



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**Aislamiento y evaluación de la integridad de ADN mediante el método de extracción CTAB y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras de balanceados de consumo animal preparado a base de maíz**

**Gabriela Margarita Garrido Ortiz**  
**Antonio León, Ph.D., Director de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito  
para la obtención del título de Ingeniera en Alimentos

Quito, mayo de 2015

**Universidad San Francisco de Quito**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**HOJA DE APROBACION DE TESIS**

**Aislamiento y evaluación de la integridad de ADN mediante el método de extracción CTAB y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras de balanceados de consumo animal preparado a base de maíz**

**Gabriela Margarita Garrido Ortiz**

Antonio León, Ph.D.,  
Director de Tesis

---

Javier Garrido, MSc.,  
Coordinador de Ingeniería de Alimentos

---

Lucía Ramírez, Ph.D.,  
Miembro del Comité de Tesis

---

Ximena Córdova Vallejo, Ph.D.,  
Decana Escuela de Ingeniería  
Colegio de Ciencias e Ingeniería

---

Quito, mayo de 2015

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: Gabriela Margarita Garrido Ortiz

C. I.: 1722319363

Fecha: Quito, mayo de 2015

## **Dedicatoria**

Dedico, enteramente, este proyecto y mi esfuerzo a mi padre Diego, a mi madre Margarita y a mi hermano Diego José, que han sido la gran ilusión de mi vida, la razón de mi alegría y el motivo que me impulsa a despertar cada mañana con ganas de salir adelante para ser una mejor persona, y así poder recompensar un poco del inmenso amor y dedicación que me han brindado.

Papi, Mami y Diegui les dedico este logro en símbolo de lo mucho que les quiero, de todo lo que representan para mí y de infinita gratitud.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi familia y amigos que han sabido motivarme y darme fuerzas para no dejarme vencer.

Agradezco a mi profesor Antonio León por la confianza que tuvo en mí, por su guía para el desarrollo de este proyecto, su dedicación, su tiempo, su paciencia y sobretodo su amistad.

Agradezco a mis profesores de la carrera de Ingeniería en Alimentos: Lucía Ramírez, Francisco Carvajal y Javier Garrido por no solamente, enseñarme materia de ingeniería, sino también consejos de vida.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio especialmente a Marlon Carvajal y Noelia Barriga por compartirme sus conocimientos y amistad.

## RESUMEN

La presente investigación busca aislar y evaluar la integridad de ADN mediante el método de extracción CTAB y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras de balanceados de consumo animal preparado a base de maíz. A través del análisis PCR se pretende reconocer la presencia del promotor *CaMV 35S* y el terminador *NOS*, ya que son indicadores de origen transgénico. Se seleccionó un alimento balanceado representativo de los métodos de producción comercializados en el Ecuador (Extruido, peletizado y expandido), analizando muestras tomadas de las etapas del proceso de elaboración. Además se confirmó la presencia de maíz en dichas muestras utilizando el gen de la *Invertasa*. Con esto se concluyó que en los tres productos analizados se puede extraer ADN genómico de maíz de buena calidad durante las etapas de procesamiento que comprenden materia prima, molienda y mezcla. En este estudio se concluye, que partir de la etapa de acondicionamiento el ADN comenzó a degradarse debido al tratamiento térmico y la acción de DNAsas, impidiendo ser analizado mediante PCR.

## ABSTRACT

This investigation seeks to isolate and evaluate the DNA integrity in samples of pet food that contains corn by the method of CTAB extraction and polymerase chain reaction (PCR). PCR analysis was executed to recognize the presence of *CaMV* 35S promoter and *NOS* terminator, which are indicators of transgenic origin. A representative pet food from each production method sold in Ecuador (extruded, pelletized and expanded), were selected to be analyzed, taking samples of the stages along its production process. The presence of corn was confirmed by using the *Invertase* gene. The results obtained are that, in the three analyzed products, good quality corn genomic DNA can be isolated only during the three first processing stages (raw materials, grinding and mixing). The conclusion is that since the conditioning step the DNA started to be degraded, because of the heat treatment and DNase action, inhibiting the PCR analysis.

## Tabla de contenido

<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
Objetivo Principal .....	19
Objetivos secundarios .....	19
<b>METODOS Y MATERIALES.....</b>	<b>20</b>
Selección de Muestras .....	20
Extracción de ADN.....	21
Estimación de calidad del ADN.....	22
Cuantificación ADN .....	22
Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR .....	23
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
Cuantificación y análisis de la calidad de ADN extraído mediante el método CTAB modificado .....	25
Optimización de temperatura de anillamiento (Ta) en muestra de maíz transgénico usando los cebadores específicos para detectar el gen promotor <i>CaMV</i> 35S, el terminador <i>NOS</i> y el gen de <i>Invertasa</i> .....	28
Análisis mediante PCR usando cebadores específicos de <i>Invertasa</i> en muestras de alimentos balanceados elaboradas a partir de maíz convencional durante las etapas de procesamiento .....	31
Análisis de PCR para amplificar el gen promotor <i>CaMV</i> 35S .....	34
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>

## Lista de Tablas y Figuras

Tabla 1 Etapas donde se realizó la toma de muestras dentro del procesamiento de cada producto ....	20
Tabla 2 Cebadores específicos .....	23
Tabla 3: Gradiente de temperaturas de anillamiento (Ta) en análisis de <i>CaMV 35S</i> , <i>Invertasa</i> , Terminador <i>NOS</i> .....	24
Tabla 4 Concentración y calidad de ADN extraído de los productos A, B y C.....	26
Figura 1C Extracción de ADN de las muestras en proceso expandido .....	27
Figura 2 PCR en gradiente de temperaturas de anillamiento de <i>Invertasa</i> .....	29
Figura 3 PCR en gradiente de temperatura de anillamiento de <i>promotor CaMV 35S</i> .....	29
Figura 4 PCR en gradiente de temperaturas de anillamiento de <i>terminador NOS</i> .....	30
Figura 5 PCR de <i>Invertasa</i> en muestras de producto extruido.....	32
Figura 6 PCR de <i>Invertasa</i> en muestras de producto peletizado.....	32
Figura 7 PCR de <i>Invertasa</i> en muestras de producto expandido .....	33
Figura 8 PCR promotor <i>CaMV 35S</i> .....	35

## INTRODUCCIÓN

El maíz es una gramínea que, como sugieren los hallazgos de mazorcas en lugares arqueológicos, data sus orígenes hace más de 5000 años en México y América Central [22]. Se estima que desde el año 1000 DC agricultores ya realizaban mejoras genéticas al maíz, es decir seleccionaban semillas de las mejores mazorcas para poderlas cultivar en la próxima siembra. Desde ese momento hasta la actualidad (con el maíz modificado mediante ingeniería genética) no se ha detenido la mejora de este cereal [22].

En el Ecuador, de acuerdo al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), en el año 2014 la producción de maíz convencional, a nivel nacional, fue de aproximadamente 773.000 Tm en época de invierno y 200.000 Tm en época de verano, dando un total aproximado de 973.000 Tm al año. En el 2015 se estima una cosecha de 1'200.000 Tm a nivel nacional. En Ecuador, PRONACA es el mayor comprador de maíz, el cual lo destina mayoritariamente a la elaboración de alimentos balanceados de consumo animal [26].

El uso del maíz en dicho tipo de alimentos cumple la función de aportar con carbohidratos, es decir es una fuente de energía en la dieta de los animales y también actúa como un aglutinante natural en alimentos peletizados y extruidos [26].

Un alimento balanceado es un producto destinado para el consumo animal, desarrollado con formulaciones específicas para cumplir con los requerimientos

nutricionales y energéticos de cada individuo en las distintas etapas de crecimiento y de acuerdo a su estilo de vida [13]. Con el objetivo de aumentar la eficiencia del proceso digestivo, que incluye la captura del alimento y la absorción de nutrientes, se utiliza distintos métodos de procesamiento [13].

Los métodos utilizados para la elaboración de los alimentos balanceados son: La extrusión, que es un proceso donde, por medio de presión (50 Bar), calor (110°C), humedad (35%) y fricción, se provoca la gelatinización de los almidones y una expansión exotérmica [25]. El peletizado, que incluye, durante su proceso, una temperatura de 92°C, una humedad de 13% y una presión de 1,0 Bar, para posteriormente comprimir la mezcla del alimento través de agujeros de metal (dado) y formar pellets, para utilizar los alimentos finales de manera más eficiente [6]. Finalmente, el expandido, que es un proceso en el que se somete a la mezcla molida, a una humedad de 0.12%, una presión de 35 Bar y una temperatura de 105°C- 110°C, esto con el objetivo de gelatinizar el almidón [26].

Es necesario mencionar que previo a los procesos de extrusión, peletizado o expandido el maíz en grano es molido (alcanzando en esta etapa una temperatura de 35°C y con una humedad de 10%) para asegurar un tamaño de partícula que permita la adecuada cocción durante los tratamientos térmicos [26]. Posteriormente a este proceso, se realiza el mezclado, a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) con demás componentes del producto final, como son la pasta de soya, aditivos antimicrobianos y vitaminas [13]. Posteriormente viene el acondicionado, que es una etapa de procesamiento donde mediante tratamiento térmico (90°C) e incremento de

humedad (30%), se mejora las características físicas, nutricionales e higiénicas del alimento [26]. Estos beneficios se deben, principalmente, a que gracias al tratamiento térmico se desnaturalizan las proteínas y se gelatiniza el almidón, lo que convierte a la mezcla molida en un producto apto para ser compactado, aumentando la digestibilidad del alimento [26]. Las características higiénicas del alimento se ven mejoradas ya que el tratamiento térmico, a partir de los 30 segundos, disminuye la carga bacteriana [26].

Un organismo transgénico es aquel cuyo material genético ha sido modificado mediante ingeniería genética con el objetivo de alterar o añadir la función de un gen con característica deseada [11]. La modificación genética, específicamente en maíz, se realiza para incluir características esperadas como aumentar la producción de almidón y principalmente generar tolerancia a herbicidas, pesticidas y resistencia a condiciones climáticas [18]. Así es el caso del maíz Roundup Ready™ (Marca comercial de Monsanto), que presenta resistencia a glifosato (principal herbicida del mercado mundial), dado que el sitio de acción del glifosato es la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (*EPSPS*) la cual está vinculada con la síntesis de aminoácidos esenciales [29]. A esta variedad de maíz se le añadió un gen *EPSPS* resistente a glifosato de origen bacteriano, lo que convierte al cultivo resistente a dicho herbicida [29]. El maíz *Bt* es una variedad de maíz genéticamente modificada a la cual se le ha añadido proteínas Cry provenientes *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) [29]. Dichas proteínas resultan tóxicas para las larvas de insectos lepidópteros que se alimentan de tallos y hojas de este cultivo, Generando así cultivos resistentes a insectos lepidópteros [29].

Dicha modificación genética se evidencia con la presencia del gen promotor *CaMV 35S* en el 95% de las plantas transgénicas, el cual proviene del *Virus del mosaico de la coliflor* y se constituye como un enlace entre el gen transgénico y el genoma originario de la planta, ya que clonado con otros genes de interés puede formar moléculas recombinantes con el ADN, para obtener una sobreexpresión del gen de interés [12]. Este promotor está insertado en las plantas de maíz *Bt* y Roundup Ready™ [40].

*Agrobacterium tumefaciens* es un organismo patógeno, que de manera natural transfiere genes que dirigen la síntesis de hormonas de la planta provocando un crecimiento anormal de las células que genera tumores [20]. De aquí la importancia de *Agrobacterium tumefaciens* para apoyar métodos de modificación genética, ya que se descubrió que este patógeno podría usarse para insertar genes de interés comercial, al conocer su capacidad de introducir los genes candidatos con características deseadas [20]. El terminador *NOS* proviene del gen *Nopalina sintasa* de *Agrobacterium tumefaciens* y se encarga de marcar la terminación de la expresión del gen tolerante a herbicidas y a insectos, por esto es un elemento común en los vegetales genéticamente modificados y que sirve como referencia para su identificación [21].

Actualmente, las técnicas para identificar la presencia de transgénicos en alimentos se han enfocado en la trazabilidad del producto, es decir, conociendo el origen de la materia prima [12]. Por otro lado, los genes de referencia transgénica, son detectables por medio de varios métodos, como son Enzyme-Linked

ImmunoSorbent Assay (ELISA), Southern Blot, Northern Blot, Western Blot, y mediante reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) [36]. En la presente investigación se investigó la trazabilidad de maíz transgénico mediante PCR, por su alta especificidad y sensibilidad dada por la acción de cebadores, los cuales trabajan con determinadas secuencias de pares de bases para amplificar regiones específicas de ADN o genes deseados [36].

El análisis de la PCR se basa en la amplificación exponencial de la secuencia de ADN deseada, esto ocurre por medio de la reacción catalizada por la enzima *Taq* polimerasa en presencia de cebadores en una reacción buffer [19]. La amplificación del ADN es un proceso cíclico que consiste en: desnaturalización de la doble banda de DNA dejándolas en bandas simples por acción del calor, anillamiento de los cebadores a la secuencia deseada, y finalmente la extensión, donde los cebadores realizan copias del segmento deseado por acción de la DNA *Taq* polimerasa [19].

Para obtener el ADN deseado, se realiza un proceso de extracción que se basa en fracturar físicamente las membranas celulares del tejido, moliéndolas, para luego utilizar el buffer de extracción CTAB, el cual abre estas membranas, localiza el ADN y lo extrae [8]. Posteriormente se utiliza precipitaciones de soluciones alcohólicas para separar el ADN de demás componentes que pueden inhibir la reacción enzimática de la PCR [10].

La primera planta modificada genética fue el tabaco resistente al antibiótico kanamicina, y fue creada en 1983, en laboratorios europeos, después de varios intentos de producir organismos con características deseadas como resistencia al

clima y plagas [40]. Sin embargo, en 1994 se introduce al tomate larga vida, como la primera planta genéticamente modificada para producción comercial [40]. Posteriormente, se difunde el uso de los transgénicos a gran escala, desatando paralelamente una controversia a nivel mundial, en la cual existen básicamente dos posturas [33]. La primera, quienes ven en el uso de transgénicos la solución a los problemas de alimentación y que aseguran que el uso de transgénicos ayudará a solventar el problema de hambre mundial, a través de aumentar la eficiencia de los procesos agrícolas y por otro lado, quienes aseguran que con la utilización generalizada de semillas modificadas genéticamente a nivel mundial, no solo se llegarán a perder la semillas originales y naturales, sino que temen que los alimentos transgénicos puedan producir efectos dañinos en el organismo y en la salud de los consumidores, y de lo cual aducen, existen muy pocas investigaciones que garanticen su uso [17, 23].

A nivel mundial dato del año 2014, se cultiva alrededor de 181 millones de hectáreas de cultivos transgénicos [40]. El segundo alimento transgénico más cultivado después de la soya, es el maíz [40]. El cultivo mundial de alimentos transgénicos se distribuye principalmente entre Estados Unidos (73'0 millones de hectáreas), Brasil (42'0 millones de hectáreas), Argentina (24'3 millones de hectáreas), India (11'6 millones de hectáreas), Canadá (11'6 millones de hectáreas), China (3'9 millones de hectáreas), Paraguay (3'9 millones de hectáreas), Pakistán (2'9 millones de hectáreas), Sudáfrica (2'7 millones de hectáreas) y Uruguay (1'6 millones de hectáreas) [37].

Aunque como indica Nicolía et al. (2013), no se ha obtenido ninguna investigación confiable que indique con certeza de los efectos dañinos sobre el ambiente, animales y salud humana, que se les atribuyen a los alimentos genéticamente modificados. Lo que si se ha logrado asegurar es el notable aumento de productividad que involucran dichos alimentos [30], lo que se ve reflejado en los beneficios económicos de varios países [11]. Un ejemplo de esto, es el caso de Argentina, el cual siembra semillas transgénicas permitiendo el incremento de su producción y, de esta manera, logrando que exista un excedente para exportar hacia países como Ecuador, en donde actualmente no se siembran transgénicos, pero se consumen a través de productos elaborados finales, dado que la producción interna no abastece el mercado nacional y es necesario importar materias primas genéticamente modificadas [9]. En el Ecuador, de acuerdo al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, se estima que en los años 2013 y 2014 existió un faltante de maíz de aproximadamente 150.000 Tm en cada año, lo que tuvo que ser importado de países como Argentina.

Dada la polémica ética – sanitaria existente, varios países han incluido en su legislación leyes y reglamentos con la finalidad de regular la siembra y el consumo de productos transgénicos, y con el objetivo de permitir que sea el consumidor quien finalmente decida de forma consiente acerca de lo que consume [3]. Específicamente en el caso ecuatoriano la constitución lo establece en su artículo 401:

Constitución de la República del Ecuador (2008):

Art. 401.- Se declara al Ecuador libre de cultivos y semillas transgénicas. Excepcionalmente, y sólo en caso de interés nacional debidamente fundamentado por la Presidencia de la República y aprobado por la Asamblea Nacional, se podrán introducir semillas y cultivos genéticamente modificados. El Estado regulará bajo estrictas normas de bioseguridad, el uso y el desarrollo de la biotecnología moderna y sus productos, así como su experimentación, uso y comercialización. Se prohíbe la aplicación de biotecnologías riesgosas o experimentales [5].

Es por esto, que para el caso de Ecuador, la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria, ARCSA, exige que se mencione en el etiquetado la presencia de materias primas transgénicas en los productos alimenticios [1]. Por lo tanto, resulta importante que en el Ecuador se realicen investigaciones con la finalidad de establecer procedimientos definidos que permitan identificar con certeza la presencia de organismos genéticamente modificados en productos alimenticios.

## OBJETIVOS

### Objetivo Principal

Aislar y evaluar la integridad de ADN mediante el método de extracción CTAB y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras de balanceados de consumo animal preparado a base de maíz.

### Objetivos secundarios

- Recopilar muestras de productos balanceados durante su proceso de elaboración.
- Extraer ADN genómico en las distintas etapas de procesamiento de los alimentos balanceados mediante el método CTAB modificado.
- Verificar que el ADN extraído se encuentra en óptimas condiciones para ser analizado mediante PCR usando métodos espectrofotométricos y electroforesis.
- Amplificar el gen *Invertasa* del maíz como control positivo, y asegurarse que el ADN extraído es efectivamente proveniente de ese vegetal,
- Estandarizar la PCR para detectar los genes transgénicos *CaMV 35S* y terminador *NOS* del maíz, con oligonucleótidos específicos.

- Determinar las condiciones y el nivel de procesamiento límite del alimento balanceado, en el que se puede detectar ADN intacto para sometimiento de análisis en base de PCR.

## METODOS Y MATERIALES

### Selección de Muestras

De los métodos de producción de alimentos balanceados más empleados en el Ecuador, los cuales son extruido (A), peletizado (B) y expandido (C), se recolectó una muestra representativa de cada tipo [26]. El producto extruido cuenta con un 45,0% de maíz en su composición, mientras que el producto peletizado contiene 50,8% y el expandido 50,4%.

Se tomaron muestras de las siguientes etapas dentro del procesamiento de cada producto (Tabla1).

<b>A</b>		<b>B</b>		<b>C</b>	
<b>Extruido</b>		<b>Peletizado</b>		<b>Expandido</b>	
1	Grano	1	Grano	1	Grano
2	Molienda	2	Molido	2	Molienda
3	Mezcla	3	Mezcla	3	Mezcla
4	Acondicionado	4	Acondicionado	4	Acondicionado
5	Extruido	5	Peletizado	5	Expandido
		6	Enfriado		
		7	Producto final engrasado		

Tabla 1 Etapas donde se realizó la toma de muestras dentro del procesamiento de cada producto

## Extracción de ADN

Este proceso se realizó siguiendo el protocolo de extracción de ADN para vegetales estandarizado en el laboratorio de Biotecnología agrícola y de alimentos de la USFQ basado en el protocolo de Colombo et al. (1998), al cual se le realizó algunas modificaciones que se aclaran en la descripción del protocolo, detallado a continuación.

Se inició el proceso utilizando un mortero, en el cual se maceró la muestra junto con nitrógeno líquido. Inmediatamente se recogió 200 mg de polvo fino de muestra en un tubo Eppendorf de 2 mL y se añadió 750  $\mu$ L de solución Buffer de extracción CTAB con  $\beta$ -Mercaptoetanol (utilizado para eliminar polisacáridos y polifenoles) [27], precalentada a 65°C. Se incubaron las muestras a 65°C en baño maría durante 30 minutos. Posteriormente se les centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. A este sobrenadante se le agregó 700  $\mu$ L de Cloroformo:Alcohol isoamílico en concentración 24:1, y se llevó a centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. Como modificación al protocolo, con el objetivo de aumentar la pureza del ADN extraído, se agregó 500  $\mu$ L de isopropanol y se incubó a -20°C durante 20 minutos. A continuación se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se enjuagó el pellet con 500  $\mu$ L de etanol al 76% y 500  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  10mM. Se centrifugó a 10000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 250  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  PCR y se disolvió el pellet. Se añadió 50  $\mu$ L de  $\text{NaAc}$  3M (pH 5.2) y 500  $\mu$ L de Isopropanol. Se incubó a 4°C por 10

minutos, se llevó a centrifugación a 10000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Siguiendo con el protocolo, se lavó el pellet con alcohol al 70%, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante nuevamente. Se dejó secar el pellet durante 25 minutos y se lo disolvió en 100  $\mu$ L de agua PCR, en donde se añadió 3  $\mu$ L de PureLink™ RNAsa Invitrogen y se llevó a incubación a 37°C por 30 minutos. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -20°C.

## **Estimación de calidad del ADN**

Para estimar la calidad del ADN se realizó electroforesis según lo realizado por Fernández et al. (2012), que indica que se deben correr las muestras de ADN en un gel de agarosa al 2% con 2  $\mu$ L de Diamond™ Nucleic Acid Dye. Se colocó 4  $\mu$ L de cada muestra de ADN con 2  $\mu$ L de colorante BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X), colocando en el primer pocillo, del gel, el marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder Promega). Se corrió en una cámara de electroforesis horizontal Labnet Enduro Gel XL E0160, en un Buffer de TAE 1X, durante 45 minutos a 80 Voltios. Finalmente se observaron los resultados por medio de un foto-documentador ENDURO™ GDS.

## **Cuantificación ADN**

Como sugiere Fernández et al. (2012), el ADN extraído fue cuantificado en un Espectrofotómetro Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific, se consideró al agua PCR como blanco y posteriormente se midieron las concentraciones colocando 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra en el equipo Nanodrop.

## Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

En el presente estudio se realizaron las reacciones PCR siguiendo el protocolo que sugiere Randhawa y Firke (2006) en donde se indica que las reacciones de amplificación tanto de *Invertasa*, promotor *CaMV 35S*, y terminador *NOS* fueron realizadas en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , de los cuales fueron: 1  $\mu\text{L}$  de ADN con una concentración de 50 ng/ $\mu\text{L}$ ; 2,5  $\mu\text{L}$  de 10X PCR Rxn Buffer (-MgCl<sub>2</sub>) Invitrogen; 2  $\mu\text{L}$  de 50mM MgCl<sub>2</sub> Invitrogen, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs Invitrogen (10 mM); 1  $\mu\text{L}$  de cada cebador Invitrogen en concentración (10mM) [32]; 0,5  $\mu\text{L}$  de Platinum® Taq DNA Polymerase Invitrogen y 16  $\mu\text{L}$  de Ultra Pure™ Distilled Water (DNAse, RNAse Free) Invitrogen.

Los cebadores empleados son:

Gen	Cebador	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Amplicón
<i>Invertasa</i>	IVR1/2	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC	GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC	226 pb
Promotor <i>CaMV 35S</i>	35S-1/2	GCTCCTACAAATGCCATCA	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	195 pb
Terminador <i>NOS</i>	NOS1/3	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	180 pb

Tabla 2 Cebadores específicos

La programación de tiempos y temperaturas del termociclador MultiGene Labnet TC9600-G, empleados en los análisis de PCR, fue la sugerida por Randhawa y Firke (2006) con la variación en las temperaturas de anillamiento ( $T_a$ ) de cada análisis, ya que previamente se realizó un gradiente de temperaturas y se seleccionó la óptima para dicho proceso (Fig. 2, 3, y 4).

<b>Promotor CaMV 35S</b>	<b>Invertasa</b>	<b>Terminador NOS</b>
(°C)	(°C)	(°C)
50.0	60.0	53.3
54.9	60.6	53.6
57.8	61.1	54.1
60.7	62.4	55.4
62.0	63.9	56.9
64.6	65.3	58.3
68.8	66.0	59.0
70.0	67.3	60.3
	68.4	61.4
	69.4	62.4
	69.7	62.7
	70.0	63.0

Tabla 3: Gradiente de temperaturas de anillamiento ( $T_a$ ) en análisis de *CaMV 35S*, *Invertasa*, Terminador *NOS*

En el caso de la *Invertasa* se inició con un proceso de desnaturalización de 12 minutos a 97°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, los  $T_a$  descritos en Tabla 3 por 30 segundos, extensión de 72°C por 1 minuto, para finalmente 72°C por 10 minutos.

Para la amplificación del gen promotor *CaMV 35S* se inició con un proceso de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20

segundos, los Ta descritos en Tabla 3, por 40 segundos y 1 minuto a 72°C de extensión, finalmente 72°C durante 3 minutos.

El protocolo a seguir, cuando se trabajó con el terminador *NOS*, inició con una desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 94°C por 20 segundos, los Ta descritos en Tabla 3 por 40 segundos y 72°C por 1 minuto, finalmente a 72°C por 3 minutos.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Cuantificación y análisis de la calidad de ADN extraído mediante el método CTAB modificado**

Para la extracción de ADN en esta investigación se seleccionó el método de extracción CTAB, que además es parte del protocolo oficial de extracción de la German Food Act, es un proceso de extracción eficiente para plantas y productos alimenticios, porque permite una buena separación entre proteínas-polisacáridos y ADN [10].

Como se indica en la Tabla 4, se midieron las concentraciones de ADN obtenidas mediante espectrometría usando el Nanodrop. A pesar de existir concentración de ADN en todas las muestras en un rango de 90,0 a 869,6 ng/ $\mu$ L, podemos evidenciar con la relación 260/280 nm, usado como parámetro de calidad y pureza, que a partir de la muestra de la etapa de acondicionado, el ADN pierde su calidad puesto que los valores son menores a 1,3. En óptimas condiciones de calidad

de ADN se esperaría que el valor correspondiente a la relación entre la medida obtenida a 260/280 nm sea entre 1,7 y 2,0 [31].

		ng/ $\mu$ L	260/280 nm
<b>A</b>	1	320,6	1,9
	2	336,0	1,8
	3	470,6	1,7
	4	850,0	1,3
	5	90,3	1,3

		ng/ $\mu$ L	260/280 nm
<b>B</b>	1	425,1	1,8
	2	452,3	1,8
	3	743,6	1,7
	4	519,6	1,2
	5	551,4	1,2
	6	356,0	1,1
	7	387,6	1,2

		ng/ $\mu$ L	260/280 nm
<b>C</b>	1	869,6	1,9
	2	470,6	1,8
	3	357,0	1,7
	4	799,0	1,3
	5	803,2	1,3

Tabla 4 Concentración y calidad de ADN extraído de los productos A, B y C

Usando la visualización de ADN mediante electroforesis, en las muestras del producto A, se pudo observar que se extrajo ADN genómico de buena calidad del maíz convencional en grano, del maíz molido y de la mezcla del alimento balanceado (Fig. 1A). En la posterior etapa de acondicionado se puede observar que se logró extraer ADN, pero éste se encuentra degradado y finalmente en la muestra tomada a la salida de la etapa de extrusión se observa una mínima cantidad de ADN en forma de barrido.

En la Fig. 1B y Fig. 1C se muestra el resultado de la extracción de ADN de los productos peletizado y expandido, donde, de igual manera, es clara la presencia de ADN genómico en las tres etapas iniciales del procesamiento, que son maíz en grano, maíz molido y mezcla de balanceado. A partir de la etapa de acondicionado se observan barrido, lo que indica presencia de ADN degradado [7].

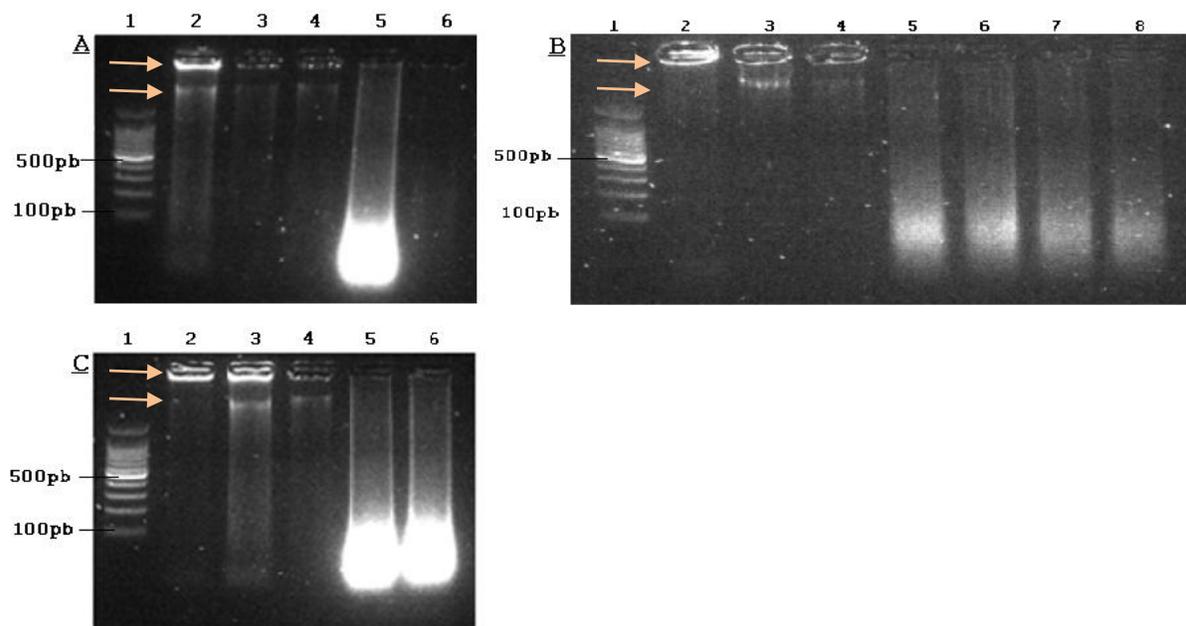


Figura 1A Extracción de ADN de las muestras en proceso extruido: 1: Marcador de peso molecular; 2: Maíz convencional en grano; 3: Maíz molido; 4: Mezcla; 5: Acondicionado; 6: Extruido. Flechas indican ADN genómico intacto

Figura 1B Extracción de ADN de las muestras en proceso pelletizado: 1: Marcador de peso molecular; 2: Maíz convencional en grano; 3: Maíz molido; 4: Mezcla; 5: Acondicionado; 6: Pelletizado; 7: Enfriado; 8: Producto final engrasado

Figura 1C Extracción de ADN de las muestras en proceso expandido 1: Marcador de peso molecular; 2: Maíz convencional en grano; 3: Maíz molido; 4: Mezcla; 5: Acondicionado; 6: Expandido

A pesar de que en el estudio realizado por Arun et al. (2014) se logra extraer ADN de muestras de soya que sufrieron tratamiento térmico a 85°C, en la presente investigación, en las muestras tomadas de procesos que sufrieron tratamiento térmico (desde 90°C), el ADN se modificó obteniendo un ADN degradado lo que conlleva a que los procesos de manufactura, en este caso la exposición al calor, deterioran la calidad del ADN genómico por la activación de DNAsas presentes en la materia prima [10].

## **Optimización de temperatura de anillamiento (Ta) en muestra de maíz transgénico usando los cebadores específicos para detectar el gen promotor *CaMV 35S*, el terminador *NOS* y el gen de *Invertasa*.**

Se realizó un gradiente de temperaturas de anillamiento para la posterior optimización de la reacción de la PCR con la finalidad de determinar la temperatura óptima, tanto para *Invertasa* como para el promotor *CaMV 35S* y terminador *NOS* (Fig. 2, 3 y 4). Con el propósito de obtener resultados confiables y verosímiles en el análisis de PCR, como sugiere la metodología de Greiner et al. (2005), se incrementaron en dichos análisis controles positivos y negativos, donde se usó ADN extraído de granos de maíz transgénico sin ningún tipo de procesamiento como control positivo, ADN proveniente de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* como control negativo para prueba de *Invertasa*, maíz convencional en grano como control negativo para prueba de *CaMV 35S* y Ultra Pure™ Distilled Water (DNase, RNase Free) Invitrogen como blanco.

De esta manera se concluyó, en esta investigación, que la temperatura de anillamiento (Ta) para identificar la presencia de *Invertasa* fue de 69,4°C (Fig. 2) y para el promotor *CaMV 35S* fue 64.6°C (Fig. 3). El resultado obtenido como temperatura óptima para detectar el gen promotor *CaMV 35S* es análogo a la temperatura de anillamiento determinada por Randhawa y Firke (2006), que es de 64°C. Mientras que la temperatura de anillamiento seleccionada como óptima, dentro de las temperaturas de gradiente, para detectar *Invertasa* es superior a lo mostrado

por otros estudios cuya temperatura varia de 62°C a 64°C [12, 34]. A dichas temperaturas de anillamiento, en la presente investigación, tambien se observa la presencia de la banda de 226 bp (correspondiente al peso molecular de la *Invertasa*), mas no es clara. Como se mencionó anteriormente la banda más definida se observa a una temperatura de 69,4°C.

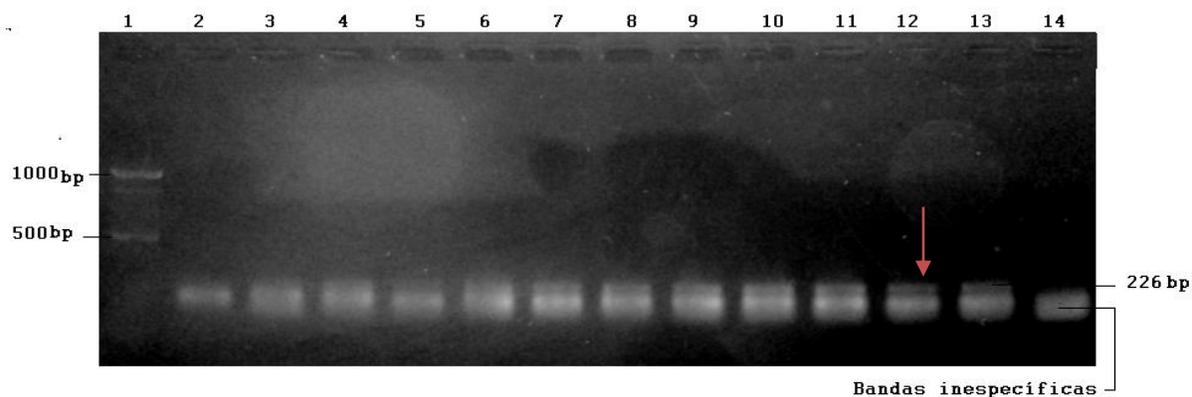


Figura 2 PCR en gradiente de temperaturas de anillamiento de *Invertasa*: 1: Marcador molecular; 2: Blanco; 3: 60°C; 4: 60.6°C; 5: 61.1°C; 6: 62.4°C; 7: 63.9°C; 8: 65.3°C; 9: 66.0°C; 10: 67.3°C; 11: 68.4°C; 12: 69.4°C; 13: 69.7°C; 14: 70.0°C. Flecha indica temperatura óptima de anillamiento.

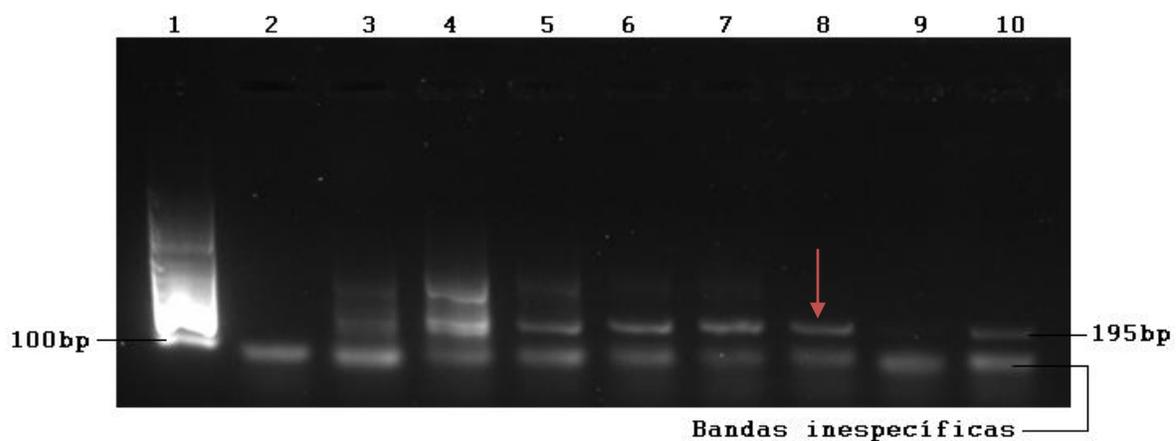


Figura 3 PCR en gradiente de temperatura de anillamiento de *promotor CaMV 35S*: 1: Marcador de peso molecular; 2: Blanco; 3: 50.0°C; 4: 54.9°C; 5: 57.8°C; 6: 60.7°C; 7: 62.0°C; 8: 64.6°C; 9: 68.8°C; 10: 70.0°C. Flecha indica temperatura óptima de anillamiento.

En el caso del terminador *NOS*, ninguna reacción mostró resultados adecuados, ya que mostraron bandas que no pertenecen a la amplificación esperada, que es de 180 bp (Fig. 4). Por tanto se puede concluir que este marcador con estas condiciones no pudieron ser usadas para el análisis de trazabilidad con el gen *NOS*.

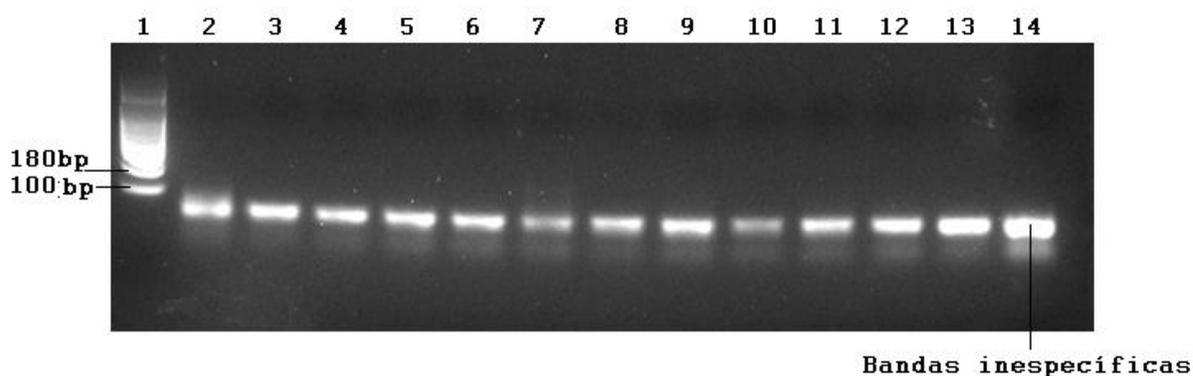


Figura 4 PCR en gradiente de temperaturas de anillamiento de *terminador NOS*: 1: Marcador de peso molecular; 2: Blanco; 3: 53.3°C; 4: 53.6°C; 5: 54.1°C; 6: 55.4°C; 7: 56.9°C; 8: 58.3; 9: 59.0°C; 10: 60.3°C; 11: 61.4°C; 12: 62.4°; 13: 62.7°C; 14: 63°C. Flecha indica tamaño de amplicón del gen *terminador NOS*.

Sin embargo, los resultados obtenidos en los análisis de PCR, tanto de *Invertasa*, como de promotor *CaMV 35S* y terminador *NOS*, muestran unas bandas adicionales de “carácter inespecífico” [14]. Estas bandas tienen un peso molecular que no corresponden al del amplicón de la *Invertasa*, *CaMV 35S* o terminador *NOS* (Fig. 2, 3 y 4). En otros estudios realizados, también aparecen dichas bandas, e igualmente se desconoce su procedencia [12, 14]. Lo que indica que no se debe a contaminación de las muestras, sino que podría existir la posibilidad de que se esté amplificando ADN proveniente de un reactivo usado en la reacción de la PCR, como

la *Taq* polimerasa. Para esto, se midió la concentración de ADN en la *Taq* polimerasa usada en esta investigación, obteniéndose efectivamente como resultado la cantidad de 465,3 ng/ $\mu$ L.

A pesar de esto, basados en estudios previos, no se tomaron en cuenta las bandas extra de origen desconocido [12, 14]. Y se procedió a realizar el análisis de los resultados obtenidos, ya que, según indica la norma ISO 24276, 2006, este análisis es válido, y por lo tanto también sus resultados, debido a la confirmación de los controles positivos y negativos, dejando, de esta manera, a un lado el riesgo de visualizar falsos positivos, por causa de bandas extras [34].

### **Análisis mediante PCR usando cebadores específicos de *Invertasa* en muestras de alimentos balanceados elaboradas a partir de maíz convencional durante las etapas de procesamiento**

Usando las muestras de ADN provenientes del proceso de elaboración de producto extruido, peletizado y expandido, se realizó la amplificación de la *Invertasa* como gen control para detectar la presencia de maíz, mediante la reacción enzimática de la PCR. La calidad y la identidad del ADN extraído en las muestras se confirmaron con la amplificación de *Invertasa*. El ADN proveniente de muestras que no sufrieron tratamiento térmico, fue óptimo y se logró amplificar dicho gen, mientras que en el ADN extraído las muestras obtenidas a partir de la etapa de acondicionado

se evidencia la caída en la calidad de ADN con la imposibilidad de detectar al gen de interés (Fig. 5, 6 y 7).

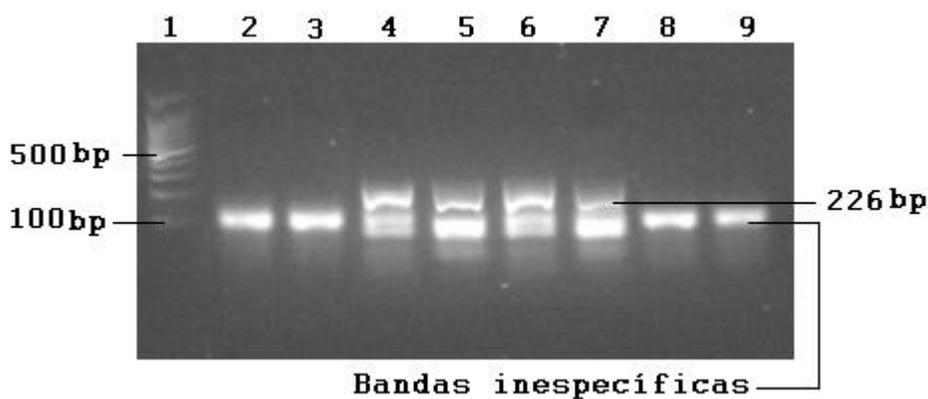


Figura 5 PCR de Invertasa en muestras de producto extruido: 1: Marcador molecular; 2: Blanco; 3: ADN proveniente de *Arabidopsis thaliana*; 4: Maíz transgénico en grano; 5: Maíz convencional en grano; 6: Maíz molido; 7: Mezcla; 8: Acondicionado; 9: Extruido. Bandas de 226 bp indican presencia de *Invertasa*.

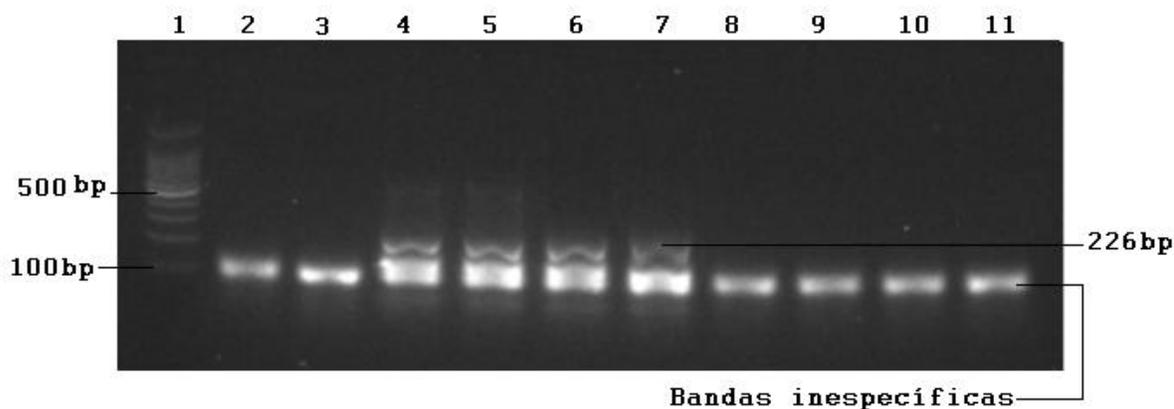


Figura 6 PCR de *Invertasa* en muestras de producto pelletizado: 1: Marcador de peso molecular; 2: Blanco; 3: *Arabidopsis thaliana*; 4: Maíz transgénico en grano; 5: Maíz convencional en grano; 6: Maíz molido; 7: Mezcla; 8: Acondicionado; 9: Pelletizado; 10: Enfriado; 11: Producto final engrasado. Bandas de 226 bp indican presencia de *Invertasa*.

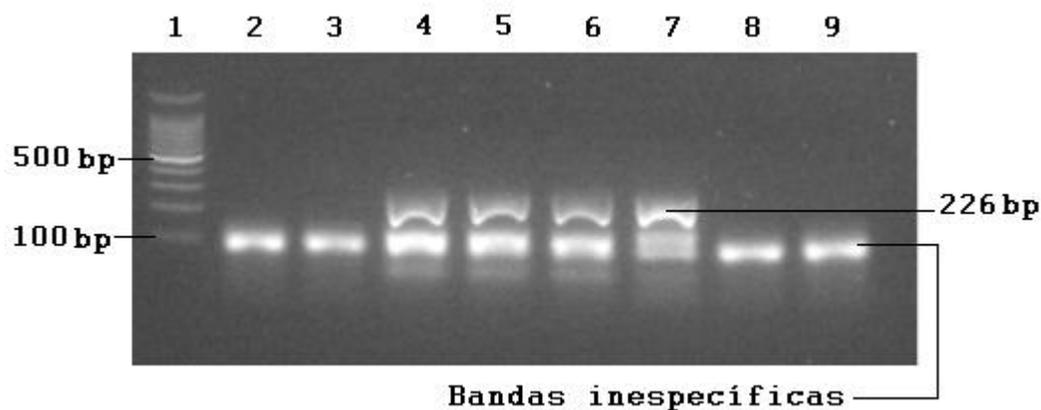


Figura 7 PCR de Invertasa en muestras de producto expandido: 1: Marcador molecular; 2: Blanco; 3: *Arabidopsis thaliana*; 4: Maíz transgénico en grano; 5: Maíz convencional en grano; 6: Maíz molido; 7: Mezcla; 8: Acondicionado; 9: Expandido. Bandas de 226 bp indican presencia de *Invertasa*.

Es cuestionable la degradación de ADN de las muestras por acción del calor durante su procesamiento, tomando en cuenta que durante la reacción PCR (por medio de la cual se analiza los genes) el ADN extraído es sometido a ciclos de temperaturas (97°C) incluso mayores a las del tratamiento térmico (acondicionado 90°C), que deterioró la calidad del ADN haciendo imposible su posterior análisis. Como se menciona en el estudio realizado por Magaña-Gómez et al. (2003) lo que ocurre es que con el tratamiento térmico que reciben los alimentos durante su procesamiento se aumenta la disponibilidad de proteínas (para mayor absorbancia en el intestino del consumidor) y dentro de estas proteínas se encuentran DNAsas (enzimas degradadoras de ADN) que de igual manera aumentan su disponibilidad con dicho tratamiento provocando, de esta manera, un incremento de interacciones entre la proteína (incluyendo enzima DNAsas) y material genético, impidiendo

obtener ADN óptimo para análisis PCR. Mientras que durante la reacción PCR se trabaja con ADN aislado por lo tanto no se corre el riesgo de activar enzimas que lo degraden por acción de calor.

### **Análisis de PCR para amplificar el gen promotor CaMV 35S**

Una vez que se seleccionó la temperatura óptima de anillamiento (64.6°C) para detectar el promotor *CaMV 35S*, se realizó una reacción de PCR usando las muestras blanco que contiene Ultra Pure™ Distilled Water (DNase, RNase Free) Invitrogen, ADN extraído de maíz convencional en grano como control negativo y ADN maíz transgénico en grano como control positivo. Este ensayo, dio resultados esperados, es decir solamente se obtuvo la banda de 195bp (correspondiente al peso molecular de *CaMV 35S*) en el control positivo, mientras que en el blanco y el control negativo no se evidencia dicha banda. De esta manera, se afirma la validez del método estandarizado para detectar este gen (Fig. 8), ya que estos resultados concuerdan con el estudio de Randhawa y Firke (2006) del cual se siguió el protocolo del análisis PCR usando este gen reportero de transgénesis.

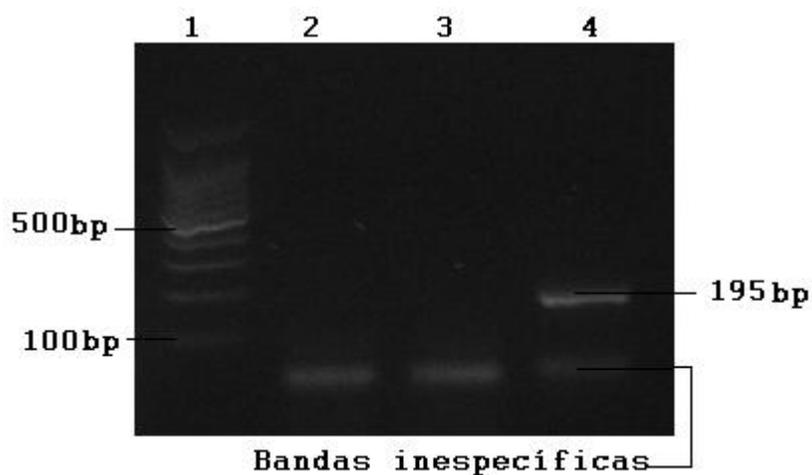


Figura 8 PCR promotor *CaMV 35S*: 1: Marcador de peso molecular; 2: Blanco; 3: Control negativo (ADN maíz convencional en grano); 4: Control positivo (ADN maíz transgénico en grano). Banda de 195bp muestra presencia de promotor *CaMV 35S*.

## CONCLUSIONES

- Se logró recolectar muestras frescas durante las etapas de procesamiento necesarias, que fueron la base del presente análisis.
- Durante las etapas de procesamiento de maíz en grano, molienda y mezcla de los tres productos analizados se pudo extraer ADN genómico de maíz con integridad en su estructura y pureza química usando el método de extracción CTAB.
- Se comprobó la calidad e identidad del ADN extraído detectando la presencia de Invertasa en las muestras. Dicho gen solamente se amplificó en las muestras de las tres etapas iniciales.

- La temperatura de anillamiento óptima, en la presente investigación, para el análisis de PCR del gen *Invertasa* fue de 69.4°C y para el promotor *CaMV 35S* fue de 64.6°C.
- El proceso de detección del terminador *NOS*, mediante PCR, no fue confiable ya que se obtuvieron resultados incoherentes con los controles positivos, negativos y blancos. Además, no se obtuvo el amplicón esperado para este gen.
- La metodología de PCR permite obtener resultados confiables, ya que mediante los controles negativos, positivos y blancos se garantiza el resto del análisis.
- La presencia de bandas extras de “carácter inespecífico” no alteran el resultado durante el reconocimiento e identificación de *Invertasa* y del gen promotor *CaMV 35S*.
- A partir de que los productos fueron sometidos a la etapa de acondicionamiento (reciben un tratamiento térmico de 90°C) se degrada el ADN impidiendo el análisis mediante PCR usando el cebador específico de la *Invertasa*.

## RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de extracción de ADN usando diferentes protocolos para optimizar el proceso de extracción y así posiblemente rescatar trazas de ADN después del acondicionamiento.

- Realizar pruebas con distintos parámetros de tiempo, temperatura, número de ciclos y modificando las secuencias de los cebadores de forma que se validen los presentes resultados para definir un proceso estandarizado de PCR para detectar el terminador *NOS*.
- Realizar pruebas por separado con la finalidad de determinar el efecto del calor sin presencia de humedad ni presión y viceversa sobre el ADN extraído.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] (ARCSA). Transgénicos, Capítulo V, Artículo 22. *Reglamento sanitario sustitutivo de etiquetado de alimentos procesados para el consumo humano*. Quito, Ecuador. 2014
- [2] (ISO), I. O. (2006). Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions. *ISO 24276*.
- [3] Abdel-Mawgood, A., Gassem , M., Alsadon, A., Alghamdi, S., & Al-Doss, A. (2010). Monitoring of genetically modified food in Saudi Arabia. *African Journal of Food Science*, 536-540.
- [4] Arun, Ö., Muratoglu, K., & Yilmaz, F. (2014). The Effect of Heat Processing and pH on PCR Detection of Genetically Modified (GM) Soy in Meat Products. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 765-771.
- [5] Asamblea Nacional Constituyente. (2008). *Constitución de la República del Ecuador* (págs. 30, Artículo 15, Ambiente sano). Montecristi: Registro Oficial No. 449.
- [6] Bortone, E. (2002). Interacción de Ingredientes y Procesos en la Producción de Alimentos Hidroestables para Camarones. *Balanceados Lamar, C.A., Venezuela & Omega Protein, Inc. USA*, 407-437.
- [7] Burgos-Paz, W., Cerón-Muñoz, m., & Moreno-Ochoa, M. (2010). Comparación de métodos para la extracción de ADN en cuyes (*Cavia porcellus* Rodentia, *caviidae*). *Research for Rural Depveloment*.
- [8] Colombo, C., Second, G., Losada, T., & Charrier, A. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 21, 105-113.

- [9] Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, P. (2014). Informe mensual de comercio e inversión. *Ministerio de comercio exterior de Ecuador*, 5.
- [10] Elke, A., Ferruccio, G., Petra, H., Hans, P., & Guy, V. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Technol*, 3-26.
- [11] Elsayed, R. M. (2004). Quality control for foods produced by genetic engineering. *Technischen Universität Berlin*.
- [12] Fernández, M., Da-Silva, A., & Martínez, C. (2012). Análisis de transgénesis mediante PCR de 20 harinas de maíz que se encuentran a la venta en el mercado Uruguayo. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 92-104.
- [13] Genovese, G., & Mejía, M. (2009). Creación de una empresa destinada a la producción de alimento balanceado para perros para la ciudad de Guayaquil. *Escuela Superior Politécnica del Litoral*.
- [14] Gómez-Rodríguez, J., Oudet, N., & Huete-Pérez, J. (2007). Monitoreo de arroz, soya y maíz comercializados en Nicaragua para detección de material transgénico. *Encuentro 2007 Centro de Biología Molecular de la UCA*, 92-104.
- [15] Greiner, R., Konietzny, U., & Villavicencio, A. (2005). Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 753-759.
- [16] Gurinder, R. (2006). Detection of transgenes in genetically modified soybean and maize using polimerase chain reaction. *Indian Journal of Biotechnology*, 510-513.

- [17] Hartnell, G. (2010). Feeding Transgenic Feedstuffs to Cattle. *Monsanto Company*, 68-79.
- [18] Hsu-yang, L., Lih-ching, C., & Daniel, Y.-C. (2000). Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize by the Polymerase Chain Reaction Method. *Journal of Food and Drug Analysis*, 200-207.
- [19] International Organization for Standardization (ISO). (2005). Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products qualitative nucleic acid based methods. *ISO 21571 : 2005*.
- [20] Jovel, J., & Ramírez, P. (2002). Silenciamiento de genes virales: el contraataque de las plantas frente a infecciones de virus fitopat—genos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 49-61.
- [21] Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., & Anklam, E. (1999). IUPAC Collaborative Trial Study of a Method To Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder. *Journal of AOAC International*, 923-928.
- [22] Listman, G., & Estrada, F. (1992). Mexican prize for the giant maize of Jala: source of community pride and genetic resources conservation. *Diversity*, 8, 14-15.
- [23] López, R. (2004). Reflexiones sobre los organismo genéticamente modificados: luces y sombras. En R. Herrera Campos, & M. J. Cazorl, *Aspectos legales de la agricultura transgénica* (págs. 15-23). Universidad de Almería.
- [24] Magaña-Gómez, J., Islas-Osuna, M., Yepiz-Plascencia, G., & Calderón de la Barca, A. (2003). Detección por PCR de un transgenen productos de soya utilizados para formular alimentos. *Fitotec. Mex.*, 236-269.

- [25] Merizalde, F. (2005). Control de calidad en el proceso de fabricación de alimento balanceado extruído para especies acuicolas. *repositorio.ug.edu.ec*.
- [26] Morales, R. (2012). Efecto de dos tipos de acondicionamiento del alimento balanceado en el desempeño en pollos de engorde. *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*.
- [27] Nalini, E., Jawali, N., & Bhagwat, S. (2003). A simple method for isolation of DNA from plants suitable for long term storage and DNA marker. *BARC Newsletter*, 208-214.
- [28] Nicolia, A., Manzo, A., Veronesi, F., & Rosellini, D. (2013). An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Crit Rev Biotechnol*.
- [29] Padgette, S., Re, D., Barry, G., Eichholtz, D., Delannay, X., Fuchs, R., y otros. (1996). New weed control opportunities. En S. Duke, *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Economic, Environmental, Regulatory and Technical Aspects* (págs. 53-80). CRC Press, Inc.
- [30] Parentoni, S. N., De Miranda, R. A., & Garcia, J. C. (2013). Implications on the introduction of transgenics in Brazilian maize. *Brazilian Society of Plant Breeding*, 9-22.
- [31] Promega Corporation. (2014). *Promega*. Recuperado el 12 de 05 de 2015, de How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?: <http://www.promega.com/pubhub>
- [32] Querci, M., Jermini, M., & Van den Ee, G. (2006). Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. *JRC European Commision*.

- [33] Querci, M., Marett, M., & Mazzara, M. (2006). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. *JRC European Commision*, Sesión 9.
- [34] Randhawa, G. J., & Firke, P. K. (2006). Detection of transgenes in genetically modified soybean and maize using polymerase chain reaction. *Indian journal biotechnology*, 510-513.
- [35] Rodríguez, R., Aguilar, C., Ayala, L., Rocha, J., Padilla, V., & Espinosa, T. (2009). Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. *Acta Química Mexicana. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila*.
- [36] Ruiz, O. J. (2012). Monitoreo y detección de maíz transgénico en el Municipio de Erongarícuaro, Michoacán. (pág. 81). Michoacan: Universidad Nacional Autónoma de México.
- [37] Santamarta, J. (2004). Los transgénicos en el mundo . *World Watch*, 24-28.
- [38] Tengeli, C., Schüssler, P., Setzke, E., Balles, J., & Sprenger-Haußels, M. (2001). PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs. *BioTechniques*, 426-429.
- [39] Wadsworth, J. (1997). Eficiencia biológica en la producción animal. En *Análisis de Sistemas de Producción Animal - Tomo 2: las Herramientas Básicas*. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal .
- [40] Zdjelar, G., Nikolić, Z., Vasiljević, I., Bajić, B., Jovičić, D., Ignjatov, M., y otros. (2013). Detection of Genetically Modified Soya, Maize, and Rice. *Czech J. Food Sci.*, 43-48.