALAJE Y TRANSPORTE

El transporte de la muestra se debe hacer en cajas térmicas aislantes, conteniendo hielo o material refrigerante. El uso de material esponjoso entre los envases ayudará a la prevención de rupturas y contaminación del contenido. Los envases deberán mantenerse en posición vertical dentro del contenedor. Cada contenedor deberá ser embalado adecuadamente. Las muestras colectadas deberán ser trasladadas inmediatamente hacia el laboratorio responsable, los cuales deberán verificar el contenido de cada una de las muestras. Asimismo, se deberá de considerar el tiempo de la distancia entre la recolección de la muestra y la llegada al laboratorio de análisis.

11.1.6.2 GARANTÍA DE CALIDAD Y SELECCIÓN DE LABORATORIOS

La etapa de colección de muestras es de trascendental importancia, por lo que el aseguramiento y control de la calidad son parte esencial de todo sistema de monitoreo, el cual comprende un programa de actividades (capacitación, calibración de equipos y registro de datos), a fin de garantizar que la medición cumple con las normas definidas y apropiadas de calidad a fin de obtener datos confiables y precisos. Los laboratorios donde se realizarán los análisis deben de garantizar la competencia técnica para este tipo de ensayos con estándares reconocidos internacionalmente. Para lo cual deben de contar con lineamientos y directrices establecidas en la NTP ISO/IEC 17025:2006. El laboratorio que realice el respectivo

análisis deberá de acreditar sus metodologías y procedimientos para la toma y análisis de las muestras ante el organismo competentes.

11.1.6.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

En principio, los procedimientos para la extracción de ADN y detección cualitativa o cuantitativa de OGM serán particulares según categoría de alimentos procesados y/o ultra procesados debido a la variedad de características propias del alimento tales como: tipo de ingredientes que contiene, textura, solubilidad, entre otros. Se deberá considerar que para la detección de alimentos transgénicos se pueden realizar métodos basados en proteínas o en ADN. Por lo tanto, se deberán considerar factores como temperatura, pH, procesamiento del alimento, presión, entre otros; debido a que ello afectará en la degradación y/o desnaturalización de la proteína o gen transgénico (88).

11.1.6.4 SISTEMATIZACIÓN DE DATOS

La información registrada en los formatos de campo y laboratorio deberá incorporada y analizada en una base de datos en formato electrónica utilizando los programas estadísticos que correspondan como SPSS.

11.1.6.5 ELABORACIÓN DE INFORMES

Se presentará informes de análisis comparativo que tendrá como fin evaluar la situación actual de productos procesados y ultra-procesados de consumo masivo comercializados en el país en referencia al contenido de OGM y su impacto en la seguridad alimentaria. El mismo que deberá estar sustentado por los reportes del ensayo del laboratorio responsable.

11.2 ANEXO N° 2.- REGISTRO DE TOMA DE MUESTRA

FICHA DE TOMA DE MUESTRA

FECHA		
DIA	MES	AÑO

HORA	
Hrs	Min

DATOS DEL ANALISTA

APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES

1.- DATOS DEL ESTABLECIMIENTO

NOMBRE

DIRECCIÓN

AVENIDA		CALLE		PASAJE		JIRON		URB. O LUGAR	

DISTRITO	NÚMERO	INTERIOR

2.- DATOS DE LA MUESTRA

CATEGORIA DE ALIMENTO:
Lácteos ( ) Grasas y aceites ( ) cereales y drv. ( ) Panadería ( ) Carne y drv. ( ) Bebidas ( )

NOMBRE COMERCIAL
NOMBRE REAL
N° DE LOTE

PESO

TEMPERATURA

PRECIO

DECLARA CONTENIDO TRANSGËNICO

SI		NO	

OBSERVACIONES

Lima, _____de_____de_____

_____
Firma del analista
DNI Nº _____

11.3 ANEXO N° 3.- PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ADN N°1

(Método de extracción utilizando Kit Comercial I modificado)

PROCEDIMIENTO

1. Separar 0,23g de muestra, cortarla en pequeños pedazos o usar un homogenizador.
2. Colocar la muestra en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y re-suspenderlo con 180µl de Solución de Digestión.
3. Añadir 4µl de solución de Proteinasa K y mezclarlo fuertemente agitándolo o pipeteando para obtener una suspensión uniforme.
4. Incubar la muestra a 56°C por 30 min hasta que el tejido este completamente lisado y no queden restos de partículas. Durante la incubación agitar los tubos ocasionalmente usando un baño de agua rotativo, una plataforma con movimiento o un termomixer.
5. Añadir 20µl de Solución A de Rnasa, mezclar por agitación y luego incubar por 10 minutos a temperatura de ambiente.
6. Añadir 200µl de Solución de Lisis. Mezclar fuertemente por agitación por 15 segundos hasta que se obtenga una mezcla homogenizada.
7. Añadir 400µl de etanol al 50% y mezclar por pipeteo o agitación.
8. Transferir el preparado de lisis a una columna de purificación insertado en el tubo colector. Centrifugar la columna por un minuto a 8700 rpm. Descartar el tubo colector que contiene la solución sobrante. Pasar la columna de purificación a un nuevo tubo colector de 2ml.
9. Añadir 200µl de Solución de Lisis. Mezclar fuertemente por agitación por 15 segundos hasta que se obtenga una mezcla homogenizada y añadir 700µl de Buffer de Lavado I (con etanol añadido). Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descartar lo sobrante y pasar la columna de purificación anterior en un tubo colector. Volver a centrifugar.
10. Añadir 500µl de Buffer de Lavado II (con etanol añadido) hacia la columna de purificación. Centrifugar por tres minutos a 12000rpm.

11. Añadir 200µl de Elusión Buffer al centro de la membrana de la columna de purificación para eludir el ADN genómico. Incubar por 2 minutos a temperatura de ambiente y centrifugar por 1 minuto a 8000rpm.
12. Descartar la columna de purificación. Usar el ADN purificado inmediatamente o almacenar a -20°C.

11.4 ANEXO N° 4.- PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ADN N°2

(Método de extracción utilizando Kit comercial II modificado)

PROCEDIMIENTO

1. Pesar entre 100 y 80mg de muestra almacena previamente durante 21 días en cloroformo debe ser homogenizada y trasladado en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml.
2. En un tubo eppendorf de 1,5ml, mezclar la muestra con 400µl de solución lisis e incubar 65°C por 20 minutos.
3. Agregar 20 µl de proteinasa K e incubar a 56°C por 20min con agitación moderada.
4. Inmediatamente agregar 600µl de cloroformo, emulsificar por inversión del tubo (3-5 veces) y centrifugar a 10000rpm por dos minutos.
5. Al mismo tiempo, ir preparando la solución de precipitación: Por cada muestra mezclar 360µl de agua estéril y 40µl de solución de precipitación 10X.
6. Al terminar los 2 minutos de centrifugación, transferir la fase acuosa superior (que contiene el ADN) a un nuevo tubo eppendorf rotulado y agregar 400µl de la solución de precipitación recién preparada, mezclar con movimientos de inversión fuertes a temperatura de ambiente por uno a dos minutos y centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos.
7. Remover completamente el sobrenadante y disolver, con movimientos fuertes, el pellet del ADN en 50µl de solución de NaCl, asegurando que el pellet se disuelva completamente.
8. Agregar 150µl de etanol absoluto helado, dejar que el ADN precipite completamente llevando a -20°C por 10 minutos. Realizar un centrifugado (10000rpm por 3-4 minutos). Remover el etanol y dejar secar el pellet de ADN.
9. Disolver completamente el ADN en 60µl de agua desionizada estéril o en TE low (TE 20:1). Guardar en refrigeración hasta su uso.

11.5 ANEXO N° 5.- PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ADN.

(Método estándar de electroforesis en gel de agarosa)

PROCEDIMIENTO

1. Sellar los bordes de una bandeja de gel limpia, seca y de plástico. Coloque adecuadamente el peine para que complete el pozo que será formado cuando se añada la solución agarosa en la misma.
2. Diluir 25X TBE Buffer para preparar la cantidad apropiada de 1X TBE Buffer para llenar el tanque de electroforesis y preparar el gel.
3. Pesar el compuesto de agarosa en polvo de acuerdo a la tabla y añadirlo a una cantidad apropiada de 1X TBE Buffer en un matraz de Erlenmeyer con una tapa holgada/suelta
4. Calentar la solución en el microondas o en un baño maría hasta que la agarosa se disuelva
5. Enfriar la mezcla a 50-60°C.Verter la solución en la bandeja y permitir que se forme. La cantidad de gel utilizado debe corresponde a una profundidad aproximada entre 3-5mm.
6. Después de que el gel se halla formado completamente retirar con cuidado el peine y la cinta adhesiva y colocar el gel en el tanque de electroforesis. Añadir 1X Buffer TBE al tanque de electroforesis para cubrir el gel a una profundidad aproximada entre 2-5mm.
7. Cargar cada muestra en los pocillos consecutivos. Cerrar la tapa del tanque de electroforesis y conecta los conductores eléctricos de manera que ADN migrará hacia el ánodo.
8. Apagar la corriente y quitar los cables. Colocar el gel en una caja de luz UV y fotografiar el gel.

TABLA 20.- Concentraciones en gel de agarosa según primer utilizado para la detección cualitativa de OGM en alimentos

Concentración	GMO3/GMO4	P35S–cf3/cr4	HA-nos1 18f/r	CRYIA3/4
1,5%	X			
2,5%		X	X	X

11.6 ANEXO N° 6.- PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN CUALITATIVA DE ADN TRANSGÉNICO

(Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa –PCR)

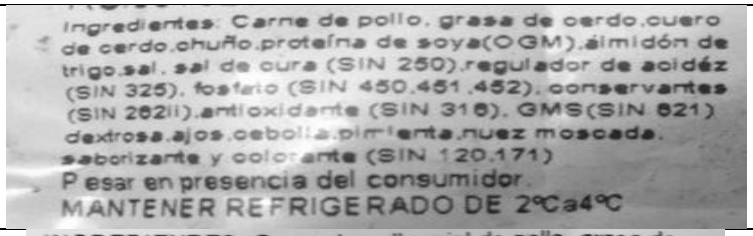
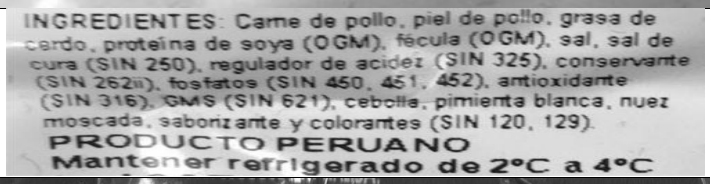
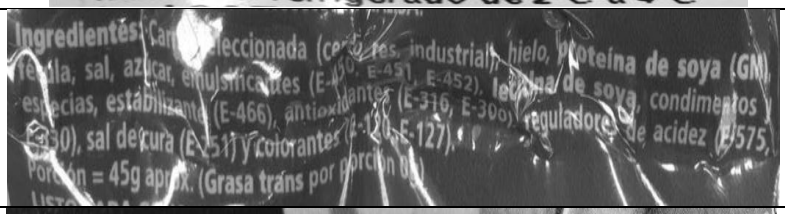
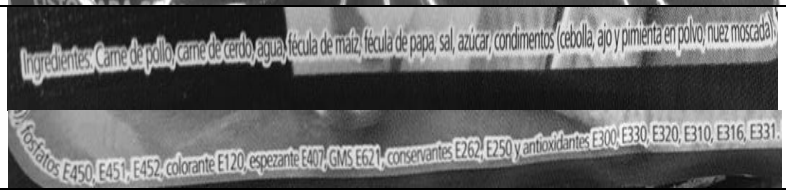
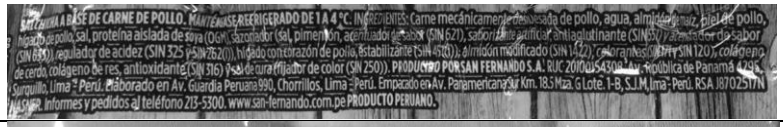
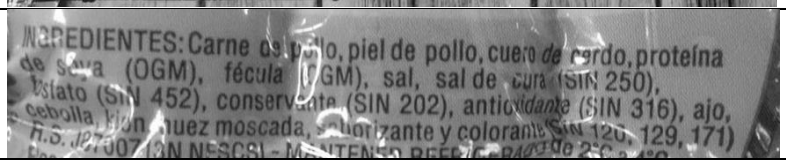
PROCEDIMIENTO

1. En un tubo de microcentrífuga de 1,5ml añadir los reactivos de acuerdo a los valores establecidos de la solución maestra y en el orden dado.
2. Mezclar cuidadosamente la solución maestra por pipeteo y centrifugar rápidamente.
3. Dividir la solución maestra en alícuotas de 23µl en tubos de PCR de 0.2ml.
4. Añadir 2µl de solución de ADN a las alícuotas (23µl solución maestra/2µl de ADN).
5. Agitar cuidadosamente y centrifugar rápidamente.
6. Colocar los tubos de PCR en el termociclador* y seleccionar las condiciones con respecto a temperaturas y tiempos.
7. Seguido de la amplificación las muestras deben de ser centrifugadas rápidamente y puestas en hielo.

* Termociclador Mastercycler gradient

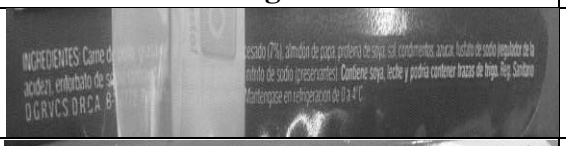
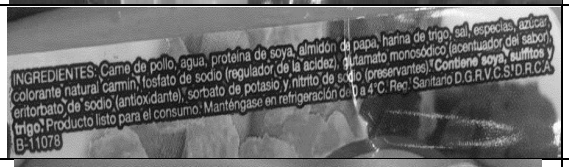
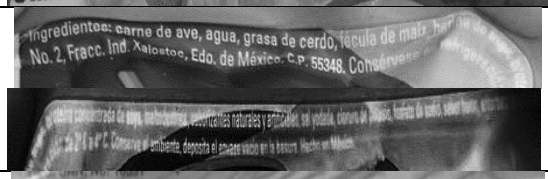
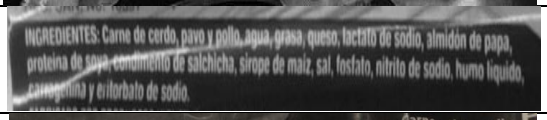
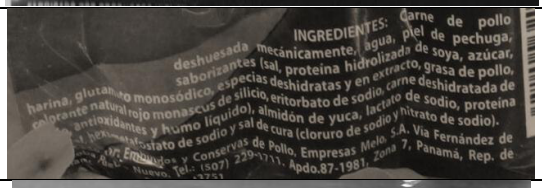
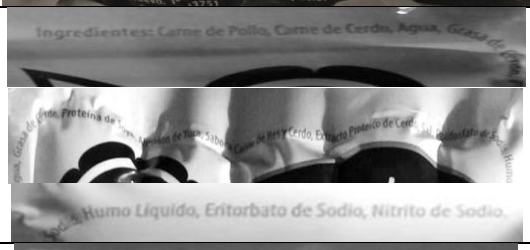
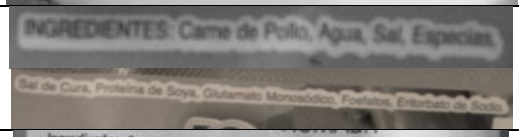
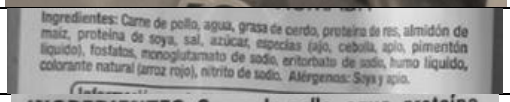
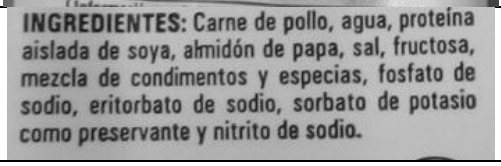
11.7 ANEXO N° 7.- LISTA DE INGREDIENTES DE MUESTRAS

TABLA 21.- Ingredientes de las muestras objeto de estudio de la categoría salchichas tipo Hot Dog de pollo

Muestra	Fotografía
A01	
A02	
A03	
A04	
A05	**Rotulado en junio 2017**  **Rotulado en enero 2018** 
A06	

11.8 ANEXO N° 7.- LISTA DE INGREDIENTES DE PRODUCTOS INTERNACIONALES TIPO HOT DOG

TABLA 22.- Ingredientes de productos tipo salchichas tipo Hot Dog de pollo comercializados en los países de San Salvador y Panamá

Muestra	Fotografía	País
B01		San Salvador
B02		San Salvador
B04		San Salvador
C01		Panamá
C02		Panamá
C03		Panamá
C04		Panamá
C05		Panamá
C06		Panamá