

## Nuevos Métodos para la Detección de Residuos de Organismos Genéticamente Modificados en Alimentos Basados en el ADN

Yendi Arely Cruz Flores\*, Raúl Rodríguez Herrera, Cristóbal Noé Aguilar, Juan Carlos Contreras Esquivel

*Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas s/n col.  
República. C.P. 25280. Saltillo Coahuila, México tel. +52 (844) 4169213, 4161238, Fax  
+52 (844) 4390511.  
E-mail: yendiarely@hotmail.com*

**Palabras clave:** PCR, PCR múltiple, PCR en tiempo real, resonancia de plasmones superficiales.

### RESUMEN

La detección de residuos de organismos genéticamente modificados (OGM) en alimentos se ha convertido en un tema de gran actualidad por el incremento del número de productos derivados de OGM que han sido lanzados al mercado y el aumento de demandas por parte de los consumidores para que se establezcan regulaciones más estrictas en el etiquetado de estos productos. En este artículo se describen la utilización de nuevas metodologías para la detección de organismos genéticamente modificados, sus ventajas y desventajas.

**Key words:** PCR, multiplex PCR, real time PCR, surface plasmon resonance.

### ABSTRACT

The detection of genetically modified organisms residues (GMO) in foodstuff has become an actual subject, due to the increase in the number of products derived from GMO that have been sent to the market. Considering the growing demands from the consumer's side, stricter regulations have been settle down in the labeling of these products. In this work, advantages and disadvantages for the use of new methodologies for GMO detection, are described.

### INTRODUCCIÓN

La detección de residuos de organismos genéticamente modificados (OGM) en alimentos se ha convertido en un tema de gran actualidad por el incremento del número de productos derivados de OGM que han sido lanzados al mercado y el aumento de demandas por parte de los consumidores para que se establezcan regulaciones más estrictas en el etiquetado de estos productos. La Unión Europea (UE) tiene regulaciones para el etiquetado desde 1997, de productos que contengan más del 0.9% de soya Roundup Ready y maíz Bt-176 en ingredientes específicos (Reg. 49/200/EEC) y para aditivos y saborizantes derivados de cultivos GM (Reg. 50/2000/EEC). En México, el 18 de marzo del 2005 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (DOF 18-03-2005). Basados en lo anterior, existen a nivel comercial para la detección de OGM diferentes técnicas las cuales se agrupan en dos categorías: aquellas que utilizan al ADN y aquellas que utilizan el análisis de proteínas. La reacción en cadena de la polimerasa es la técnica más utilizada para la detección de OGM sin embargo recientemente se ha descrito la utilización de otras técnicas para este propósito. El objetivo del presente trabajo es describir los nuevos métodos para la detección de residuos de organismos genéticamente modificados en alimentos así como señalar sus ventajas y desventajas.

### *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).*

Esta técnica es un método enzimático que permite copiar de forma experimental una zona concreta de un genoma, pudiéndose obtener hasta millones de copias en un tubo de ensayo. En un estudio realizado por Jeng *et al.* (2003), reportaron el análisis de semillas de soya y sus productos para detectar la presencia de genes de soya Roundup Ready. La mayor parte de los productos de soya son generados a partir de un proceso de calentamiento, el cual daña el ADN utilizado para la reacción de PCR. Sin embargo por PCR se logró la amplificación de segmentos de OGM (genes *epsps*, *lectin* y del promotor 35S) en los productos terminados de soya. La fermentación es otra parte importante del proceso de productos a base de soya, en donde el ADN después de un largo periodo de fermentación (más de 180 días) es severamente dañado. Por lo que el gen *epsps* no fue detectado en las muestras analizadas.

En México, un estudio más reciente en donde se analizaron muestras de soya procedente de EUA para identificar la presencia de los genes transgénicos, reveló en las muestras importadas la presencia de secuencias de los genes *epsps*, *cry 1A* y del promotor 35S CaMV. De la soya identificada como transgénica se elaboraron diferentes alimentos (tófu, leche, yogurt, chorizo, harina y germinados) y se tomaron muestras de los puntos críticos de su elaboración de acuerdo a cambios drásticos de temperatura y pH. En este trabajo se identificó la presencia del promotor en el 45% de las muestras y el gen *cry1A* en el 35%. No se logró detectar la presencia del gen *epsps* en los alimentos, aun cuando en la soya a granel se detectó en 9 de 10 muestras (González, 2004).

### *PCR múltiple*

Muchos de los productos de PCR para la detección de OGM involucran reacciones que amplifican una sola secuencia blanco. PCR múltiple es una variación de la técnica convencional en donde dos o más secuencias blancos son

simultáneamente amplificadas en la misma reacción. Este método tiene gran fiabilidad, flexibilidad y una reducción de costos (James *et al.*, 2003).

En el caso de una PCR múltiple, lo que se persigue es amplificar simultáneamente, en un solo tubo distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada segmento y no inhibir la identificación de los demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de iniciadores, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros parámetros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo (Méndez-Álvarez & Pérez-Roth, 2004). Un sistema múltiple ideal es el que es capaz de detectar las secuencias blanco comunes de OGM (secuencias de promotores, terminadores y/o transgenes), que sea capaz de identificar líneas específicas y que pueda simplificar el proceso de detección e identificación de OGM (James *et al.*, 2003).

Estudios recientes han descrito el uso de PCR múltiple como un ensayo rápido y conveniente para la detección de OGMs. Germini *et al.* (2004a), propusieron un método basado en PCR múltiple para la detección simultánea de 4 tipos de maíz transgénico (MON810, Bt11, Bt176 y GA21), uno para soya (Roundup Ready o RR) y dos controles (el gen *zein* para maíz y el gen *lectin* para soya), en semillas, materia prima y alimentos procesados. En este trabajo se reporta la utilización de 7 pares de iniciadores en la misma reacción, y se observó que la longitud del segmento amplificado fue un factor importante para la detección de ADN transgénico en alimentos procesados. La degradación del ADN durante la elaboración del alimento puede dar a veces falsos negativos. Por esta razón se diseñaron iniciadores que amplificaran segmentos con longitudes no mayores a 270 pb, para la detección de OGM hasta en productos altamente procesados.

Otro caso similar es el reportado por James *et al.* (2003), donde se diseñó un protocolo de PCR múltiple para la detección de los 9 cultivos transgénicos más comunes para la soya (Roundup Ready), maíz (event 176, Bt11, Mon810, T14/25) y canola (GT73, HCN92/28, MS8/RF3, Oxy 235). Se utilizaron combinaciones de iniciadores que permitieran la identificación de líneas específicas. En uno de los sistemas de identificación fue utilizada la amplificación simultánea (simultaneous amplification profiling) en vez de una detección del blanco específico, para la identificación de 4 líneas de maíz GM, la amplificación no específica fue utilizada como una herramienta confiable para la identificación de una línea de maíz GM. El iniciador cry1A 4-3' (antisentido) reconoce dos sitios en el ADN patrón extraído de maíz transgénico evento 176, resultando en la amplificación de productos de 152 pb (esperado) y 485 pb (no esperado). El último fragmento fue secuenciado y se confirmó que era el gen *cry1A(b)*. La amplificación simultánea tiene la habilidad de identificar líneas específicas de GM, así como la identificación de nuevas líneas de OGM que contienen transgenes similares.

Con la finalidad de obtener análisis más eficientes se han propuesto metodologías alternativas, un ejemplo Rudi *et al.* (2003) diseñaron un ensayo basado en PCR múltiple para la cuantificación de ADN. Este método está basado en 2 etapas de PCR, en los primeros ciclos se utilizan iniciadores bipartitas los cuales contienen en la terminación 5' una secuencia universal y en la región 3' una secuencia específica para cada uno de los eventos genéticamente modificados que se analizan. Los iniciadores no utilizados son después degradados con una exonucleasa específica para el ADN de cadena sencilla. La segunda etapa de PCR es realizada conteniendo solo iniciadores complementarios a la secuencia universal de la región 5'. La remoción de los iniciadores es esencial para la PCR cuantitativa. Los oligonucleótidos acoplan a fragmentos internos de los productos de PCR y son después marcados para secuencias

específicas. El acoplamiento de los oligonucleótidos marcados a sus secuencias complementarias en un arreglo de ADN, permite la detección múltiple. Con esta metodología se obtuvo información cuantitativa en un rango de 0.1-2% para los diferentes GM analizados. En este artículo se analizaron 17 diferentes muestras de alimentos y semillas utilizando un sistema de 20-plex para la detección simultánea de siete líneas diferentes de maíz GM (Bt176, Bt11, Mon810, T25, GA21, CBH351 y DBT418).

#### *PCR en Tiempo Real (Rti-PCR)*

De acuerdo con las regulaciones europeas, la cuantificación es esencial para el etiquetado de OGM y para cumplir con estas regulaciones hay muchos programas de investigación para el desarrollo de métodos confiables, específicos, estandarizados y cuantitativos para la detección de OGM en alimentos y semillas (Hernández *et al.*, 2004). El uso de PCR en tiempo real es un sistema práctico y rápido como método cuantitativo para la detección de OGM en muestras de alimentos procesados (Ding *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2004). Esta técnica de PCR ha hecho posible cuantificar la cantidad inicial de ácidos nucleicos durante la reacción de PCR sin la necesidad de análisis posteriores (Mason *et al.*, 2002). Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Costa, 2004).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green

I. Las sondas específicas marcadas con fluorocromos, son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET (Costa, 2004). Utilizando este método un gen blanco que puede ser cuantificado por la preparación de una curva estándar de cantidades conocidas del gen y por la extrapolación de la línea de regresión. Este sistema requiere iniciadores para el transgen y para el gen de referencia específico (Ding *et al.*, 2004).

Zhang *et al.* (2003), diseñaron un nuevo método de PCR en tiempo real utilizando una sonda adherida a un templado universal. En el diseño, la secuencia del templado universal, es de aproximadamente 20 pb en tamaño y puede complementarse a la sonda para este templado, después el templado es adherido a la región 5' de un iniciador común que es específico a la secuencia que se desea amplificar. La sonda para el templado universal es marcada con un reportero fluorescente en su terminación 5' y con un *quencher* en su extremo 3'. Durante la fase de acoplamiento la sonda universal se une al extremo 5' del templado universal-iniciador de PCR y la terminación 3' de esta se une a la secuencia que será extendida. Debido a la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa la sonda universal acoplada es hidrolizada propiciando la separación del reportero y del quencher y la generación de una señal fluorescente. En este caso el mismo grupo de secuencias universales y de sondas universales puede ser usado para diferentes iniciadores.

Debido a que la soya y el maíz son los cultivos transgénicos más difundidos a nivel mundial se han diseñado ensayos específicos para la detección y cuantificación de residuos de estos cultivos en alimentos. En el 2004 Rott *et al.*, detectaron la presencia de soya RR y determinaron los tipos de

alimentos en los cuales es posible encontrar ADN de soya. En un segundo ensayo cuantificaron la cantidad de soya RR presente en las muestras que dieron positiva en el primer ensayo. En los ensayos cuantitativos se observaron dos grupos: los alimentos con trazas de soya RR ( $\leq 0.4\%$ ) lo que sugiere una contaminación de soya con soya RR y los alimentos con altos niveles de soya RR.

Para el caso del maíz Hernández *et al.* (2004), desarrollaron y compararon 4 sistemas de PCR en tiempo real específicos para la cuantificación de maíz transgénico, con 4 diferentes genes blancos (*adh1*, *hmga*, *ivr1* y *zein*). Los 4 sistemas fueron muy específicos, mostrando una cuantificación muy similar, altamente sensible y exhibiendo los límites de cuantificación por debajo de las 100 copias de ADN. Por lo tanto los 4 métodos son confiables para ser usados como controles de referencia para el análisis de OGMs.

#### *Utilización de Gel de Electroforesis Capilar con Fluorescencia de Láser inducido*

Con el incremento de los OGMs que han sido desarrollados para aplicaciones en alimentos, la habilidad de detectar diferentes secuencias transgénicas en una sola reacción se ha convertido en una característica importante en cualquier método de detección (García-Cañas *et al.*, 2002b). Sin embargo, hay una demanda por nuevos métodos analíticos los cuales contribuyan a dar información nueva y confiable para la caracterización de los alimentos transgénicos (García-Cañas *et al.*, 2002a). Muchos de los métodos analíticos propuestos para determinar el contenido de OGM en alimentos están basados en la PCR debido a la sensibilidad, especificidad y aplicabilidad en el análisis de matrices complejas de alimentos. El procedimiento habitual consiste en la separación de los productos de PCR por geles de electroforesis, teñidas con bromuro de etidio, grabando la imagen utilizando un digitalizador de imagen, y la cuantificación de los fragmentos de ADN con un software especializado. Sin embargo

estos procedimientos son poco reproducibles y precisos, requieren grandes cantidades de muestra y mucho tiempo. En resumen la resolución limitada de los geles de electroforesis imponen restricciones en el diseño de estándares internos (García-Cañas *et al.*, 2004a).

El uso en conjunto de PCR y geles de electroforesis capilar (CGE) parece ser una buena alternativa para la detección de organismos transgénicos en alimentos, basados en el análisis de ADN. En combinación con PCR competitiva, el análisis CGE permite la detección precisa de los diversos transgenes amplificados, como una alternativa a PCR en tiempo real. Sin embargo la detección por UV en CGE tiene poca sensibilidad y generalmente no puede ser aplicado en muestras con concentraciones por debajo de  $10^{-6}$  M. El uso de fluorescencia por láser inducido (LIF) en CGE incrementa dramáticamente el límite de detección en comparación con el obtenido con UV (García-Cañas *et al.*, 2002b). Esta técnica involucra un alto nivel de automatización, utiliza mínimas cantidades de muestras y reactivos, es capaz de producir separaciones de productos de PCR con gran eficiencia, y se ha probado que es una buena alternativa para obtener resultados precisos y sensibles en la cuantificación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR (García-Cañas *et al.*, 2004a).

Utilizando geles de electroforesis capilar García-Cañas *et al.* (2002a) detectaron la presencia de maíz transgénico en harina. El método está basado en la extracción y amplificación por PCR de fragmentos específicos de maíz transgénico y el análisis posterior por geles de electroforesis capilar con detección de UV y fluorescencia de láser inducido. Un resultado más sensible fue obtenido con el detector de láser inducido, por ejemplo en una muestra de harina de maíz se mostró una contaminación que no había sido detectada por UV, lo cual hubiera generado un falso positivo.

Para reducir costos y obtener análisis más eficientes se han combinado metodologías, García-

Cañas *et al.* (2004b), diseñaron un método para la detección simultánea de 5 maíces transgénicos utilizando PCR múltiple, seguido de electroforesis capilar por fluorescencia de láser inducido. En este método se utilizó un protocolo de PCR hexaplex para la amplificación de 5 variedades de maíz transgénico (Bt11, T25, MON810, GA21, y Bt176), y se demostró que el uso de geles de electroforesis por fluorescencia de láser inducido es muy útil e informativo para la optimización de parámetros de PCR múltiple como son: el tiempo de extensión, la concentración del buffer de PCR y de los iniciadores. Este método desarrollado es muy sensible y además resuelve los problemas de falsos positivos.

### *Microarreglos*

La tecnología de microarreglos puede incrementar la facilidad y velocidad del análisis de los productos de PCR. Microarreglos de ADN es un sistema analítico que permite la detección simultánea de muchas secuencias de ácidos nucleicos en una muestra. Cada secuencia de ADN es representada por un enlace covalente de una sonda oligonucleótida sobre la superficie modificada de un pedazo de vidrio. Las sondas en el arreglo son hibridadas con el marcador fluorescente para productos de PCR. Un análisis de escáner revela la presencia del material marcado conteniendo las secuencias complementarias de aquellas marcadas en el microarreglo (Germi *et al.* 2004b).

### *Ácidos Nucleicos Peptídicos (PNAs)*

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) son análogos de los oligonucleicos en donde el azúcar-fosfato ha sido reemplazado por la cadena pseudopéptica del monómero N-aminoetilglicina (Germi *et al.*, 2004b). A diferencia de los ácidos nucleicos, los PNAs no contienen pentosas ni grupos fosfato. La principal ventaja de estas moléculas biomiméticas frente a sus análogos naturales es su gran afinidad para establecer enlaces con cadenas de ADN. La falta de repulsión

electrostática entre ellas hace que dichos enlaces sean más fuertes que los existentes entre dos hebras de ADN (González *et al.*, 2005).

Germini *et al.* (2004b), reportaron la combinación de la tecnología de microarreglos con PNAs para la detección de soya genéticamente modificada. Diferentes PNAs fueron diseñados, sintetizados y unidos covalentemente a las superficies funcionales para construir un microarreglo y poder identificar el gen constitutivo lectin y la región del gen correspondiente a Roundup Ready de la soya genéticamente modificada. El efecto de la longitud del PNA en la intensidad de la señal y la especificidad fue evaluado así como las condiciones de detección de los productos de PCR tanto de cadenas simples como dobles. Los mejores resultados se obtuvieron con los productos de PCR de cadena simple y con PNAs largos. Las ventajas de este método encima de otras tecnologías son: los PNAs son más eficientes y forman híbridos más estables que los oligonucleótidos, los PNAs son una secuencia altamente específica y los microarreglos permiten el análisis molecular simultáneo de muchas secuencias.

#### *Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)*

Este método está basado en biosensores capaces de desempeñar un análisis de interacción bioespecífica (BIA biospecific interaction analysis) para el monitoreo de una variedad de reacciones moleculares en tiempo real. Es una técnica óptica que detecta y cuantifica cambios en el índice de refracción en la proximidad de una superficie del chip sensor en el cual los ligandos son inmovilizados, permitiendo la detección de biomoléculas (analitos) interaccionando con el ligando. Si el ligando es una cadena simple de ADN marcado con biotina, la tecnología SPR puede monitorear fácilmente el acoplamiento ADN-ADN en tiempo real (Feriotto *et al.*, 2003).

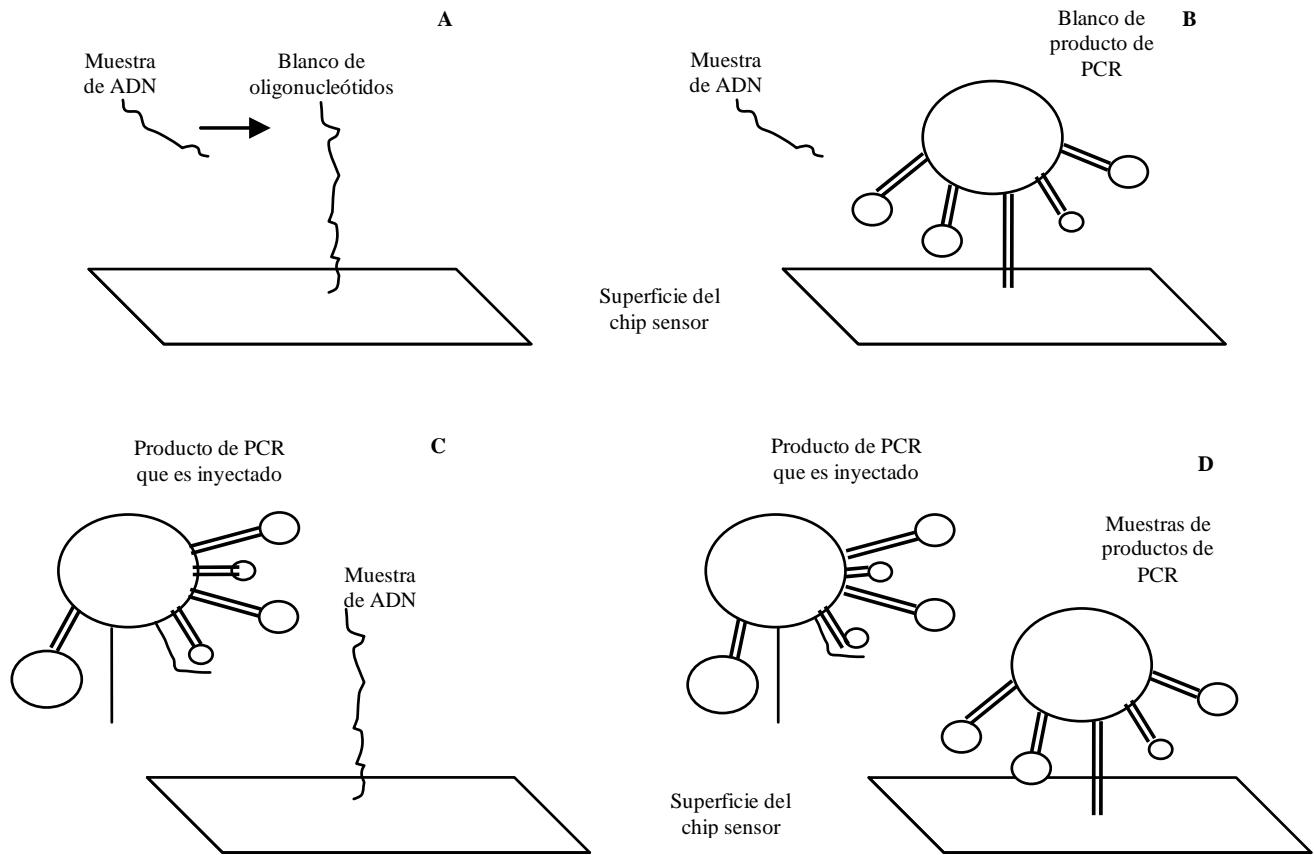
La resonancia de plasmones superficiales es un fenómeno óptico que ocurre cuando una luz polarizada se dirige desde una capa de mayor

índice de refracción (un prisma) hacia una de menor índice de refracción, que en este caso es una capa metálica, de oro o de plata, que se sitúa entre el prisma y la muestra. La luz que incide en la interfase entre el metal y el prisma provoca la excitación de un plasmon superficial para un determinado ángulo de incidencia de dicha luz, el cual depende fuertemente del índice de refracción del medio colindante a la lámina metálica, por lo que las variaciones que se produzcan en el mismo van a ser detectadas como cambios del ángulo que será proporcional a la concentración. Puede utilizarse también un marcaje con moléculas fluorescentes. Esto presenta como ventaja una mejora en la sensibilidad relativa por la reflexión total interna de fluorescencia. La instrumentación que requiere este tipo de análisis es un sensor, un detector de SPR, software para el control y tratamiento de datos y un sistema para introducir los reactivos y analitos en la superficie del sensor (González *et al.*, 2005).

El análisis de interacción bioespecífica empleando resonancia de plasmones superficiales y tecnologías de biosensor es una propuesta fácil, rápida y automática para la detección de OGMs. Feriotto *et al.* (2002), propusieron una metodología que consiste en la inmovilización del blanco de oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla en el chip sensor y la inyección de la muestra de ADN específico diferente en longitud (Fig. 1A). Este formato es de gran importancia para el estudio de relaciones entre las longitudes de sondas, la eficiencia de la hibridación del ADN blanco y la estabilidad de los híbridos moleculares generados. Un segundo, tercero y cuarto formato son relevantes para propósitos de diagnóstico y están basados en PCR mediante la amplificación de secuencias de los genes que quieren ser identificados. En la Fig. 1B, la PCR se lleva a cabo utilizando un iniciador marcado con biotina inmovilizado en un chip sensor y es analizado por la inyección de un oligonucleótido compatible. En la Fig. 1C las sondas son inmovilizados en el chip sensor y el producto de PCR asimétrico que será analizado se inyecta. En la

Fig. 1D las muestras generadas por PCR son inmovilizadas en el chip sensor y los productos asimétricos que serán analizados se inyectan. En el uso de esta tecnología, tiene mucha importancia el hecho de que no se necesite marcadores

radioactivos, el procedimiento es llevado a cabo en tiempo real, y pequeñas cantidades del ligando y analito son requeridas para obtener resultados.



**Fig. 1.** Estrategias experimentales y formatos para la detección de OGMs utilizando SPR basado en BIA y chip sensores que transportan oligonucleótidos o productos de PCR de lectin o Roundup Ready.

Feriotto *et al.* (2003), diseñaron y realizaron pruebas de un protocolo de SPR basado en un análisis de interacción bioespecífica (BIA) para determinación cuantitativa de OGMs. El protocolo está basado en la inmovilización de los productos de PCR múltiples en un simple chip sensor de flujo celular cubierto de estreptovidina y la inyección de sondas específicas. Los productos zeina marcado con biotina y Bt-176 fueron inmovilizados en el chip sensor SA tomando ventaja de la interacción estreptovidina-biotina. Este protocolo está basado en la inmovilización del producto de PCR múltiple en un chip sensor de flujo celular simple utilizando iniciadores marcados con biotina y la inyección consecutiva de una sonda de nucleótidos compatibles. Para producir la doble cadena de las secuencias del gen blanco, se tiene que llevar a cabo PCR múltiple utilizando ADN genómico patrón con un exceso de iniciadores Bt-R y ZM-R con su respectivo biot-Bt-F y biot-ZM-F marcados con biotina. Esto fue hecho para minimizar la presencia del marcaje con biotina, de los iniciadores no incorporados en la mezcla de PCR. Los productos finales de PCR múltiple zein y Bt-176 fueron purificados con Microcon-30. El análisis en gel de agarosa y la secuenciación directa de los productos de PCR confirmaron la especificidad de la reacción de PCR. Los resultados se compararon con Southern blot y PCR cuantitativo usando ABI Prism 7700.

### CONCLUSIONES

El auge que ha creado el desarrollo de nuevas metodologías para la detección de organismos genéticamente modificados se debe a las nuevas regulaciones que existen a nivel mundial para la liberación de alimentos transgénicos. Por lo tanto los laboratorios necesitan desarrollar metodologías de detección más eficaces, las cuales consuman menos tiempo y dinero.

### REFERENCIAS

Costa J (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 22: 299-305.

- Ding J, Jia J, Yang L, Wen H, Zhang C, Liu W & Zhang D (2004) Validation of a rice specific gene, *sucrose phosphate synthase*, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection for transgenes. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3372-3377.
- Feriotto G, Borgatti M, Mischiati C, Bianchi N & Gambari R (2002) Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified roundup ready soybean gene sequences. *J. Agric. Food Chem.* 50: 955-962.
- Feriotto G, Gardenghi S, Bianchi N & Gambari R (2003) Quantitation of Bt-176 maize genomic sequences by surface plasmon resonance-based biospecific interaction analysis of multiplex polymerase chain reaction (PCR). *J. Agric. Food Chem.* 51: 4640-4646.
- García-Cañas V, González R & Cifuentes A (2002a) Detection of genetically modified maize by polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis with UV detection and laser induced fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1016-1021.
- García-Cañas V, González R & Cifuentes A (2002b) Ultrasensitive detection of genetically modified maize DNA by capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence using different fluorescent intercalating dyes. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4497-4502.
- García-Cañas V, Cifuentes A & González R (2004a) Quantitation of transgenic Bt event-176 maize using double quantitative competitive polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis laser-induced fluorescent. *Anal. Chem.* 76: 2306-2313.
- García-Cañas V, González R & Cifuentes A (2004b) Sensitive and simultaneous analysis of five transgenic maizes using multiplex polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Electrophoresis*, 25: 2219-2226.
- Germini A, Zanetti A, Salati C, Rossi S, Forre C, Schmid S & Marchelli R (2004a) Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3275-3280.



- Germini A, Mezzelani A, Lesignoli F, Corradini R, Marchelli R, Bordoni R, Consolandi C & Bellis G (2004b) Detection of genetically modified soybean using peptide nucleic acids (PNAs) and microarray technology. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4535-4540.
- González (2004) Detección de genes y proteínas transgénicas en alimentos procesados de soya. Tesis de grado de licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila México.
- González V, García E, Ruiz O & Gago L (2005) Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid, España.  
[www.madrimasd.org/informacionIDI/biblioteca/publicacion/doc/VT/1\\_vtbiosensores.pdf](http://www.madrimasd.org/informacionIDI/biblioteca/publicacion/doc/VT/1_vtbiosensores.pdf)
- Hernandez M, Duplan M, Berthier G, Vaitilingom M, Hauser W, Freyer R, Pla M & Bertheau Y (2004) Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4632-4637.
- James D, Schmidt A, Wall E, Green M & Masri A (2003) Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5829-34.
- Jeng S, Shyu Y & Pan T (2003) Detection of the genetically modified soybeans in processed foods. Food and Fertilizer Technology Center. <http://www.agnet.org/library/abstract/tb161.html>.
- Mason G, Provero P, Veira A M & Accotto G P (2002) Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 2: 1-10.
- Méndez-Álvarez S & Pérez-Roth E (2004) La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 22: 183-92.
- Rott M, Laerence T, Wall E & Green M (2004) Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-Time polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5223-5232.
- Rudi K, Rud I & Holck A (2003) A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res.* 31 (20): e62.
- Zhang Y, Zhang D, Li W, Chen J, Peng Y & Cao W (2003) A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Res.* 31 (20): e123.