

---

# **Trazas de especies alergénicas en golosinas industriales**

---

**Eva García Vázquez**  
**Ana Marta Muñoz Colmenero**  
**Agustín Roca Martínez**  
**Jose Luis Martínez Fernández**

**Ayudas a la investigación 2012**

## **Equipo de trabajo:**

### **Investigador Principal:**

**Eva García Vázquez**

*Catedrática del Área de Genética de la Universidad de Oviedo.*

*Investigadora principal del Proyecto.*

### **Equipo investigador**

**Ana Marta Muñoz Colmenero**

*Master en Técnicas experimentales aplicadas al manejo y conservación de los animales y doctoranda en el Área de Genética de la Universidad de Oviedo.*

**Agustín Roca Martínez**

*Profesor Titular en el Área de Genética de la Universidad de Oviedo.*

**Jose Luis Martínez Fernández**

*Doctor en la Unidad de Análisis del ADN de la Universidad de Oviedo.*

## **Agradecimientos:**

*Este proyecto ha sido financiado por Fundación Mapfre. También ha contribuido la beca nacional FPU obtenida por Marta Muñoz Colmenero (AP-2010-5211). Queremos agradecer además la colaboración en este proyecto del Técnico de laboratorio de la Unidad de Secuenciación de la Universidad de Oviedo Daniel Serna Fuente.*

# Índice

	Página
Resumen .....	4
Introducción y Antecedentes .....	5
Hipótesis de trabajo y objetivos .....	5
Materiales y Metodología .....	6
Recolección de muestras .....	6
Pruebas de extracción y optimización .....	6
Selección de marcadores moleculares, puesta a punto de la PCR y secuenciación .....	7
Proceso de clonación y su optimización .....	7
Análisis de las secuencias obtenidas .....	8
Optimización de las condiciones de higiene y control de contaminaciones potenciales ..	8
Resultados .....	9
Análisis del etiquetado .....	9
Extracción y calidad del ADN .....	9
Marcadores moleculares seleccionados .....	9
Resultados de PCR y secuenciación .....	9
Especies presentes en golosinas envasadas .....	10
Especies presentes en golosinas vendidas a granel .....	11
Discusión .....	11
Comentarios generales .....	11
Golosinas envasadas .....	13
Golosinas vendidas a granel .....	14
Implicaciones directas para la salud y la ética o preferencias de los consumidores .....	14
Conclusiones .....	15
Bibliografía .....	16
Posibilidades de continuación del proyecto y aplicación clínica .....	28
Publicaciones y comunicaciones del proyecto .....	29

## RESUMEN

Las golosinas son dulces consumidos en todas las partes del mundo y a todas las edades. A pesar de estar muy presentes en la vida cotidiana, no se sabe mucho sobre su composición, siendo la ausencia de información un impedimento para la elección libre del consumidor y un problema de salud para las personas alérgicas o intolerantes a determinados ingredientes. En este trabajo se ha planteado como objetivo determinar la composición real de las golosinas industriales, tanto envasadas como vendidas a granel, y valorar la exactitud de sus etiquetas y el cumplimiento de la legislación vigente. Para ello se realizó un muestreo en cinco Comunidades Autónomas españolas y algunas ciudades de Estados Unidos. Se analizaron 50 muestras de diferentes procedencias utilizando marcadores moleculares de ADN para determinar las especies animales y vegetales presentes en las golosinas. Se encontraron trazas de un gran número de especies, algunas de las cuales están consideradas potenciales alérgenos, como la gelatina de pescado, trigo y maíz. Muchas especies no eran mencionadas en las etiquetas ni en los puntos de venta, lo que representa un riesgo para los consumidores alérgicos o intolerantes a dichos ingredientes. Por otro lado, se encontraron irregularidades en productos etiquetados como aptos para vegetarianos que contenían especies animales. Esto implica que los consumidores no pueden confiar en la elección de productos adecuada a sus determinados principios éticos, morales o religiosos. Este trabajo apunta a que la normativa de etiquetado de las golosinas necesita ser revisada para garantizar la libre y saludable elección de los consumidores según sus preferencias o condiciones de salud. Un adecuado etiquetado supondría una gran ventaja para los consumidores de golosinas, garantizándoles la adquisición de productos adecuados a sus necesidades.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las golosinas son consumidas a lo largo de todo el mundo, en diferentes culturas y países [1]. Estos dulces no son un invento reciente: los antiguos árabes, los chinos y los egipcios tomaban frutas y nueces confitadas en miel, y los aztecas hicieron una bebida de chocolate con la semilla del cacao [2]. El consumo de golosinas se da en todas las edades, aunque sigue siendo más frecuente en los niños [3] [4].

El término “candy”, en castellano “golosina”, viene de la palabra árabe “qandi”, o azúcar procesado [5]. Las golosinas son una fuente de azúcares añadidos [6], y por ello se les han atribuido diversos efectos negativos, como contribuir al sobrepeso [7], el aumento de la caries cuando la higiene oral es además deficiente [8], y ser

posibles factores de riesgo cardiovascular [9] [10] y cáncer [11] [12]; siempre que el consumo de golosinas sea excesivo y la dieta no equilibrada. En los últimos años, en cambio, se les han atribuido efectos beneficiosos. La ingesta controlada de dulces y chicle podría contribuir a calmar la ansiedad y por lo tanto tener un valor terapéutico en el tratamiento de la obesidad [13].

Otros efectos menos conocidos de estos productos tienen que ver con su composición, que incluye numerosos aditivos y conservantes [14]. La composición real de dulces y golosinas comerciales es compleja y en muchos casos no se conoce del todo. Las normativas vigentes en España establecen como obligatoria la descripción de la información nutricional para la mayoría de los productos transformados (1169/2011), pero en el caso de las golosinas vendidas a granel la normativa que las considera (348/2011) es algo más permisiva, y no especifica que deba ofrecerse de manera obligatoria información como nombre del fabricante, lista de ingredientes o lista de posibles alérgenos contenidos. En cambio, para las golosinas envasadas sí que es obligatorio que aparezca una lista de posibles alérgenos contenidos en el producto, siendo ésta fácilmente identificable y separada de la lista de ingredientes. En ausencia de una lista de ingredientes como tal, se utilizará la palabra “contiene” seguida de la sustancia/as correspondientes.

Precisamente debido a la permisividad de esta normativa, conocer la composición real de las golosinas comerciales puede ser de vital importancia para aquellas personas que padezcan alguna intolerancia o alergia alimentaria. Estas personas necesitan saber la composición completa y detallada de un producto para poder estar seguros de evitar aquellas sustancias que puedan poner en riesgo su salud. Se puede observar la preocupación de diferentes consumidores sobre esta cuestión en diversas páginas web (<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/normativa-legal/2011/09/29/203430.php>; <http://www.consumoteca.com/alimentacion/chucherias/normativa-que-regula-los-caramelos-chicles-y-chucherias>; <http://www.vivesinlactosa.org/2011/03/los-ingredientes-de-las-golosinas/>; <http://atencionalconsumidor.com/?p=212>). Se han encontrado casos en la bibliografía de reacciones alérgicas a especies presentes en golosinas, como el azafrán [15] [16]; frutos secos como el cacahuete [17], presente en trazas en muchos de estos productos; el colorante “carmina”, procedente de la cochinilla (*Coccus cacti*) y usado en numerosos dulces [16]; o trazas de pescado, generalmente en forma de gelatina, la cual puede contener parvalbúminas que son las principales proteínas alérgicas del pescado para los humanos [18]. A la vista de estos antecedentes parece importante estudiar la composición real de las golosinas en detalle y cotejar si el contenido encontrado se corresponde con las etiquetas de los productos envasados. En el caso de las golosinas a granel, los resultados podrían indicar si la normativa existente es suficiente o convendría modificarla.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Para determinar la composición real de las golosinas industriales y estudiar la fiabilidad y exactitud de sus etiquetas, en este proyecto se propuso la realización de un estudio sobre diferentes tipos de golosinas y su análisis mediante el uso de técnicas moleculares basadas en el ADN, ya que en otras ocasiones han sido descritas sus ventajas en el uso de detección de trazas de alérgenos en alimentación [19]. El objetivo de este estudio fue obtener información concreta sobre la composición real de las golosinas y de la fiabilidad de sus etiquetas, haciendo especial hincapié en la detección de especies que son consideradas potenciales alérgenos y por lo tanto su presencia en un producto alimentario debe ser indicada. A partir de los resultados se hará una valoración del riesgo que supone el consumo de golosinas comerciales para las personas alérgicas o intolerantes a diferentes

especies, así como la utilidad real del actual etiquetado de estos dulces y la normativa existente el respecto.

## MATERIALES Y METODOLOGÍA

En este proyecto se realizaron diferentes tareas, que se reflejan en el cronograma de la figura 1. Cada una se explica en detalle a continuación.

### RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

El muestreo fue llevado a cabo principalmente en España, en cinco Comunidades Autónomas: Andalucía (Córdoba), Castilla la Mancha (Valdepeñas), Madrid, Castilla León (Tordesillas) y Asturias (Oviedo). Se recogió un total de 101 muestras, de las que se analizaron 49 para ADN (tabla 1). También se obtuvieron 12 muestras

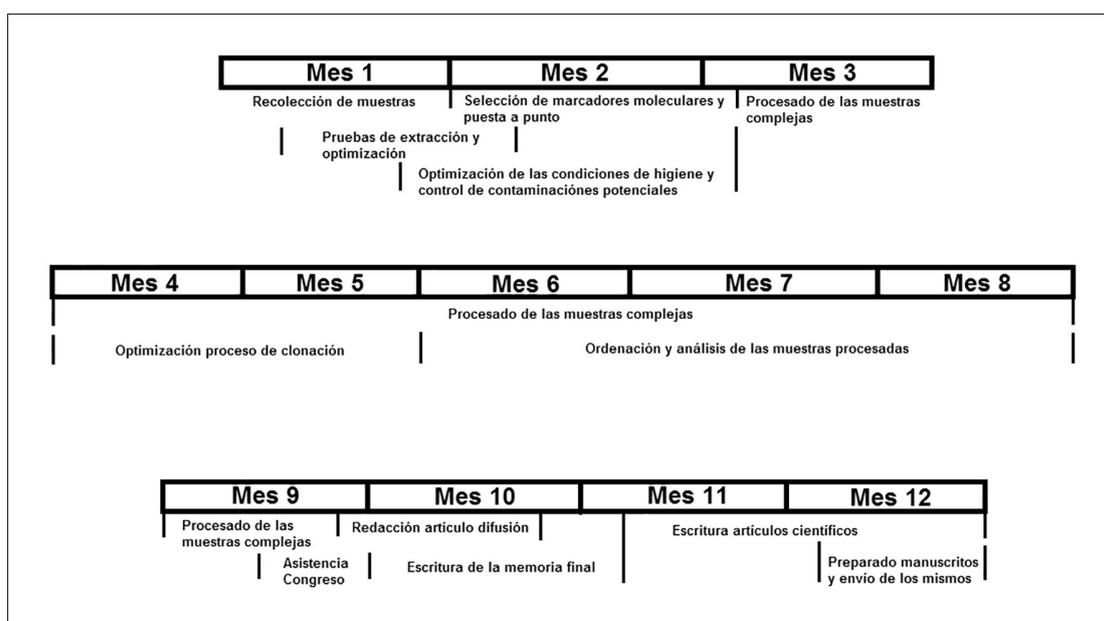


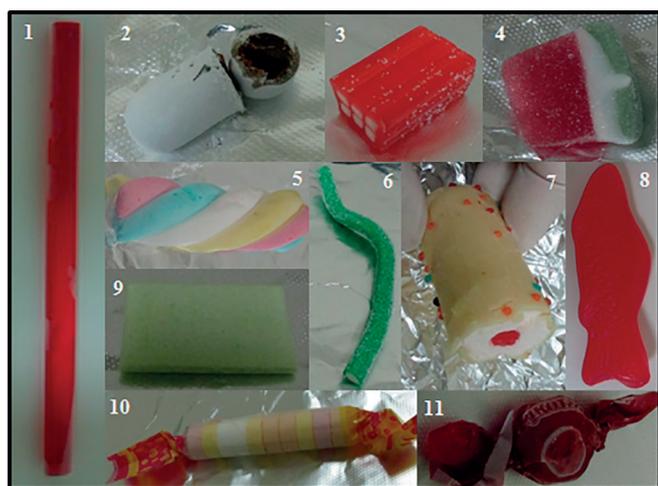
Figura 1. Cronograma de las tareas realizadas a lo largo del proyecto y su duración en el tiempo

Tabla 1. Número de muestras recolectadas y analizadas por Comunidad Autónoma y según el tipo de tienda

Lugar	Punto de venta	Número	Número procesado
Asturias	Supermercado	11	8
	Tienda golosinas granel	9	0
Castilla y León	Tienda golosinas granel	15	9
	Supermercado	6	3
Madrid	Tienda golosinas granel	17	6
	Tienda golosinas empaquetadas	2	3
	Supermercado	2	4
Castilla la Mancha	Tienda golosinas granel	19	9
	Supermercado	2	4
Andalucía	Tienda golosinas a granel	13	3
	Tienda golosinas empaquetadas	7	4
TOTAL		101	49

procedentes de Norteamérica, en concreto de California (3), Puerto Rico (8) y Nueva York (1), de las cuales fue analizada para ADN la muestra de Nueva York. Dentro del muestreo se consideraron golosinas de diferentes tipos (figura 2), tanto envasadas como a granel. El análisis de ADN se llevó a cabo en golosinas de todas las categorías (tabla 2). De las 50 procesadas para ADN, 32 fueron a granel y 18 envasadas.

Otro factor que se tuvo en cuenta en la realización del muestreo fue el tipo de establecimiento de venta: desde grandes cadenas de supermercados presentes a nivel nacional, otros supermercados regionales, grandes tiendas de golosinas a granel, pequeños comercios o quioscos. Para asegurar la trazabilidad del proceso se fotografiaron tanto las golosinas analizadas como el envase, en su caso. Se obtuvieron fotos en detalle de las especificaciones de la etiqueta de las golosinas envasadas, tales como la lista de ingredientes o especiales menciones como lista de potenciales alérgenos o avisos para vegetarianos, etc.



**Figura 2.** Imágenes de 11 golosinas procesadas diferentes: (1) = 9; (2) = 33; (3) = 40; (4) = 15; (5) = 19; (6) = 49; (7) = 29; (8) = 3; (9) = 50; (10) = 44; (11) = 47

**Tabla 2.** Número de muestras recolectadas y analizadas por tipo de golosina

Tipos	Número	Número procesado
Gelatina para cocinar	3	3
Postres precocinados	6	3
Gominolas blandas	44	17
Gominolas duras	20	13
Nubes	10	7
Gelatinas	4	1
Chicles	5	2
Complejas con chocolate	9	4
TOTAL	101	50

## PRUEBAS DE EXTRACCIÓN Y OPTIMIZACIÓN

Para la extracción de ADN se probaron tres kits diferentes: el kit de OMEGA Bio-tek Tissue DNA Kit, el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit de QUIAGEN y el kit DNeasy Mericon Food Kit de QUIAGEN. Además de probar la extracción en golosinas, se utilizaron tres controles positivos, correspondiendo a tejido fresco de manzana (*Malus domestica*), carne de cerdo (*Sus scrofa*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), para asegurar que la ausencia de ADN en las muestras de golosinas no se debía a errores en el proceso de extracción y PCR. Las muestras con alto grado de procesamiento como son las golosinas comerciales tiene dos problemas para trabajar con ADN: en primer lugar la baja cantidad de ADN que se puede recuperar del producto final, generalmente muy degradado por los tratamientos durante la cadena de producción, y en segundo lugar la presencia de otras sustancias como conservantes y colorantes que pueden actuar como inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), impidiendo la amplificación del ADN de interés. Para recuperar en las columnas de extracción una cantidad suficiente de ADN fue necesario concentrarlo. Para ello, tras varias pruebas se decidió empezar la primera fase del proceso (antes del paso por columnas de unión del ADN) con 4 tubos de 200 mg por muestra (en vez de solo uno). Cada uno de los cuatro tubos se pasó por la misma columna concentrando por cuadruplicado el ADN de cada muestra. Estos pasos se adaptaron para los tres kits utilizados.

## SELECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES, PUESTA A PUNTO DE LA PCR Y SECUENCIACIÓN

Para la amplificación del ADN se probaron dos marcadores moleculares diferentes para plantas y tres para animales (tabla 3). Se escogieron parejas de cebadores que amplifican fragmentos pequeños de ADN. Esto es importante puesto que se asumió que en productos con alto grado de procesamiento el ADN frecuentemente aparecerá fragmentado y degradado, siendo imposible amplificar fragmentos muy grandes. Para cada una de las parejas de cebadores fueron utilizadas las condiciones de PCR aconsejadas por los autores (tabla 3). El Kit utilizado fue el kit PCR core Kit Plus de Roche, específico para evitar posibles contaminaciones de la reacción de PCR porque contiene el enzima uracil glicosilasa y dideoxinucleótidos con uracilo en vez de timina. Para activar dicha enzima es necesario añadir a la PCR un ciclo previo de 20°C durante 5 min, seguido de otro ciclo a 95°C durante 2 min para inactivarla. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, el cual se une al ADN y es revelado mediante luz ultravioleta.

Como controles positivos se volvieron a utilizar las extracciones de los controles positivos de tejido fresco utilizadas en la puesta a punto de la extracción (manzana, cerdo y trucha arcoíris). Estos controles sirvieron para

**Tabla 3.** Parejas de cebadores probados para la detección por PCR de las especies animales y vegetales contenidas en las golosinas

Organismos destino	Nombre	Secuencia	Amplicon	Especificidad	Referencia
Plantas	CP 03-5'	5' - CGGACGAGAATAAAGATAGAGT - 3'	123 pb	ADN del cloroplasto	T. Yano et al., 2007
	CP 03-3'	5' - TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA - 3'			
Plantas	Plant 159 F	5' - CTTGATTTTACCAAAGATGATGA - 3'	159 pb	Gen rbcL (Rubisco; cloroplasto)	J. Han et al., 2012
	Plant 159 R	5' - TTCTTCGCATGTACCCGCAG - 3'			
Animales	FINS-F	5' - CMGYCTATATACCGCCGTCG - 3'	82 pb	Gen 12S ARN ribosomal (mitocondria)	A. Ardura et al., 2010
	FINS-R	5' - AATGTAGCCATTCTTYC - 3'			
Animales	16SHF	5' - ATAACACGAGAAGACCCT - 3'	80-120 pb	Gen 16S ARN ribosomal (mitocondria)	J. L. Horreo et al., 2013
	16SHR	5' - CCCRCGGTCGCCCAAC - 3'			
Animales	Uni-minibarF1	5' - TCCACTAATCACAARGATATTGGTAC - 3'	130 pb	Gen de la citocromo oxidasa I (COI; mitocondria)	I. Meusnier et al., 2008
	Uni-minibarR1	5' - GAAATCATAATGAAGGCATGAGC - 3'			

confirmar la especificidad de los diferentes cebadores para la identificación de especie.

Para la purificación del ADN obtenido en las ampliificaciones se utilizaron dos técnicas diferentes. Cuando no fue necesario clonar se utilizó Illustra™ ExoStar™ 1-Step de GE Healthcare Life Sciences, para purificar directamente desde el producto de PCR. Este producto consiste en dos enzimas, fosfatasa alcalina y exonucleasa 1, que eliminan los cebadores y nucleótidos no incorporados en la reacción. Cuando fue necesario clonar se utilizó el kit de purificación de bandas de ADN desde agarosa Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

La secuenciación se realizó con el protocolo ABI Prism BigDye Terminator Cycle en un Secuenciador Automatizado ABI Prism 3130 perteneciente a la Unidad de Secuenciación de la Universidad de Oviedo.

## PROCESO DE CLONACIÓN Y SU OPTIMIZACIÓN

La clonación fue necesaria en las muestras que contenían mezcla de especies (detectada por cromatogramas solapados), para conseguir por separado la secuencia de cada una de ellas. Fue utilizado el kit de Invitrogen Dual Promoter TA Cloning Kit, el cual usa para la ligación el vector pCR II que incluye el gen de la beta-galactosidasa. Este gen permite diferenciar aquellas colonias bacterianas que llevan el inserto (blancas) de las que no lo llevan (colonias azules) aportando al medio el sustrato de la enzima (X-gal) y el promotor (IPTG). Para la fase de transformación se utilizaron las células competentes del kit, TOP10F' las cuales crecieron primero en medio líquido durante una hora, después se centrifugaron y se resuspendieron en 200 µl. Posteriormente se siembran 100 µl en placa con medio LB con agar y ampicilina, este último para diferenciar las colonias con vector de las que no lo han incorporado, las cuales no serán capaces de crecer por no tener resistencia al antibiótico incorporado.

Para la "PCR colony" se utilizaron los cebadores T7 y SP6 con los que se amplifica el fragmento donde se

insertan las secuencias (185 pares de bases si no hay fragmento insertado, más los nucleótidos correspondientes a la secuencia insertada, que varían según sea el fragmento animal o vegetal [tabla 3]). Fue utilizada la Taq DNA Polimerasa de Biotools (5U/ µl) 1.5 unidades, solución (1x) de la polimerasa, Mg<sup>2+</sup> a 1.5 mM, 10 picomoles de cada cebador, dNTPs a 2.5 mM y agua bidestilada hasta un volumen de 20 µl de reacción. Las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72°C 30 segundos. Finalmente un ciclo de 10 min a 72°C.

La purificación y secuenciación de las secuencias obtenidas mediante esta reacción se realizó de la misma forma que se explica arriba.

## ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Las secuencias obtenidas fueron revisadas con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor [20], cortando el trozo de vector amplificado junto a la secuencia de interés, en el caso de las secuencias provenientes de la "PCR colony". Posteriormente se lanzaron contra la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando su herramienta BLAST de nucleótidos, determinando así la especie a la que corresponden, obteniendo resultados de mínimo un 98% de identidad.

## OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIGIENE Y CONTROL DE CONTAMINACIONES POTENCIALES

Al trabajar con muestras muy procesadas, con una cantidad de ADN baja y posiblemente degradado, la contaminación es más frecuente ya que cualquier ADN fresco que entre en contacto con la muestra se amplificará con mayor facilidad por ser de mejor calidad que el de la propia muestra. Además al trabajar con fragmentos cortos es más fácil que se den ampliificaciones inespecíficas. Por ello fue necesario aplicar estrictas condiciones de higiene, asepsia y esterilidad. Para garantizar estas condiciones fueron establecidas dos zonas separadas,

una “pre-PCR” y otra “post-PCR”. Toda la primera fase se realizó en una sala estéril en la que todo fue limpiado con lejía al 10% para destruir el posible ADN circulante y los materiales fueron autoclavados. También se almacenaron en la sala todas las muestras, se realizó la extracción de ADN y se preparó la reacción de PCR, esta última dentro de una cabina de flujo laminar aura-mini Bioair Instrument, la cual tiene luz ultravioleta que conectada antes y después de trabajar en ella garantiza la ausencia de ADN contaminante. Además en esta sala se trabajó continuamente con dos pares de guantes de látex, bata, mascarilla y gorro.

Al terminar la reacción de PCR, se pasa a la zona “Post-PCR”, donde se visualizó el producto de PCR, se purificó y se realizó la reacción de secuenciación. La preparación de los geles de agarosa con bromuro de etidio para marcar el ADN también se realizó en una cabina de flujo en esta segunda zona, ya que el bromuro de etidio es un agente mutagénico y cancerígeno.

Durante el proceso de clonación se trabajó en una sala diferente, con su propia cabina de flujo, para manipular las bacterias, *Escherichia coli* competentes, las cuales tras la transformación llevaban en vector un gen de resistencia a antibiótico (ampicilina), evitando así cualquier daño al investigador.

Por último, todos los residuos generados fueron tratados de acuerdo con las normas de residuos peligrosos o contaminantes, depositándose en contenedores especiales, los cuales son recogidos por la empresa Saniastur, cualificada para el tratamiento de este tipo de productos.

## RESULTADOS

### ANÁLISIS DEL ETIQUETADO

Para las golosinas envasadas (n=18) se realizó, en primer lugar, un control de los envases o etiquetas, observando en detalle la lista de ingredientes y las indicaciones al respecto: componentes orgánicos (tabla 4), avisos para alérgicos y menciones especiales para grupos concretos de consumidores como vegetarianos, ovolacto-intolerantes, etc. Solamente se encontraron 6 golosinas con alguna mención a potenciales alérgenos. En el caso de la gelatina, 14 muestras especificaban que contenían gelatina como ingrediente (tabla 4), pero de éstas solamente 3 informaban sobre el origen de esta gelatina: en dos casos procedentes de cerdo y en otro de algas (agar).

**Tabla 4.** Tabla completa de las muestras analizadas y los resultados obtenidos por muestra. Las casillas de amplificación con color gris corresponden a las muestras de las que no se obtuvo amplificación y las de color azul aquellas que amplificaron pero no se obtuvo suficiente cantidad de ADN para secuenciar

Muestra	Lugar	Marca	Tipo	Categoría	Descripción	Ingredientes relevantes en la etiqueta	AMPLIFICACIÓN			
							Animal		Vegetal	
1	Asturias	Vahine	Gelatina para cocinar	Gelatina para cocinar	Origen porcino	Gelatina de origen porcino	Cerdo	Sus scrofa	NO	
2	Asturias	EROSKI	Natillas de vainilla	Postre	En polvo	Almidón de Millo. Apta para vegetarianos	Cerdo, humano	Sus scrofa, Homo sapiens	Cereales	Gramínea (trigo)
3	EEUU	Gold emblem	Peces de gominola	Gominola blanda	Empaquetada	Jarabe de maíz	NO		NO	
4	Asturias	EROSKI	Gelatina de limón	Postre	En polvo	Gelatina	Vaca, cerdo	Bos taurus, Sus scrofa	Judías, cereales, cacao, cebolla	<i>Vicia</i> sp., Gramínea (trigo), <i>Theobroma cacao</i> , <i>Allium cepa</i>
5	Asturias	Vahine	Agar Agar	Gelatina para cocinar	En polvo	Agar	Cerdo	Sus scrofa	Judías, Arbusto de miel (honeybush)	<i>Vicia</i> sp., <i>Cyclopia</i> sp.
6	Andalucía	Vahine	Gelatina neutra	Gelatina para cocinar	En polvo	Gelatina	NO		Judías, cebada, comino, zanahoria	<i>Vicia</i> sp., <i>Oryza</i> sp., <i>Cuminum cyminum</i> / <i>Daucus carota</i>
7	Andalucía	a granel	Nube	Nube		Sin etiqueta	Vaca, cerdo, pollo, humano	Bos taurus, Sus scrofa, Gallus gallus, Homo sapiens	Judías, nuez, avellana, malváceas	<i>Vicia</i> sp., <i>Oceanopapaver neocaledonicum</i> (familia Malvaceae), frutos secos ( <i>Juglans nigra</i> , <i>Corylus avellana</i> )

Muestra	Lugar	Marca	Tipo	Categoría	Descripción	Ingredientes relevantes en la etiqueta	AMPLIFICACIÓN			
							Animal		Vegetal	
8	Andalucía		Nube de Bob Esponja	Nube	Empaquetada	Gelatina, almidón de maíz y goma arábica	Cerdo, vaca, pollo, merluza, humano	Sus scrofa, Bos taurus, Homo sapiens, Gallus gallus, Merluccius paradoxus	Maíz	Zea mays
9	Andalucía	a granel	Tubo de gelatina	Gelatina		Sin etiqueta	Vaca, merluza, pollo, cerdo, humano	Bos taurus, Merluccius productus/hubbsi/merluccius, Gallus gallus	NO	
10	Andalucía	a granel	Palote de fresa	Gominola dura		Sin etiqueta	Humano, cerdo, merluza	Homo sapiens, Sus scrofa, Merluccius productus/hubbsi/merluccius	NO	
11	Andalucía	a granel	Gummy	Gominola blanda		Sin etiqueta	Vaca, merluza (varias especies)	Bos taurus, Merluccius paradoxus, Merluccius productus/hubbsi/merluccius	NO	
12	Andalucía	a granel	Dentadura	Gominola blanda		Sin etiqueta	Vaca, pavo, cerdo	Bos taurus, Meleagris gallopavo, Sus scrofa	YES	
13	Andalucía	BUBALOO	Chicle	Chicle	Empaquetado	Lecitina de soja, goma arábica y aceite vegetal	Merluza, cerdo, vaca	Merluccius productus/hubbsi/merluccius, Sus scrofa, Bos taurus	Soja, judías	<i>Glicine max</i> , <i>Vicia sp.</i>
14	Andalucía	HARIBBO favoritos	Fresa	Gominola blanda	Empaquetado	Gelatina, zumo concentrado, concentrado de frutas y plantas, colorantes	Vaca	Bos taurus	YES	
15	Andalucía	DIA	Sandia	Gominola blanda	Empaquetado	Gelatina	Vaca	Bos taurus	Judías, maíz, trigo	<i>Vicia sp.</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Triticum aestivum</i>
16	Andalucía	DIA	Nube	Nube	Empaquetado	Gelatina de cerdo, azúcares de trigo y maíz	Cerdo, Humano	Sus Scrofa, Homo sapiens	YES	
17	Andalucía	HARIBBO soft jelly	Caramelo verde	Gominola blanda	Empaquetado	Zumo concentrado, concentrado de frutas y plantas	Vaca	Bos taurus	Fabaceas, oleáceas, judías	Fabaceae, Oleaceae, <i>Vicia ssp.</i>
18	Castilla-La Mancha	a granel	Palote fresa-plátano	Gominola dura		Sin etiqueta	Humano, vaca, merluza	Homo sapiens, Bos taurus, Merluccius productus/hubbsi/merluccius	Maíz, trigo	<i>Zea mays</i> , <i>Triticum aestivum</i>
19	Castilla-La Mancha	a granel	Nube colores	Nube		Sin etiqueta	Humano, cerdo, vaca, merluza	Homo sapiens, Sus scrofa, Bos taurus, Merluccius productus/hubbsi/merluccius	Maíz, trigo, judías	<i>Zea mays</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Vicia sp.</i>
20	Castilla-La Mancha	a granel	Pie	Gominola blanda		Sin etiqueta	Humano, cerdo, vaca, merluza	Homo sapiens, Sus scrofa, Bos taurus, Merluccius productus/hubbsi/merluccius	Maíz, avellana, oliva, Solanaceas (patata, tomate...)	<i>Zea mays</i> , <i>Colyryl avellana</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Solanaceae</i>
21	Castilla-La Mancha	a granel	Palote fresa-nata azúcar	Gominola dura		Sin etiqueta	Humano, vaca, pavo	Homo sapiens, Bos taurus, Meleagris gallopavo	Trigo, Apiaceos, Maíz, plátano	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Apiaceae</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Musa acuminata</i>

Muestra	Lugar	Marca	Tipo	Categoría	Descripción	Ingredientes relevantes en la etiqueta	AMPLIFICACIÓN			
							Animal		Vegetal	
22	Castilla-La Mancha	a granel	Regaliz negro	Gominola dura		Sin etiqueta	NO		Trigo	<i>Triticum aestivum</i>
23	Castilla-La Mancha	a granel	Guindilla	Gominola blanda		Sin etiqueta	Humano, gallo, vaca	Homo sapiens, gallus gallus, Bos taurus	Judías, maíz, Gramíneas, trigo, rosáceas, cacao, berro	<i>Vicia</i> sp., <i>Zea mays</i> , Poaceae, <i>Triticum aestivum</i> , Rosaceae, <i>Theobroma cacao</i> , <i>Nasturtium officinale</i>
24	Castilla-La Mancha	a granel	Palote colores	Gominola dura		Sin etiqueta	Humano, vaca, pavo, cerdo	Homo sapiens, Bos taurus, Meleagris gallopavo, Sus scrofa	Judías, maíz, gramíneas, cacahuete, Ilex	<i>Vicia</i> sp., <i>Zea mays</i> , Poaceae, <i>Araeochis hypogaea</i> , <i>Ilex</i> sp.
25	Castilla-La Mancha	a granel	Lengua rosa-azul	Gominola blanda		Sin etiqueta	YES		Trigo	<i>Triticum</i> sp.
26	Castilla-La Mancha	a granel	Fresa rellena gelatina	Gominola blanda		Sin etiqueta	Humano	Homo sapiens	Soja, Gramíneas	<i>Glycine max</i> , Poaceae
27	Castilla y León	a granel	Caramelo regaliz negro	Gominola dura		Sin etiqueta	Cerdo	Sus scrofa	YES	
28	Castilla y León	a granel	Caramelo fresa	Gominola dura		Sin etiqueta	YES		NO	
29	Castilla y León	a granel	Gelatina con chocolate amarillo	Compleja con chocolate		Sin etiqueta	Vaca	Bos taurus	YES	
30	Castilla y León	a granel	Gelatina con chocolate	Compleja con chocolate		Sin etiqueta	NO		NO	
31	Castilla y León	a granel	Nube árbol	Nube		Sin etiqueta	Humano, Vaca, pavo	Homo sapiens, Bos taurus, Meleagris gallopavo	Gramíneas	Poaceae
32	Castilla y León	a granel	Gajo limón	Gominola blanda		Sin etiqueta	Humano, Vaca, Varis especies merluza, anchoveta peruana, pavo	Homo sapiens, Bos taurus, Merluccius productus/hubbsi/merluccius, Engraulis ringens, Meleagris gallopavo	Trigo, judías, otras gramíneas	<i>Triticum</i> sp. Or <i>Secale cereale</i> , <i>Vicia</i> sp., Poaceae
33	Castilla y León	a granel	Caramelo regaliz blanco	Gominola dura		Sin etiqueta	NO		Gramíneas, maíz, trigo	Poaceae, <i>Zea mays</i> , <i>Triticum</i> sp. Or <i>Secale cereale</i>
34	Castilla y León	a granel	Nube blanco-rosa rayas	Nube		Sin etiqueta	Humano, varias especies de merluza, cerdo, vaca, pavo	Homo sapiens, Merluccius productus/hubbsi/merluccius, Sus scrofa, Bos taurus, Meleagris gallopavo	Gramíneas, maíz	Poaceae, <i>Zea mays</i>
35	Castilla y León	a granel	Gelatina con chocolate blanco	Compleja con chocolate		Sin etiqueta	Vaca, búfalo, humano	Bos taurus, Bubalus bubalis, Homo sapiens	Soja, Brasicáceas (coliflor, mostaza, etc), maíz, otras gramíneas	<i>Glycine max</i> , <i>Brassica</i> sp., <i>Zea mays</i> , Poaceae
36	Asturias	Trolli (Mercadona)	Ositos	Gominola blanda	Empaquetada	Gelatina, Zumo frutas concentrado, extracto de zanahoria, grosella negra, curcuma	Cerdo, vaca, humano	Sus scrofa, Bos taurus, Homo sapiens	Gramíneas, judías, tabaco	Poaceae, <i>Zea mays</i> , <i>Vicia</i> sp., <i>Nicotiana tabacum</i>
37	Asturias	IKEA Godis	Ositos	Gominola blanda	Empaquetada	Gelatina, polvo de regaliz, aceites vegetales y frutos secos	Cerdo, vaca, humano	Sus scrofa, Bos taurus, Homo sapiens	Gramíneas, trigo, judías	Poaceae, <i>Glycine</i> sp., <i>Triticum</i> sp., <i>Vicia</i> sp.

Muestra	Lugar	Marca	Tipo	Categoría	Descripción	Ingredientes relevantes en la etiqueta	AMPLIFICACIÓN			
							Animal		Vegetal	
38	Asturias	Royal	Gelatina de piña	Postre	Empaquetada	Gelatina	Merluza, cerdo, humano	Merluccius productus/hubbsi/merluccius, Sus scrofa, Homo sapiens	Trigo, arroz	<i>Triticum</i> sp. Or <i>Secale cereale</i> , <i>Oryza sativa</i>
39	Madrid	Granel, HARIBOO Supercor	Llave	Gominola blanda		Sin etiqueta	Cerdo, vaca, humano	Sus scrofa, Bos taurus, Homo sapiens	Trigo, judías, soja, brassicáceas	<i>Triticum</i> sp. Or <i>Secale cereale</i> , <i>Vicia</i> sp., <i>Glycine max</i> , <i>Brassica</i> sp.
40	Madrid	Granel, HARIBOO Supercor	Ladrillo	Gominola blanda		Sin etiqueta	NO		Trigo	<i>Triticum</i> sp. Or <i>Secale cereale</i>
41	Madrid	Granel, HARIBOO Supercor	Caramelo verde	Gominola dura		Sin etiqueta	Cerdo	Sus scrofa	Trigo, maíz, gramíneas, timeláceas	<i>Triticum</i> sp. Or <i>Secale cereale</i> , <i>Zea mays</i> , Poaceae, Thymelaeaceae
42	Madrid	HARIBOO	Fresa	Gominola blanda	Empaquetada	Gelatina, zumo concentrado, concentrado de frutas y plantas, colorantes	Vaca	Bos taurus	Trigo, castaño, maíz, gramíneas	<i>Triticum</i> sp. Or <i>Secale cereale</i> , <i>Castanea sativa</i> , <i>Zea mays</i> , Poaceae
43	Madrid	Granel	Gelatina con chocolate rosa	Compleja con chocolate		Sin etiqueta	Vaca	Bos taurus	Albaricoque o cereza, soja, cyclopia	<i>Prunus armeniaca</i> or <i>P. tormentosa</i> or <i>P. humilis</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Cyclopia</i> sp.
44	Madrid	Granel	Pastillas	Gominola dura		Sin etiqueta	Cerdo, humano	Sus scrofa, Homo sapiens	Trigo, arroz	<i>Triticum</i> sp. Or <i>Secale cereale</i> y <i>Oryza</i> sp.
45	Madrid	Granel	Nube	Nube		Sin etiqueta	Cerdo, vaca, humano	Sus scrofa, Bos taurus, Homo sapiens	Patata o tomate, calabaza o calabacín, gramíneas, maíz	<i>Solanum tuberosum</i> or <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Curcubita</i> sp., Poaceae, <i>Zea mays</i>
46	Madrid	KING REGAL canister	Pica pica	Gominola dura	Bote	Azúcar, sabores y olores	Cerdo, humano	Sus scrofa, Homo sapiens	NO	
47	Madrid	Granel, picota	Caramelo con gelatina	Gominola blanda	Con papel	Azúcar, glucosa, gelatina, espesante, dextrosa, agentes gelificantes, colorantes, saborizantes	YES	Bos taurus, Sus scrofa	Cyclopia, gramíneas, soja, albaricoque o cereza, rabanito o nabo, maíz	<i>Cyclopia</i> sp., Poaceae, <i>Glycine max</i> , <i>Prunus armeniaca</i> or <i>P. tormentosa</i> or <i>P. humilis</i> , <i>Raphanus sativus</i> or <i>Brassica</i> sp., <i>Zea mays</i>
48	Madrid	Granel LONKA	Toffee	Gominola dura		Sin etiqueta	NO		YES	<i>Curcubita</i> sp./ <i>Citrillus lanatus</i> , Poaceae, <i>Zea mays</i>
49	Madrid	Granel	Palote cerde-blanco	Gominola dura		Sin etiqueta	YES	Sus scrofa	YES	<i>Theobroma subinarum</i> , <i>Theobroma grandiflorum</i> or <i>Theobroma cacao</i> or <i>Raphanus sativus</i>
50	Madrid	HAPPYDENT	Chicle sandía, piña, melón	Chicle	Con papel	Edulcorantes, zumos de frutas, acidulantes, olores, goma arábica, gelatina, aceite vegetal, colorantes (curcumina, azul brillante FCF)	YES	Sus scrofa	YES	<i>Castanea sativa</i> , <i>Cyclopia</i> sp., <i>Zea mays</i>

Respecto al origen geográfico de las muestras, aunque fueron adquiridas en España, la mayoría procedían de diferentes lugares y solamente 9 habían sido producidas en España (tabla 5). Otras dos se fabricaron y envasaron indistintamente en España y otro país: Portugal (muestra 5) y Turquía (muestra 50). Otras procedencias geográficas encontradas fueron Portugal, Suecia y Francia. Incluso la muestra comprada en Nueva York resultó ser producida y envasada por una empresa española, lo cual es una prueba de la globalización de este mercado.

### EXTRACCIÓN Y CALIDAD DE ADN

Tras ensayar los tres kits explicados en “Materiales y Metodología”, solamente con el último kit utilizado, DNeasy Mericon Food Kit de QUIAGEN fue posible obtener una cantidad suficiente de ADN. Gracias a los efectivos pasos de limpieza de la muestra del kit seleccionado, pasando una fase por CTAB (detergente) y otra por cloroformo, la muestra quedó suficientemente limpia de inhibidores que frenaran o impidieran la posterior reacción de amplificación.

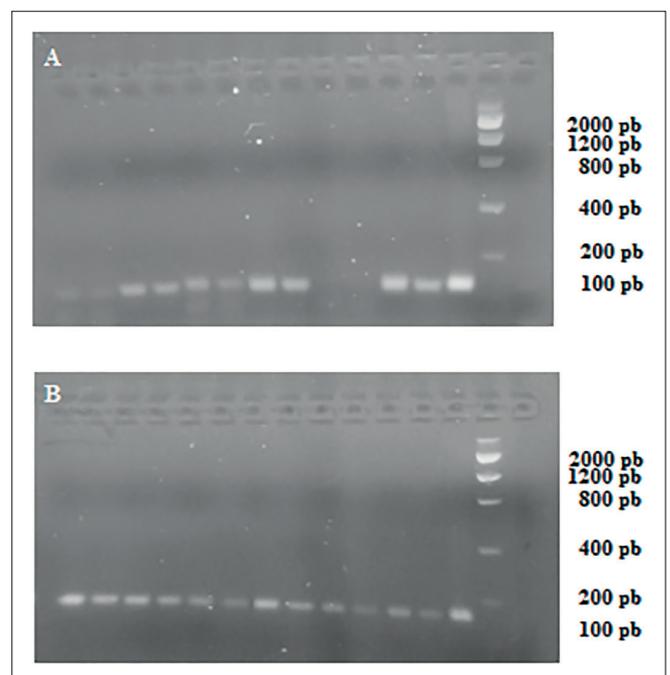
### MARCADORES MOLECULARES SELECCIONADOS

De todos los marcadores ensayados, se seleccionó el marcador de [21] para la determinación de las especies animales y el marcador de [22] para la detección de especies vegetales. En el caso animal los otros marcadores ofrecieron problemas para amplificar específicamente el ADN de interés, no obteniendo amplificación alguna en muchos casos. En el caso de los vegetales, el par de cebadores descritos en [23] no era suficientemente resolutivo, no identificando la mayoría de especies de

interés contenidas en las golosinas más que a nivel de familia. En cambio, con el fragmento seleccionado sólo encontramos este problema en algunos cereales, muy similares entre sí, identificando la mayoría de ingredientes vegetales al menos a nivel de género.

### RESULTADOS DE PCR Y SECUENCIACIÓN

Se ha podido recuperar ADN de suficiente calidad para obtener PCR positivas en la mayoría de las golosinas comerciales analizadas, tal y como se ve por ejemplo en la figura 3. El éxito de amplificación fue el 86% y 84% de las muestras para el marcador animal y vegetal respectivamente (tabla 6). De las golosinas en las que se obtuvo



**Figura 3.** Producto de PCR visto en gel de agarosa al 2% marcado con bromuro de etidio. (A) Amplificaciones con el marcador animal; (B) Amplificaciones con el marcador vegetal. En ambos casos se ven de izquierda a derecha dos calles por muestra (total 6 muestras: gominola blanda, gelatina, nube, caramelo duro con gelatina, gominola blanda, palote), un control positivo, un marcador de tamaño (tamaños de las bandas expresados en un lateral en pares de bases; pb) y el control negativo de la PCR en la última calle

**Tabla 5.** Origen de producción y envasado de las muestras envasadas

Procedencia	Nº muestras
Mixtos (España y otro país)	2
Portugal	4
España	9
Suecia	1
Francia	2

**Tabla 6.** Éxito de amplificación y obtención de secuencia para los marcadores moleculares animal y vegetal seleccionados

Comunidad Autónoma	Total	Amplificación		Secuencia	
		Animal	Planta	Animal	Planta
Asturias	8	7	7	7	7
Castilla y León	9	7	8	6	6
Madrid	12	10	11	10	11
Castilla la Mancha	9	8	9	7	9
Andalucía	11	11	8	11	5
EEUU	1	0	0	0	0
TOTAL	50	43	42	41	37

amplificación, se pudo llegar a obtener secuencias en un 95.3% para el marcador animal y un 88.1% para el marcador vegetal (tabla 6). Un total de 684 clones fueron secuenciados.

La limpieza del proceso de PCR y ausencia de contaminación durante la manipulación de las muestras en el laboratorio fue asegurada en todos los casos por controles negativos sin rastro de ADN o producto de PCR.

En general, la especie animal encontrada más frecuentemente fue la vaca (*Bos taurus*), seguida por el cerdo (*Sus scrofa*). En un 60.5% de las muestras se encontró mezcla de diferentes especies, entre las que se encontraban estas dos y además pollo, pavo, búfalo, anchoveta peruana y/o diferentes especies de merluza, sobre todo especies sudafricanas o de la costa oriental del Pacífico (tabla 4). En algunas muestras también aparecieron trazas de ADN humano, probablemente como consecuencia de la manipulación de estos productos a lo largo de la cadena de producción o, en el caso de las golosinas a granel, podría haber sido transferido por diferentes usuarios durante el autoservicio.

En cuanto a las especies vegetales encontradas, los cereales fueron las más frecuentes, especialmente el trigo y el maíz, en el 36% de las muestras cada una. Por la

similitud en la secuencia, algunos cereales sólo pudieron identificarse a nivel de familia. Otras especies identificadas fueron: soja, avellana, nuez, judías, zanahoria, patata, calabaza, albaricoque, cereza (tabla 4).

## ESPECIES PRESENTES EN GOLOSINAS ENVASADAS

Respecto al contenido en especies animales, lo más frecuente fue encontrar una única especie. Apareció mezcla de especies en el 32% de las muestras. En el caso de las especies vegetales los resultados fueron los contrarios, siendo más común encontrar 4 o más especies dentro de la misma golosina (figura 4). En caso de muestras que mencionaban gelatina como ingrediente pero no especificaban el origen de la misma, dos de ellas (18.2%) contenían trazas de especies de pescado, que está descrito como potencial alérgeno.

De las especies encontradas, no todas estaban declaradas en la lista de ingredientes o en la mención de potenciales alérgenos en su caso (figura 4). En el caso de los animales, la mayoría de las muestras que contenían una sola especie no la declaraban en la etiqueta. Para los vegetales fue frecuente encontrar al menos 3 especies no declaradas en la etiqueta, lo cual ocurrió en el 50% de las muestras (figura 4).

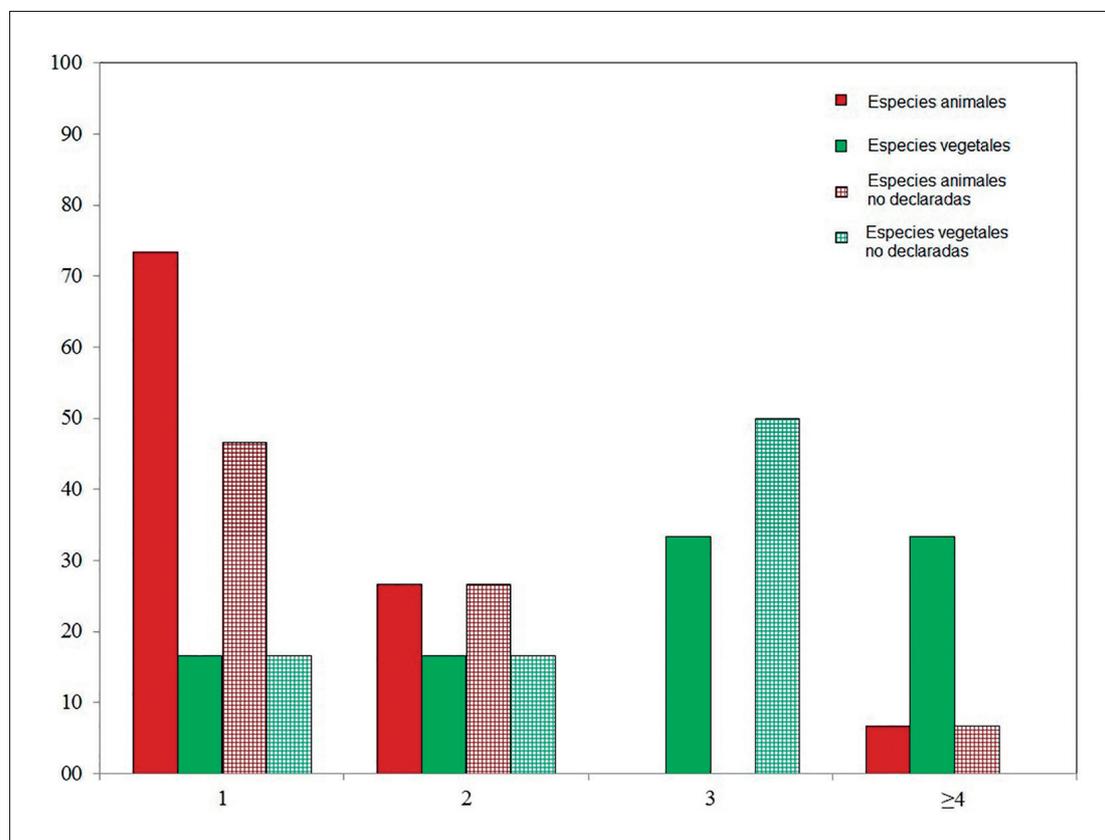


Figura 4. Número de especies animales y vegetales por producto detectadas en las golosinas envasadas analizadas y porcentaje de golosinas con de 1 a  $\geq 4$  especies detectadas que no son declaradas en la etiqueta

En este tipo de golosinas se encontraron casos particulares especialmente llamativos de mal etiquetado (tabla 4; figura 5):

- En la muestra 2, un preparado para hacer un postre de natillas, se observa en la etiqueta un aviso de posibles alérgenos presentes en trazas, como: gluten, leche, soja, huevo y frutos secos con cáscara. Esta muestra lleva una etiqueta con la mención expresa de que el producto es apto para ovolacto-vegetarianos. Tras el análisis molecular de ADN con el marcador vegetal se detectó la presencia de trigo, lo cual es coherente con la advertencia de posible contenido en gluten. La amplificación con el marcador de ADN animal proporcionó secuencias de cerdo, lo que evidencia que la etiqueta de producto apto para vegetarianos es incorrecta.
- En la muestra 5, gelatina para cocinar, se especifica el origen de dicha gelatina como enteramente vegetal, procediendo de algas (agar-agar, gelificante vegetal). Tras el análisis molecular se detectó cerdo. Las especies vegetales encontradas fueron judía y *Cyclopia* sp. (arbusto de la miel, una especie sudafricana que se emplea generalmente en infusiones). No se encontraron trazas de ADN de algas.
- En la muestra 36, gominolas de frutas, se indica en la lista de ingredientes que solamente contiene aromas de fruta. Esto concuerda con la ausencia de trazas de fruta tras el análisis molecular. Sin embargo, con el marcador vegetal se encontró maíz, judías y tabaco, ninguna de las especies declarada en la etiqueta.
- En la muestra 42, surtido de diferentes gominolas blandas con azúcar, la lista de ingredientes indica que contienen un 7% de zumo de frutas concentrado. Sin embargo no fueron detectadas trazas de ADN de

ninguna fruta, pero sí de trigo, castaña y maíz, especies vegetales no declaradas en la etiqueta.

## ESPECIES PRESENTES EN GOLOSINAS VENDIDAS A GRANEL

Dentro de las golosinas vendidas a granel ( $n=32$ ) se encontró que el 25% y 20% de las muestras contenían una especie animal y vegetal respectivamente (figura 6). En el resto de las muestras fueron encontradas más especies, siendo lo más frecuente para el marcador animal la detección de 2 o 3 especies y 4 en el caso del marcador vegetal. En algunos casos se encontraron 5 o más especies.

Las especies animales encontradas tras el análisis fueron vaca (*Bos taurus*) (figura 7), seguida por el cerdo (*Sus scrofa*) y otras, como pollo (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*) y búfalo (*Bubalus bubalis*), éste último detectado en una muestra. Vaca y cerdo se encontraron presentes en un 76.9% y 57.7% de las muestras respectivamente. En un 38.4% (figura 7) se detectaron diferentes especies de pescado, todas ellas especies de merluza (*Merluccius* sp.) principalmente africanas (tabla 4). En una muestra se detectó también anchoveta peruana (*Engraulis ringens*).

Las especies vegetales detectadas en la mayoría de las golosinas analizadas fueron trigo (*Triticum* sp. or *Secale cereale*) y maíz (*Zea mays*), tal y como se ve en la figura 8. Otras especies encontradas fueron judías, soja, diferentes frutos secos (avellana, nuez, cacahuete) y arroz. Es llamativo observar que son las especies más alergénicas, como trigo, maíz o judías las que aparecen en una mayor proporción (figura 8). También se hallaron otras plantas como cacao, arbusto de la miel, olivo y otras en menor frecuencia que las mencionadas anteriormente, tal y como se ve en la tabla 4.



Figura 5. Imágenes de golosina y envase de los casos particulares 2, 5, 36 y 42

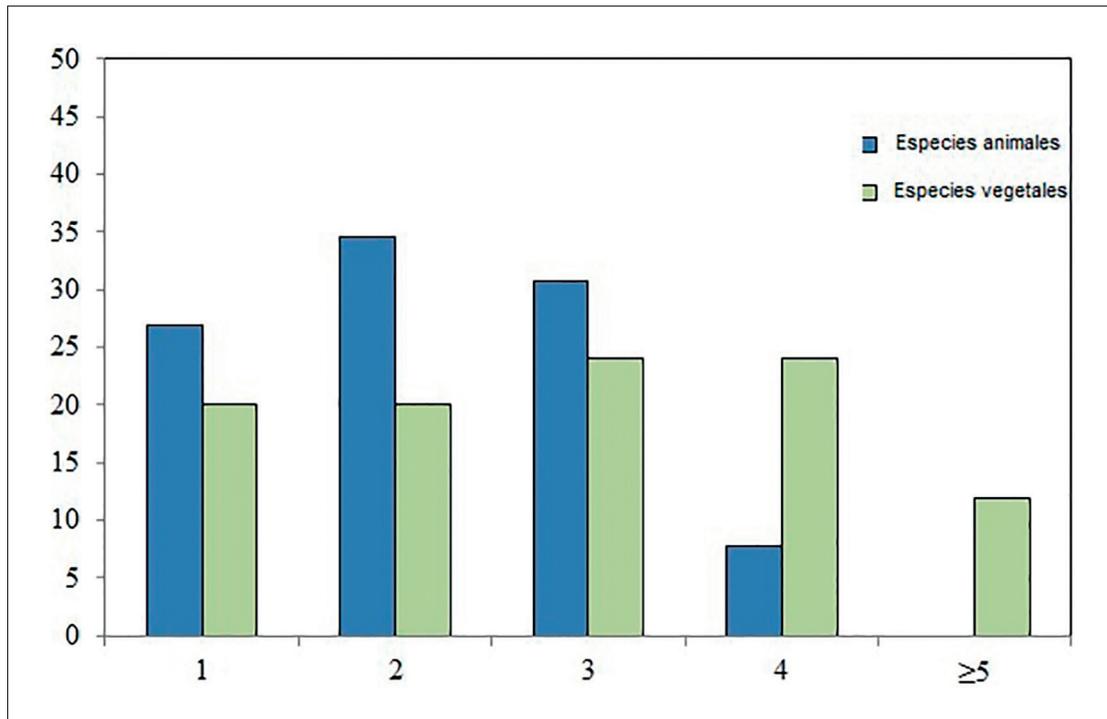


Figura 6. aNúmero de especies animales y vegetales por producto detectadas en las golosinas a granel analizadas

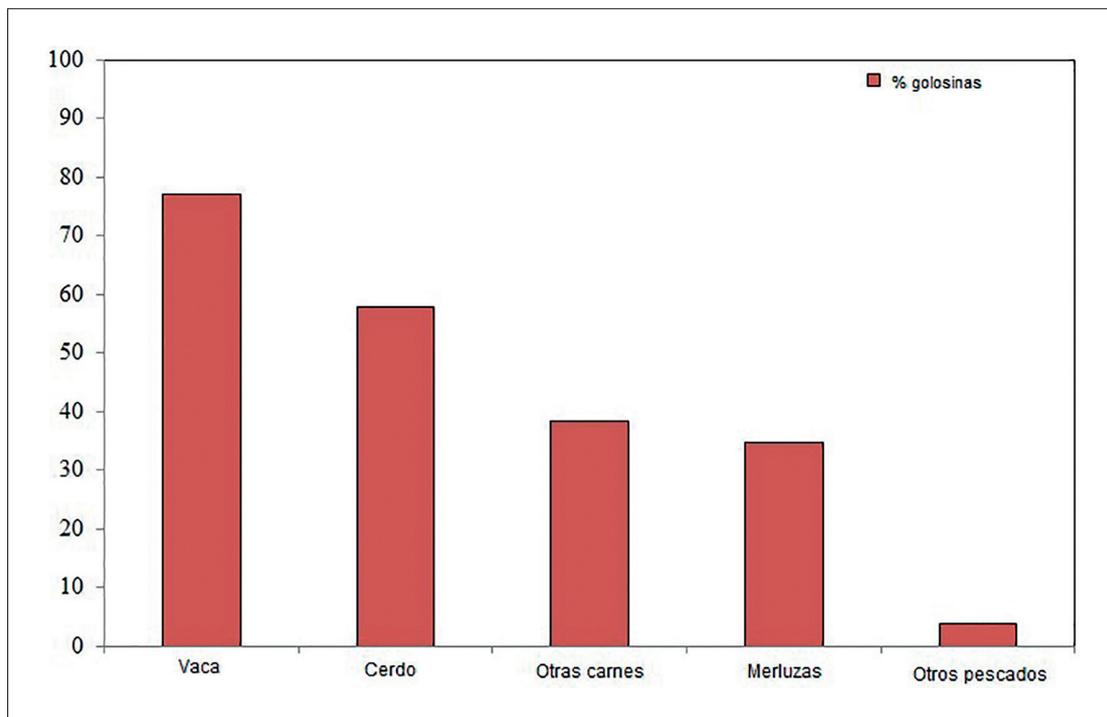


Figura 7. Porcentaje de golosinas a granel analizadas que contenían diferentes especies animales

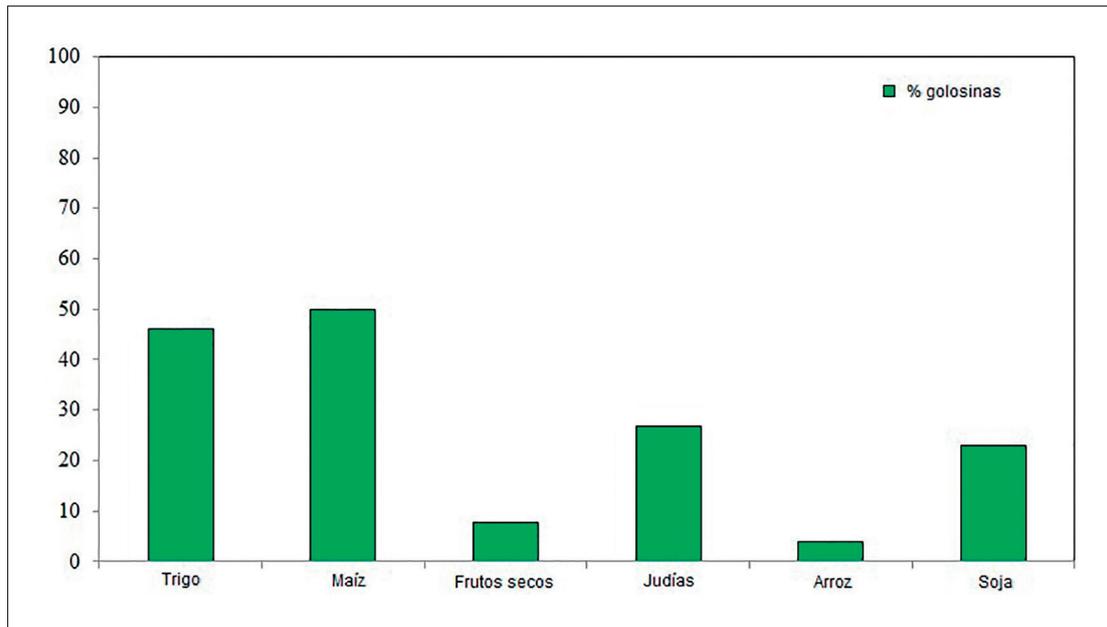


Figura 8. Porcentaje de golosinas a granel analizadas que contenían diferentes especies vegetales

## DISCUSIÓN

### COMENTARIOS GENERALES

En este proyecto se ha aportado información concreta sobre la composición real de las golosinas comercializadas en España, mediante el uso de marcadores moleculares basados en el ADN para la detección de las especies contenidas en estos productos. Para ello primero se puso a punto la extracción de ADN, la cual fue muy compleja por el alto grado de procesamiento de las muestras y la ya prevista baja cantidad de ADN contenida, siendo complicado recuperar la cantidad necesaria para continuar con el proceso de trazabilidad. A pesar de estas dificultades se consiguió obtener ADN de calidad suficiente para realizar una PCR posterior sin contaminación con ADN externo a la golosina analizada. Con los cebadores elegidos se consiguió una amplificación excelente de los componentes de las golosinas estudiadas (figura 3). La puesta a punto de las condiciones de PCR en extrema esterilidad fue la parte más compleja del proceso, que se repitió hasta conseguir obtener un alto porcentaje de amplificación en las muestras y ADN de calidad suficiente para los procesos posteriores de secuenciación y clonación. El éxito conseguido fue muy alto tanto para el marcador molecular animal como para el vegetal (tabla 6), demostrando que la selección de los marcadores fue acertada.

En los pocos casos en los que no hubo amplificación positiva, es posible que el ADN estuviera excesivamente degradado tras el proceso de manufacturación de la golosina, al igual que sucede en otros productos con alto grado de procesamiento como los enlatados [24]. En el

caso del marcador animal, podría suceder que las golosinas no amplificadas no contuvieran realmente especies animales, o bien que no hubieran quedado suficientes restos en la gelatina (si la llevan) como para ser detectados, como se ha visto en algunas gelatinas de pescado o *isinglass* empleadas para la producción de vino donde no parecen quedar muchos restos celulares [25]. En el caso de las especies vegetales, también puede ser que no queden restos suficientes a nivel orgánico como para ser detectados.

Un resultado tan espectacular a nivel de trazas de ADN con amplificación positiva en la mayoría de las muestras analizadas no era esperado en un principio, ya que las golosinas comerciales se exponen a tratamientos prolongados de altas temperaturas durante su manufacturación. Al menos en especies animales, la cantidad de restos celulares debería ser baja. Al obtener tantas amplificaciones positivas y mezclas de especies en la mayoría de las muestras para ambos marcadores, lo que hizo necesario realizar clonación para separar las diferentes especies y para cada marcador, el coste, tanto económico como en esfuerzo y tiempo, sufrió un gran aumento. Este fue el motivo de cerrar el análisis con un número de 50 muestras (el mínimo previsto en el proyecto), que parecen sin embargo suficientes para dar una visión global bastante ajustada de la composición de las golosinas industriales de venta en España.

Se observó que la vaca y el cerdo son las especies más frecuentemente empleadas para fabricar la gelatina presente en las golosinas analizadas, tal como citan otros autores para gelatinas comerciales en general [26] [27]. Estas especies no ocasionan normalmente problemas severos de alergia, salvo algún caso de enterocolitis en

el caso de carne de ternera [28]. Otro problema derivado del consumo de estas especies fue en su momento la transmisión de la Encefalopatía Espongiforme Bovina [29], lo que fue uno de los motivos para comenzar a utilizar gelatinas de pescado o de origen vegetal en productos alimenticios. Sin embargo en las golosinas analizadas se constata que la mayoría siguen conteniendo vaca y cerdo.

En el conjunto de muestras analizadas, el 66% contenía mezcla de diferentes especies animales (tabla 4), algo que no era algo esperado *a priori* y resulta ser uno de los resultados más llamativos que apunta al uso de mezclas animales muy diversas en la fabricación de gelatina comercial. Se encontraron especies de pescado (merluza y anchoveta peruana) en un 22% de las muestras. El pescado es considerado un potencial alérgeno, por lo que cuando está presente en los alimentos debe ser indicado (R.D. 1245/2008). Sin embargo, en ninguna de las muestras analizadas se encontró mención al pescado como potencial alérgeno en las etiquetas. Esto en sí mismo ya supone un riesgo para dichas personas, las cuales podrían sufrir reacción alérgica al ingerir esas golosinas sin haber sido informadas de su contenido en pescado [18].

En el caso de las especies vegetales, también la mezcla fue lo más frecuente. En este caso podría ser esperable porque la mayoría de golosinas tienen sabores complejos de frutas, vegetales o especias. Dentro de las especies encontradas hay algunas caracterizadas también como potenciales alérgenos, como el trigo (gluten), frutos secos (avellana o nuez), maíz, judías etc. [28]. Muchas de ellas tampoco fueron mencionadas debidamente como potenciales alérgenos en los envases, o en los puntos de venta en el caso de las golosinas vendidas a granel (tabla 5). De nuevo, se confirma el riesgo para las personas alérgicas o con alguna intolerancia alimentaria a sufrir una reacción alérgica, que no sería posible relacionar con el consumo de estos productos por falta de información.

## GOLOSINAS ENVASADAS

En este tipo de productos se ha encontrado una falta llamativa de información sobre los potenciales alérgenos que contienen. El ejemplo más llamativo quizás es la ausencia total de referencia al contenido en pescado, que se ha encontrado en el 11.8 % de las muestras analizadas. Para las personas con una alergia severa al pescado, la cual produzca síntomas incluso por contacto o inhalación de vapores durante su cocción [30], una cantidad pequeña de en estos productos podría ser un gran riesgo. De hecho se ha citado ya algún caso de reacción alérgica tras la ingestión de nubes de malvavisco fabricadas con gelatina de pescado [18]. Podría suceder lo mismo en España a la vista de estos resultados. Por otra parte, en el 50% de las muestras había por lo menos tres especies vegetales no declaradas en el envase (figura 4), algunas de ellas claramente

alergénicas como judías y frutos secos. Para muchas de las especies vegetales no declaradas que se han encontrado en este estudio se han descrito reacciones alérgicas, algunas de gravedad [31-35]. Se han encontrado trazas de judías, maíz y tabaco en golosinas de frutas donde no serían esperables al no estar especificadas en la etiqueta. Dado que las dos primeras son especies bastante alergénicas [36] [37], debería existir un aviso de su posible contenido en el producto. Como con el tabaco, es posible que fueran incorporadas inadvertidamente a la golosina durante el proceso de envasado, ya que en las cadenas envasadoras pueden existir restos de otros productos potencialmente alergénicos que se mezclan accidentalmente [38]. Este tipo de trazas adquiridas son bastante frecuentes en alimentos industriales y por ello las etiquetas de algunos productos avisan sobre posibles alérgenos que no están en la lista de ingredientes, pero podrían haber sido adquiridos durante el envasado posteriormente a su fabricación. Otro ejemplo de especie potencialmente alergénica en las golosinas analizadas son las castañas, causa común de alergias sobre todo en poblaciones de Asia que actualmente están extendiéndose a otras regiones [39]. También se ha encontrado trigo; la proteína denominada gluten, típica de este cereal, es un alérgeno bien conocido que causa sensibilidad no celiaca al 16-25% de la población adulta en el Norte de Europa [40], y alergia frecuente en países como España, Gran Bretaña y Estados Unidos según la Asociación Española de Alérgicos a Alimentos y Látex. El gluten tiene regulación explícita, siendo obligatorio indicar claramente en los alimentos envasados el contenido en cereales con gluten, como el trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas (Anexo II del Reglamento Europeo N° 1169/2011, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición).

Otros problemas para el consumidor pueden ser de tipo ético o religioso, al ingerir inadvertidamente especies indeseadas. El consumo de cerdo no es aceptable para la religión musulmana, y en este estudio se han encontrado muestras que lo contienen sin advertirlo en la etiqueta. Como en otros países, también en España la gelatina o los productos que la contienen parecen tener una alta probabilidad de sufrir una adulteración con material porcino [27]. De forma más llamativa ha aparecido también en muestras etiquetadas como “aptas para vegetarianos” u “ovolacto-vegetarianos”.

A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que el etiquetado las golosinas analizadas resultó deficiente, y podría representar un riesgo para las personas alérgicas, como se ha mostrado también en otros estudios [38]. Estas personas se ven obligadas a depender de la información contenida en las etiquetas y envases para tomar la decisión de comprar y consumir alimentos. Por esta razón la exactitud y fiabilidad de las etiquetas son de vital importancia, sobre todo en unos productos tan consumidos y comunes en todos los países como las golosinas.

## GOLOSINAS VENDIDAS A GRANEL

Las golosinas vendidas a granel no están obligadas a indicar los ingredientes ni alérgenos contenidos en ellas. Sin embargo, en este tipo de golosinas se encontraron diversos alérgenos que podrían dar problemas de salud a consumidores vulnerables (tabla 4). Se han encontrado dos o tres especies animales y cuatro o más vegetales por tipo de producto. Vaca, cerdo, trigo, maíz y judías fueron las especies más representadas. Como en las golosinas envasadas, se encontró pescado, en este caso en un 38% de las muestras, del que hay que advertir al consumidor salvo si está en forma de gelatina como soporte de vitaminas o como clarificante de bebidas alcohólicas (1245/2008; Anexo II del Reglamento Europeo N° 1169/2011). Las merluzas contienen parvalbúmina beta similar al tipo gad c 1 de *Gadus callarias*, considerado el representante de los alérgenos de pescado [41]. Se aconseja a los alérgicos evitar cualquier producto que contenga cualquier pescado [42]; por ello, estas golosinas a granel constituyen un riesgo potencial para las personas alérgicas y deberían comercializarse acompañadas de algún aviso sobre los alérgenos que podrían contener. Sin embargo esto no está contemplado en la normativa vigente (348/2011), por lo que a día de hoy sería más seguro para las personas alérgicas a cereales, frutos secos, y/o pescado evitar cualquier golosina vendida a granel.

## IMPLICACIONES DIRECTAS PARA LA SALUD Y LA ÉTICA O PREFERENCIAS DE LOS CONSUMIDORES

Todos los resultados obtenidos han demostrado el riesgo potencial que implica la falta de información sobre la composición de las golosinas comerciales para los consumidores con alergias o intolerancias alimentarias. Muchas veces aquellos ingredientes que están presentes solamente en trazas son englobados bajo algún término generalista como “colorantes” o “especies”, evitando así poner las especies concretas contenidas en el producto [43]. Como se puede observar en este trabajo, a pesar de las múltiples reformas sobre el etiquetado y los esfuerzos legislativos como “The Food Allergy Labeling and Consumer Protection Act” (FALCPA) la información contenida en las etiquetas de las golosinas envasadas sigue siendo insuficiente e inexacta, o simplemente inexistente en el caso de las golosinas vendidas a granel. El consumo inadvertido de sustancias o especies a las que se tiene una alergia o intolerancia diagnosticada puede conllevar desde una simple urticaria a un shock anafiláctico [44-46]. La ausencia de información sobre la composición de cualquier alimento complica o imposibilita el diagnóstico al no poder asociar síntomas de reacción alérgica con un alimento concreto, si se ignora que se consumió. Esto es especialmente importante en niños, los mayores consumidores de golosinas. Sin una información completa de lo que el niño ha consumido será muy difícil dar un diagnóstico único para una reacción y

por lo tanto darle pautas sobre su actuación y consumo posterior.

Otro problema reflejado en este trabajo es la dificultad de elección de un producto por principios éticos, morales o religiosos. Si una persona es vegetariana, vegana, o practica una religión con alguna restricción sobre los productos cárnicos, no podrá realizar una elección segura en este tipo de productos. En las golosinas a granel con ausencia total de información sobre su composición, ninguno de estos grupos sociales podría estar seguro de estar haciendo un consumo acertado. Una simple lista de alérgenos e ingredientes completa, tanto en golosinas envasadas como en golosinas vendidas a granel, sería un esfuerzo pequeño para el productor en comparación con las enormes ventajas que aportarían a los consumidores etiquetas estrictas y fiables.

Finalmente, cabe señalar que los resultados encontrados en este estudio son seguramente extrapolables a otros países. El comercio de golosinas es internacional y forma parte de un mercado global [47], como se ha constatado en el muestreo aquí analizado en el que las golosinas se habían fabricado en al menos cuatro países diferentes.

## CONCLUSIONES

- Durante este proyecto se obtuvieron 101 muestras de golosinas y dulces comerciales de diferentes tipos, de las cuales 50 (49 compradas en España y 1 en Nueva York) fueron analizadas genéticamente para detectar trazas de ADN e identificar la especie correspondiente.
- Se consiguió extracción positiva de ADN a partir de las golosinas comerciales analizadas, así como amplificación mediante PCR de fragmentos pequeños de genes conservados empleando una pareja de cebadores específica de animales y otra de vegetales.
- A partir de las secuencias de ADN obtenidas se pudo determinar la composición real de especies animales y vegetales de las golosinas industriales analizadas y compararla con la información proporcionada en las etiquetas. Se comprobó que un 82.4% de las etiquetas son erróneas porque no informan sobre la composición real de las golosinas analizadas. También se encontraron trazas de especies alergénicas como pescados, cereales y judías que no estaban especificadas como tal en las etiquetas, pese a que es una exigencia de etiquetado en la legislación española vigente.
- En algunos productos etiquetados como aptos para vegetarianos se encontraron trazas de especies animales como cerdo, que es un componente frecuente de la gelatina.
- En las golosinas a granel, para las cuales la actual normativa no exige que especifiquen las especies que contienen, se encontró que el 75% y el 80% contiene mezclas de especies animales y vegetales respectivamente. El 75.8 % contiene especies potencialmente alergénicas (cereales con gluten, judías, soja, pescado).
- A la vista de los resultados encontrados en este estudio, se propone la revisión de la actual normativa de etiquetado respecto a las golosinas a granel, para que incluyan una lista de su contenido en potenciales especies alergénicas. También se sugiere la necesidad de un mayor control y autenticación de los productos etiquetados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Popkin BM, Nielsen SJ. 2003. The Sweetening of the World's Diet Obesity Research 11(11), 1325–1332.
2. Lee IM, Paffenbarger Jr RS. 1998. Life is sweet: candy consumption and longevity. *British Medical Journal*, 317: 1683-1684.
3. Liem DG, Mars M, De Graaf C. 2004. Sweet preferences and sugar consumption of 4- and 5-year-old children: role of parents. *Appetite* 43, 235–245.
4. Jansen E, Mulkens S, Jansen A. 2007. Do not eat the red food!: Prohibition of snacks leads to their relatively higher consumption in children. *Appetite* 49, 572-577.
5. O'Neil CE, Fulgoni III VL, Nicklas TA 2011. Candy consumption was not associated with body weight measures, risk factors for cardiovascular disease, or metabolic síndrome in US adults.
6. Rusconi M, Conti A. 2010. Theobroma cacao L., the Food of the Gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res*, 61: 5-13.
7. St-Onge MP, Keller KL, Heymsfield SB. 2003. Changes in childhood food consumption patterns: a cause for concern in light of increasing body weights. *Am J Clin Nutr* 78, 1068-1073
8. Kleemola-Kujala E, Räsänen L. 1982. Relationship of oral hygiene and sugar consumption to risk of caries in children *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 10(5), 224–233.
9. Fried SK, Rao SP. 2003. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 78: 873S-880S.
10. Chen L, Caballero B, Mitchell DC, Loria C, Lin PH, Champagne CM, et al. 2010. Reducing consumption of sugar-sweetened beverages is associated with reduced blood pressure: a prospective study among United States adults. *Circulation*, 121: 2398-2406.
11. Potischman N, Coates RJ, Swanson CA, Carroll RJ, Dailing JR, Brogan DR, et al. 2002. Increased risk of early-stage breast cancer related to consumption of sweet foods among women less than age 45 in the United States. *Cancer Causes Control*, 13: 937-946.
12. Bradshaw PT, Sagiv SK, Kabat GC, Satia JA, Britton JA, Teitelbaum SL, et al. 2009. Consumption of sweet foods and breast cancer risk a case-control study of women on Long Island, New York. *Cancer Causes Control*, 20: 1509-1515.
13. Hirsch JW, Aiello SR, Hirsch AR. 2012. Relative Satiety Value of Candy and Gum: Potential Therapies for Childhood Obesity. *J Obes Wt Loss Ther* 2:139.

14. Madsen C. 1997. Chemicals in food and allergy: fact and fiction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 4, 115–120.
15. Simon RA. 1996. Adverse reactions to food and drug additives. *Immunol Allergy Clin North Am* 16:137.
16. Ramesh S. 2008. Food Allergy Overview in Children. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 34(2), 217-230.
17. Al- Ahmed N, Alsowaidi S, Vadas P. 2008. Peanut Allergy: An Overview. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, 4(4), 139–143.
18. Kuehn A, Hilger C, Hentges F. 2009. Anaphylaxis provoked by ingestion of marshmallows containing fish gelatin. *J Allergy Clin Immunol* 708-709.
19. Poms RE, Klein CL, Anklam E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants* 21, 1-31.
20. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
21. Horreo, J.L., Ardura, A., Pola, I.G., Martínez, J.L., García-Vázquez, E. Universal primers for species authentication of animal foodstuff in a single polymerase chain reaction, 2013. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 654-361.
22. Han J, Wu Y, Huang W, Wang B, Sun C, Ge Y, Chen Y. 2012. PCR and DHPLC methods used to detect juice ingredient from 7 fruits. *Food control*, 25: 696-703.
23. Yano, T., Sakai, Y., Uchida, K., Nakao, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., Maitani, T. Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction, 2007. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 71 (7), 1793-1796.
24. Mackie IM, Pryde SE, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Pérez-Martín R, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Rehbein H. 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 9-14.
25. Weber P, Steinhart H, Paschke A. 2010. Characterization, antigenicity and detection of fish gelatin and isinglass used as processing aids in wines. *Food Additives and Contaminants*, 27: 273-282.
26. Daeyeon K, Sea CM. 2012. Trout skin gelatin-based edible film development. *Journal of Food Science*, 77: E240-E246.
27. Demirhan Y, Ulca P, Senyuva HZ. 2012. Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products-Halal/Kosher authentication. *Meat Science*, 90: 686-689.
28. Escudero E. Alergias alimentarias. En: Calvo Bruzos S C, Escudero Álvarez E, Gómez Candela C, Riobó Serván P (eds). *Patologías nutricionales en el siglo XXI: un problema de salud pública*. Servicio Medicina Interna, Hospital Infanta Sofía, Madrid: Editorial Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2011. p.213-26.
29. Shakila RJ, Jeevithan E, Varatharajakumar A, Jeyasekaran G, Sukumar D. 2012. Comparison of the properties of multi-composed fish gelatin films with that of mammalian gelatin films. *Food Chemistry*, 135: 2260-2267.
30. Pascual C, Martín Esteban M, Crespo JF. 1992. Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity. *Journal of Pediatrics*, 121: S29-34.
31. Bernhisel-Broadbent J & Sampson HA. 1989. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 83: 435-440.
32. Pastorello E A, Ortolani C, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Borga A, Bengtsson A, Incorvaia C, Berti C, Zanussi C. 1994. Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum and cherry in patients with oral allergy syndrome: An in vivo and in vitro study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 94: 669-707.
33. Sampson HA. 1999. Food Allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Clinical Immunology*, 103: 717-728.
34. Soller L, Ben-Shoshan M, Harrington DW, Fragapane J, Joseph L, St Pierre Y, Godefroy SB, La Vieille S, Elliott SJ, Clarke AE. 2012. Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 130: 986-988.
35. Lee S Y. 2013. IgE mediated food allergy in Korean children: focused on plant food allergy. *Asia Pacific Allergy*, 3: 15-22.
36. Lazo-Saenz J G, Galvan-Aguilera A A, Martínez-Ordaz V A et al. 2005. Eustachian tube dysfunction in allergic rhinitis. *Otolaryngology-Head and neck surgery*, 132: 626-629.
37. Kasera R, Singh A B, Lavasa S, Nagendra K, Arora N. 2013. Purification and Immunobiochemical Characterization of a 31 kDa Cross-Reactive Allergen from *Phaseolus vulgaris* (Kidney Bean). *PLOS ONE*, 8: e63063.
38. Laemmel S, Schnadt S. 2009. Food labelling as seen by the allergic consumer. Results of the inquiry concerning current food marking regarding allergenic ingredients. *Allergologie*, 31: 33-40.

39. Wah Lee B, Pei-Chi Shek L, Gerez I F A, Soh S E, Van Bever H P. 2008. Food Allergy-Lessons from Asia. *WAO Journal*, 1: 129-133.
40. Catassi C, Bai J C, Bonaz B, Bouna G, Calabro A, Carroccio A, et al. 2013. Non-Celiac Gluten Sensivity: The New Frontier of Gluten Related Disorders. *Nutrients*, 5: 3839-3853.
41. Elsayed S, Apold J. 1983. Immunochemical analysis of cod fish Allergen M. Location of the immunological binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy*, 38: 449-459.
42. Kuehn A, Hilger C, Lehnert-Weber C, Codreanu-Morel F, Morisset M, Metz-Favre C, et al. 2013. Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod salmon and tuna: component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens. *Clinical et Experimental Allergy*, 43: 811-822.
43. Pieretti M M, Chung D, Pacenza R, Slotkin T, Sicherer S H. 2009. Audit of manufactures products: Use of allergen advisory labels and identification of labeling ambiguities. *Journal of allergy and clinical immunology*, 124: 337-341.
44. Helbling A, Haydet R, McCants M L, Musmand J J, El-Dahr J, Lehrer S B. 1999. Fish allergy: is cross-reactivity among fish species relevant? Double-blind placebo-controlled food challenge studies of fish-allergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunology*, 83: 517-523.
45. Sicherer S H, Munoz-Furlong A, Sampson H A. 2000. Dose-response in double-blind, placebo-controlled oral food challenges in children with atopic dermatitis. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 105: 582-586.
46. Bock S A, Munoz-Furlong A, Sampson H A. 2001. Fatalities due to anaphylactic reactions to food. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 107: 191-193.
47. Krummel D A, Seligson F H, Guthrie H A, Gans D A. 2009. Hyperactivity: Is candy causal? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36: 31-47.

#### Páginas web

- Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Base de datos).
- Asociación Española de Alérgicos a Alimentos y Látex: <http://www.aepnaa.org/> (8-01-2014).
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición: [http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/rincon\\_consumidor/subseccion/celiacos.shtml](http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/rincon_consumidor/subseccion/celiacos.shtml) (8-01-2014).

## POSIBILIDADES DE CONTINUACIÓN DEL PROYECTO Y APLICACIÓN CLÍNICA

El proyecto realizado aporta datos sobre la composición real de las golosinas, hasta ahora desconocida en su mayoría. Estos dulces están presentes en la vida cotidiana de muchos adultos y niños, siendo de gran importancia conocer cuáles son sus ingredientes reales. Más en detalle, dentro de este trabajo se ha hecho especial hincapié en aquellos componentes considerados potenciales alérgenos, siendo estos ingredientes de mayor importancia para las personas alérgicas (1-2% adultos y 3-7% niños en España) o intolerantes a alguna/as especies.

Para ellos conocer lo que realmente ingieren al consumir un producto comestible es imprescindible para evitar una posible reacción en el caso de las alergias o intolerancias conocidas o para poder asociar una reacción a un determinado alimento o ingrediente si era desconocida hasta el momento. Tras el análisis de las muestras hemos comprobado que las etiquetas de las golosinas envasadas rara vez reflejan el contenido completo de la golosina, apareciendo en gran parte de los casos ingredientes no detallados en el envase. Especies alergénicas como trigo, maíz o gelatina de pescado son algunos de los casos encontrados, los cuales podrían desencadenar reacciones importantes. Con estos resultados este trabajo demuestra la necesidad de una revisión de las normas de etiquetado en estos productos, además de la necesidad del cumplimiento de la legislación actual de forma más estricta. También es necesaria la implantación de algún etiquetado o aviso de alérgenos en las golosinas a granel, ya que al no mostrar ninguna información en los puntos de venta, las personas alérgicas o intolerantes deberían evitarlas completamente para estar seguros de no correr el riesgo de sufrir alguna reacción “sorpresa”. Con toda la información obtenida en este estudio se ha dado una visión de la composición de las golosinas que podrá usarse para evitar riesgos de sufrir reacciones alérgicas o procesos de intolerancia alimentaria, o como orientación para los alergólogos al considerar los posibles desencadenantes de una reacción alérgica en un paciente. Dado el volumen de datos del trabajo concluido se ha planificado la publicación de los resultados obtenidos en dos artículos científicos independientes, dividiendo los datos en golosinas envasadas, con una legislación particular y más estricta, y golosinas vendidas a granel, en las cuales no se exige información ninguna en su venta.

Otras revistas científicas indexadas donde se ha considerado que tendrían cabida son: *Science* (31.027), *Molecular Nutrition and Food Research* (4.310), *Food Research International* (3.005), *Food Control* (2.738), *Food Quality & Preference* (2.430), etc. El primer artículo escrito con título “Authentication of commercial candy ingredients

employing DNA PCR-cloning methodology” ya ha sido publicado online en la revista científica indexada Journal of the Science of Food and Agriculture, donde tiene el DOI 10.1002/jsfa.7158 (2015) para cumplir con las condiciones del proyecto (ya que no entraba dentro de la temática de la revista Mapfre Trauma) puede observarse en el CD donde figura esta memoria. Tanto éste como el otro artículo que se piensa escribir con los datos de las golosinas vendidas a granel, formarán parte de la tesis doctoral de la becaria Ana Marta Muñoz Colmenero. Este trabajo podría ser continuado en un futuro en dos líneas. Para poder afinar aún más la composición real de las golosinas se podrían analizar algunas muestras utilizando técnicas de secuenciación masiva. El precio final sería parecido al de la secuenciación tradicional tras la clonación de los productos de PCR amplificados pero cabe esperar que al obtener un volumen de secuencias muy superior, del orden de millones, se podría llegar a obtener una mayor resolución de la total composición de estos dulces y también permitiría comparar ambas técnicas y observar las ventajas e inconvenientes de utilizar una u otra para este tipo de análisis alimentario. La otra línea que se podría seguir sería más desde el aspecto clínico, ensayando “in vitro” e “in vivo” extracciones de proteínas de estas golosinas con sueros de distintos pacientes y ver que ingredientes son los que más reacciones desencadenan o las dosis mínimas de ellos que tendría que llevar una golosina para provocar reacción.

En cuanto a la posible aplicación clínica del proyecto realizado, de forma directa sería el ensayo con sueros de pacientes alérgicos mencionado anteriormente. Existe también una relación indirecta de aplicación clínica que tendría que ver con el diagnóstico. El conocer la composición detallada de las golosinas permitiría una relación más fácil de una determinada reacción con un componente concreto o desencadenante, para los médicos competentes en esta disciplina. Esto facilitaría también el poder aconsejar prácticas de actuación, posteriores a la reacción, más realistas y acorde con la situación de cada paciente.

## PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DEL PROYECTO

Nada más sernos concedido este proyecto se obtuvo un gran interés mediático por parte de periódicos, páginas web, radios y cadenas de televisión. Debajo se ofrecen la mayoría de links referentes a estas difusiones:

- [http://www.elcomercio.es/agencias/20130111/asturias/investigadores-universitarios-buscaran-alergenos-golosinas\\_201301111438.html](http://www.elcomercio.es/agencias/20130111/asturias/investigadores-universitarios-buscaran-alergenos-golosinas_201301111438.html) (11-01-13)
- [http://www.uniovi.es/prensa/actualidad/-/asset\\_publisher/0001/content/investigadores-de-la-universidad-de-oviedo-rastrear-los-alergenos-mas-comunes-en-las-golosinas-de;jsessionid=520D760917E2C47165F55CD88877B979?redirect=%2Finicio%2F](http://www.uniovi.es/prensa/actualidad/-/asset_publisher/0001/content/investigadores-de-la-universidad-de-oviedo-rastrear-los-alergenos-mas-comunes-en-las-golosinas-de;jsessionid=520D760917E2C47165F55CD88877B979?redirect=%2Finicio%2F) (11-01-13)
- <http://www.lne.es/asturias/2013/01/12/grupo-expertos-genetica-buscar-sustancias-alergicas-golosinas/1352983.html> (12-01-13)
- <http://www.europapress.es/asturias/noticia-investigadores-universidad-oviedo-rastrear-alergenos-mas-comunes-golosinas-mayor-consumo-20130113112420.html> (13-01-13)
- [http://www.telecinco.es/informativos/Investigaran-alergenos-comunes-golosinas-consumo\\_0\\_1540875117.html](http://www.telecinco.es/informativos/Investigaran-alergenos-comunes-golosinas-consumo_0_1540875117.html) (14-01-13)
- <http://www.noticiassobresalud.es/las-chucherias-y-sus-componentes-alergenos/> (14-01-13)
- [http://www.rtpa.es/video:TPA%20Noticias%201.%20Fin%20de%20semana%20\\_1358674496.html](http://www.rtpa.es/video:TPA%20Noticias%201.%20Fin%20de%20semana%20_1358674496.html) (19-01-13).

También se llevaron los datos de este trabajo a un Congreso Europeo en la ciudad de Bolonia, Italia, el 2013 EFFoST Annual Meeting: Bio-based Technologies in the Context of European Food Innovation Systems, del 12-15 de septiembre (<http://www.fffostconference.com/>). En esta conferencia se presentó una charla oral en inglés con título “Tracing allergenic species in commercial candies”.

La puesta a punto de la técnica para la obtención de ADN a partir de las golosinas ha sido publicada en la revista Tecnofood, a modo de artículo de difusión, con título “Obtención de ADN a partir de golosinas para detección de alérgenos”. Una copia de dicho archivo se encontrará adjunta a esta memoria.

Por último se procedió a la escritura y envío a la revista indexada Journal of the Science of Food and Agriculture de un artículo científico con los datos de las golosinas envasadas, tal como se ha mencionado en el apartado de “Posibilidades de continuación del proyecto y aplicación clínica” y la planificación de un segundo artículo con la información de las golosinas a granel.