

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ESTUDIO DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE ALIMENTOS PARA AMPLIFICACIÓN POR PCR

Lic. María Soledad Olivares

**Tesis para optar por el grado académico de
Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

Córdoba – Argentina 2020

CENTRO DE EXCELENCIA EN PROCESOS Y PRODUCTOS DE CÓRDOBA
(CEPROCOR)
Sede Santa María de Punilla – Pabellón CEPROCOR
Sede Córdoba – Álvarez de Arenales 230 B° Junior

DRA. ANDREA BELAUS
DIRECTORA

MGTR. GERARDO GASPARUTTI
CO-DIRECTOR

TRIBUNAL

DRA. GEORGINA FABRO

DRA. MARÍA FERNANDA TRIQUELL

MGTR. DANIELA LOMBARDO

"Toda esta experiencia, que ha demandado gran esfuerzo, va dedicada a Antonio, mi viejo querido que, con su ejemplo de buen hombre, me enseñó el valor del trabajo incansable, de la persistencia, de no claudicar, de que todo se puede aprender, con paciencia y mansedumbre. ¡Estas presente cada día de nuestras vidas! ¡Gracias por tanto!"

Agradecimientos

Gracias eternas a Hernán, Jeremías y Agustín, por el amor incondicional, la paciencia y el aguante en tantas ausencias, por acompañarme siempre, cada uno a su manera.

A Andrea Belaus, por ser guía en esta experiencia, por sus comentarios siempre acertados, comprensión y sobre todo su paciencia inagotable.

A Nadia, amiga y compañera en esta aventura, por el ánimo y su mirada objetiva.

A Andrea Carrere, por su mirada crítica de las formas, su disposición y rápido accionar para asistir en mi auxilio.

A Gerardo, por estar y acompañar, y siempre tener palabras de calma.

A mis hermanas y sobrinas, por haber cuidado a mis dos cachorros en tantas oportunidades necesarias, y celebrar mis frutos.

Al CEPROCOR, institución en la que he compartido tantos años de experiencias con gente tan querida; por esta oportunidad y otras tantas... donde muchas veces han dejado que haga, sin restricciones.

Al Dr. Raúl Badini, por hacerme partícipe en este proyecto, y creer que algún granito de arena podía aportar.

A "Las Estrellitas", por todos esos largos viernes y sábados compartidos, por tanta diversión, como dice el viejo refrán "Dios los cría y el viento los amontona" y a nosotros nos juntó al fondo.

A los chicos de la Unidad de Biología Molecular, por la paciencia y el acompañamiento en el desafío de volver a estar frente a una mesada.

A Charly G., porque sin su aporte final, sin rodeos, no hubiese podido sacar el último palo de la rueda.

A todos aquellos que, de una u otra forma, han colaborado durante el recorrido de esta Maestría y en llegar hasta el final de este trabajo.

CONTENIDO

| | |
|--|------|
| Resumen | XI |
| Listado De Tablas Y Cuadros | XIII |
| Listado De Gráficos | XIV |
| Listado De Figuras | XV |
| Glosario | XVII |
| Capítulo I | 1 |
| Introducción | 1 |
| 1.1 – Clasificación de alimentos en la actualidad | 5 |
| 1.2 – Impacto en la salud | 6 |
| 1.3 – Necesidades del sector industrial y derecho del consumidor | 9 |
| 1.3.1 - Trazabilidad basada en el ADN | 12 |
| 1.3.2 - Identificación de especies | 16 |
| 1.4 –Algunos antecedentes analíticos | 17 |
| 1.5 –Desde el inicio: Lo fundamental | 20 |
| 1.5.1 - Homogeneización de la muestra | 22 |
| 1.5.2 - Lisis Celular | 23 |
| 1.5.3 - Separación de proteínas y lípidos | 24 |
| 1.5.4 - Precipitación del ADN | 25 |
| 1.5.5 - Recuperación del ADN | 26 |
| 1.6 –Lo que sigue: Estimación del rendimiento | 26 |
| 1.6.1 - ESPECTROFOTOMETRÍA ultravioleta | 26 |
| 1.6.2 – Electroforesis en gel de agarosa | 28 |
| 1.7 – Reacción en Cadena de la Polimerasa: Amplificación | 29 |
| 1.8 – HIPÓTESIS Y Objetivos | 33 |
| 1.8.1 – HIPÓTESIS | 33 |
| 1.8.2 – Objetivo General | 33 |
| 1.8.3 - Objetivos específicos | 34 |
| Capítulo II | 35 |
| Materiales Y Métodos | 35 |
| 2.1 Muestras de Alimentos | 37 |
| 2.1.1 – Preparación del material | 40 |
| 2.2 Estrategia Experimental | 40 |
| 2.3 –Extracción y Purificación de ADN | 41 |

| | |
|--|----|
| 2.3.2 - Método basado en el CTAB (bromuro de cetil- trimetil amonio)..... | 41 |
| 2.3.3 - Método basado en el CTAB modificado con adición de pvp (polivinilpirrolidona) | 42 |
| 2.3.4 - Método de Nucleo Spin – MachereyNagel (Kit comercial)..... | 42 |
| 2.3.5 - Método Wizard Magnetic DNA Purification System for Food-Promega | 43 |
| 2.4 –Rendimiento y Pureza del ADN | 46 |
| 2.5 –Amplificación por PCR – Ensayo de aplicación..... | 46 |
| 2.5.1 PCR – Real time | 47 |
| Capítulo III | 49 |
| Resultados Y Discusión..... | 49 |
| 3.1–Obtención de ADN | 51 |
| 3.2–Resultados del Ensayo de Aplicación | 57 |
| Capítulo IV | 67 |
| Conclusiones | 67 |
| Capítulo V..... | 71 |
| Bibliografía | 71 |
| Capítulo VI..... | 77 |
| Póster | 77 |
| 6.1 - Póster | 79 |
| Capítulo VII..... | 81 |
| Anexos..... | 81 |
| 7.1 - Instructivos | 83 |
| 7.1.1 Técnica ESTÁNDAR del bromuro de cetil-trimetil amonio..... | 83 |
| 7.1.2 Técnica estándar del Bromuro de Cetil-trimetil Amonio con adición de PVP (polivinilpirrolidona) | 85 |
| 7.1.3 Núcleo Spin Food Macherey - Nagel..... | 87 |
| 7.1.4 Extracción de ADN para alimentos (Wizard Magnetic)..... | 89 |

RESUMEN

En los últimos años distintos países, incluido Argentina, han avanzado con reglamentaciones para garantizar la inocuidad alimentaria. Varios métodos moleculares se han propuesto como herramientas útiles para el análisis de alimentos. A pesar de que los métodos basados en el ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son altamente específicos, reproducibles, sensibles y caracterizados por el alto poder de discriminación, están fuertemente limitados por la presencia de inhibidores, abundantes en particular en muestras de alimentos. Los compuestos inhibitorios pueden interferir en la reacción a diferentes niveles, desde disminución de la eficiencia hasta una inhibición completa de la actividad de la ADN polimerasa. Por lo tanto, los métodos basados en ADN son altamente dependientes de las técnicas de extracción y purificación del ADN. En particular, los métodos moleculares aplicados a muestras de alimentos requieren estrategias de extracción y purificación eficiente de los ácidos nucleicos y la remoción de numerosos compuestos inhibidores de PCR. En este trabajo se han explorado cuatro estrategias de extracción y purificación del ADN, dos con kits comerciales, Núcleo Spin Food -Macherey-Nagel y Wizard Magnetic DNA Purification System for Food-Promega, y dos métodos estándares, CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) y CTAB-PVP (bromuro de cetil-trimetil amonio con adición de polivinil pirrolidona). Se tuvo en cuenta el rendimiento de la extracción, la pureza del ADN y la amplificabilidad del ADN por qPCR. Se realizó la extracción y purificación de ADN por triplicado de quince alimentos procesados de diferente naturaleza y disponibles comercialmente (como por ejemplo galletitas, snacks, chocolate, medallones de pollo, jugo de frutas, etc). El ADN purificado se cuantificó por espectrofotometría UV a 260nm y la calidad se estimó por la relación UV 260/280nm. A su vez, se seleccionaron algunas muestras que pudieran contener ADN de maní, según su proceso de elaboración y/o la declaración en su rotulación, para ser amplificadas por qPCR y estimar si el ADN obtenido es factible de ser utilizado con este fin. Las estrategias de extracción y purificación evaluadas en este

trabajo mostraron concentraciones de ADN muy variables, con buen rendimiento con el método de CTAB y aún mayor con su modificación de adición de PVP, respecto de los kits comerciales ensayados. En cuanto a la pureza del ADN extraído, los kits comerciales resultaron con mejor prestación principalmente en aquellas muestras pertenecientes al grupo de los panificados (galletitas y snacks). La amplificación por qPCR de las muestras ensayadas, que contenían maní entre sus ingredientes, fueron inhibidas en aquellas extraídas con CTAB versus las obtenidas con Núcleo Spin Food, en concordancia con la mayor purificación y eliminación de inhibidores por parte de los kits comerciales. Se obtiene ADN amplificable, en cantidad y pureza diferentes que permite detectar ADN de maní y potencial presencia del alérgeno; estos resultados evidencian la necesidad de continuar evaluando la amplificación por qPCR de diferentes regiones blanco de interés, información que complementará la elección de la estrategia de extracción y purificación del ADN para los diversos grupos de muestras problema.

Palabras claves: ADN, alimentos, PCR.

LISTADO DE TABLAS Y CUADROS

| Número | Título | Página |
|---------------|--|---------------|
| Cuadro 1 | Principales alimentos alérgenos | 9 |
| Cuadro 2 | Alimentos utilizados en el estudio y sus referencias declaradas en la rotulación. | 37 |
| Tabla 1 | Resultados de cuantificación y pureza de ADN estimados mediante espectroscopia UV, correspondiente a la media de tres extracciones independientes con los métodos NS, WM, CTAB y CTAB con PVP. | 52 |
| Tabla 2 | Comparación de valores de C _q correspondiente a los extractos amplificados de maní, chocolate con maní y bombón relleno con pasta de maní (mostrados en la Grafica 4). | 59 |
| Tabla 3 | Comparación de valores de C _q para algunos alimentos con maní para cada una de las metodologías usadas. | 62 |

LISTADO DE GRÁFICOS

| Número | Título | Página |
|------------|---|--------|
| Gráfico 1 | Comparación de la media de la concentración de ADN para galletas de chocolate y semillas, snacks horneados, y su estimación de pureza a partir de los extractos obtenidos en tres purificaciones independientes para cada una de las metodologías. | 54 |
| Gráfico 2 | Comparación de la concentración de ADN obtenida para tres alimentos de matriz bien diferentes: miel, queso brie y medallón de pollo rebozado. | 55 |
| Gráfico 3 | Comparación de la media de ADN para alimentos como chocolate, alfajor, maní crudo y cereal de trigo y miel, extraído en tres ensayos independientes para cada uno de los procedimientos. | 56 |
| Gráfico 4 | Curva de amplificación de ADN correspondiente a extractos de maní crudo, chocolate con maní y bombón relleno con pasta de maní, purificados por NS y CTAB. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit. Los extractos purificados por CTAB no amplifican. | 58 |
| Gráfico 5 | Curva de amplificación de ADN correspondiente a extractos de maní crudo, chocolate con maní y bombón relleno con pasta de maní, purificados por CTAB. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit y un IC (control de inhibición). | 59 |
| Gráfico 6 | Seguimiento de la amplificación de ADN en la reacción de inhibición realizada con todos los extractos de alimentos involucrados en el ensayo de aplicación, purificados por NS, WZ, CTAB y CTAB + PVP. NTC (control sin templado) y el IC (control de inhibición). | 60 |
| Gráfico 7 | Seguimiento de la amplificación de ADN en la reacción con el target maní. Con todos los extractos de alimentos del ensayo de aplicación, purificados por NS, WZ, CTAB y CTAB + PVP. NTC (control sin templado) y control positivo provisto por el kit. | 61 |
| Gráfico 8 | Curva de amplificación de ADN correspondiente al extracto de alfajor con cobertura blanca. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit, extractos purificados por NS, WM, CTAB y CTAB+PVP. | 62 |
| Gráfico 9 | Curva de amplificación de ADN correspondiente al chocolate para taza. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit, extractos purificados por NS, WM, CTAB y CTAB+PVP. | 63 |
| Gráfico 10 | Curva de amplificación por qPCR de un extracto de ADN de bombón relleno con pasta de maní. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit, extractos purificados por NS y CTAB. | 64 |
| Gráfico 11 | Curva de amplificación por qPCR de un extracto de ADN de alimento infantil con trigo y miel. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit, extractos purificados por NS, WM, CTAB y CTAB+PVP. | 65 |

LISTADO DE FIGURAS

| Número | Título | Página |
|---------------|--|---------------|
| Figura 1 | Clasificación de las reacciones adversas en alimentos | 7 |
| Figura 2 | Alérgenos: El grupo de los grandes ocho | 8 |
| Figura 3 | Esquema de la estructura del ADN | 21 |
| Figura 4 | Esquema general de la reacción de PCR | 30 |
| Figura 5 | Mecanismo de incorporación de SYBR Green en la doble cadena de ADN | 32 |
| Figura 6 | Curva de amplificación: se detecta en cada ciclo de reacción midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN. | 33 |
| Figura 7 | Esquema del método tradicional del CTAB | 41 |
| Figura 8 | Esquema del método estándar de CTAB con adición de PVP | 42 |
| Figura 9 | Etapas principales del procedimiento de Núcleo Spin | 43 |
| Figura 10 | Aislación de ADN mediante el sistema magnético de purificación de ADN en alimentos Wizard | 45 |

GLOSARIO

Ácidos nucleicos: biomoléculas de elevado peso molecular, de estructura polimérica formado por monómeros denominados nucleótidos.

Alimentos ultra procesados: alimentos elaborados a base de materias primas previamente procesadas, que no contiene ingredientes frescos o que no pueden identificarse en la presentación final.

Extracción: procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos solventes no miscibles entre sí.

Fluoróforo: es una molécula o parte de una molécula que emite fluorescencia después de ser excitada con luz.

Inocuidad: es la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman según el uso previsto.

Matriz alimentaria: componentes nutrientes y no nutrientes de un alimento y sus relaciones moleculares entre ellos.

Patrones alimentarios: hábitos alimentarios de un individuo conformados por las preferencias alimentarias e influencia familiar y cultural respecto de la ingestión de alimentos.

Purificación: proceso de eliminación de imperfecciones o impurezas de una sustancia, en este caso de ADN.

Reacción en cadena de la polimerasa: PCR, del inglés *PolymeraseChainReaction*. Técnica de laboratorio que permite amplificar *in vitro* pequeños fragmentos específicos de ADN.

Seguridad alimentaria: concepto basado en cuatro pilares, la disponibilidad física, estabilidad de esa disponibilidad, el acceso garantizado a los alimentos y el uso o aprovechamiento de los nutrientes.

Taq polimerasa: enzima ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*, con la capacidad, a partir de una hebra molde generar una hebra complementaria añadiendo bases nitrogenadas.

Termociclador: equipo reciclador térmico de PCR, que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

Los avances científicos y tecnológicos desarrollados a lo largo de las últimas décadas han permitido ensayos analíticos extraordinariamente pormenorizados, de tal manera que de un alimento o producto puede expresarse su composición cualitativa y cuantitativa en detalle. Así mismo, dada la complejidad y diversidad de ingredientes, la matriz alimentaria en muchos casos, representa un desafío mayor que otros sistemas biológicos a la hora de su tratamiento analítico.

Sin embargo, con la industrialización, principalmente en la última parte del siglo pasado, el procesamiento de alimentos se ha desarrollado a gran velocidad y se ha transformado profundamente, con el aporte de la tecnología y la ciencia. Estos cambios traen aparejados, tanto para la industria como para el Estado, en la jurisdicción correspondiente, la responsabilidad de hacer una evaluación exhaustiva sobre el efecto que tienen todas las formas de procesamiento de alimentos sobre los sistemas y suministros de alimentos; los hábitos y patrones de alimentación; la nutrición, la salud y el bienestar.

Al mismo tiempo que conocemos mejor la composición de los productos alimentarios, también conocemos cada vez más y mejor los efectos de los diferentes nutrientes o sustancias sobre nuestro organismo.

En términos del Código Alimentario Argentino (Ley 18.284), *alimento es toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que, ingeridas por el hombre, aporten a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos. La designación "alimento" incluye además las sustancias o mezclas de sustancias que se ingieren por hábito, costumbres, o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo* (C.A.A. art.6 inc. 2).

De igual manera define a un *"Alimento genuino o normal, como el que, respondiendo a las especificaciones reglamentarias, no contenga sustancias no autorizadas ni agregados que configuren una adulteración y se expendan bajo la denominación y rotulados legales, sin indicaciones, signos o dibujos que puedan engañar respecto a su origen, naturaleza y calidad* (C.A.A. art.6 inc. 4).

Así como el riesgo de salud asociado a la producción y venta de alimentos no aptos para el consumo, los ingredientes presentes no declarados en un alimento

(contaminantes de proceso), la sustitución fraudulenta de especies de alto valor económico por otras de menor costo, la fabricación de productos con menor cantidad de especie que la declarada, la presencia de especies no permitidas a grupos religiosos, la inclusión de derivados cárnicos en productos destinados a vegetarianos, han impulsado el establecimiento de mayores controles en la cadena de producción y comercialización de productos para alimentación.

En la actualidad, la era de la globalización, el sistema alimentario está siendo determinado por el procesamiento industrial de los alimentos. El cambio más significativo de este determinante, es el desplazamiento de los patrones de alimentación basados en platos preparados a partir de materias primas sin procesar o mínimamente procesadas, por otros que se basan cada vez más en productos ultra procesados.

Este cambio, reflejado en los patrones alimentarios, principalmente los últimos veinte años, evidencia una diferente manera de comprar, preparar y consumir alimentos, probablemente, asociada a los cambios en el estilo de vida, la oferta de alimentos y el tiempo dedicado a la preparación de las comidas.

Estas modificaciones, transcurren relacionadas, por ejemplo, a un aumento en la prevalencia de las alergias alimentarias.

La globalización, el aumento de las importaciones y exportaciones, y los tratados de libre comercio han propiciado un mayor intercambio y acceso de los alimentos a nivel mundial; junto con ello los problemas asociados a los fraudes tales como la adulteración, sustitución, la intencionalidad y falsificación se han incrementado (Espinoza, Meza, Valencia y Quevedo; 2015).

Así como este escenario se ha ido modificando, la ciencia ha necesitado desarrollar técnicas moleculares aplicadas a alimentos en pos de resolver estos inconvenientes; técnicas basadas en la composición integral del alimento que es conservada a través de las transformaciones sufridas durante el proceso de elaboración.

Las técnicas basadas en ácidos nucleicos, como la extracción de ADN y posterior amplificación por PCR, tienen como ventajas, ser más sensibles que

aquellas basadas en proteínas, utilizar una pequeña cantidad de muestra y la posibilidad de analizar distintos tipos de matrices alimentarias sometidos a variados tratamientos de procesado.

1.1 – CLASIFICACIÓN DE ALIMENTOS EN LA ACTUALIDAD

En 2015, la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud exponen un informe sobre el Sistema NOVA, trabajo realizado por un equipo de investigadores de la Universidad de Montreal (Canadá) y de la Universidad de San Pablo (Brasil), donde proponen una nueva clasificación de los alimentos, según su grado de procesamiento, resultando más fácil y sencilla de acuerdo a las pautas alimentarias del siglo XXI.

Esta propuesta de clasificación de los alimentos toma en cuenta las implicaciones para la promoción de la salud y el bienestar de la población y reconoce los factores sociales, políticos y económicos que influyen en los sistemas alimentarios, el cambio de la comprensión pública de lo que es la alimentación saludable y las Enfermedades Crónicas no Transmisibles - ECNT (diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras).

La nueva clasificación incluye los siguientes grupos:

Alimentos naturales y mínimamente procesados

a) Alimentos naturales (no procesados), de origen vegetal como frutas y verduras, leguminosas, semillas, etc.; o de origen animal como carnes, huevos, leche, etc.

b) Alimentos mínimamente procesados: alimentos naturales que han sido modificados sin el agregado de sustancias externas, modificaciones de procesos como lavado, pelado, pasteurizado, congelado, trozado, etc., como por ejemplo los productos de cuarta gama (vegetales mínimamente procesados).

Ingredientes culinarios

Sustancias extraídas de otros alimentos mediante procesos como prensado, molido, refinamiento, triturado, etc., tales como aceites, grasas, harinas, azúcar o bien obtenidos naturalmente como la sal. Éstos forman parte importante -como ingredientes- en la elaboración de otros alimentos.

Productos comestibles listos para el consumo:

a) Productos comestibles procesados: productos modificados por la adición o introducción de sustancias (sal, azúcar, aceite, preservantes y/o aditivos) que cambian su naturaleza original, con el fin de prolongar su duración, hacerlos más agradables o atractivos. Ejemplo de éstos son las conservas en salmuera, en aceite tipo escabechados, fiambres resultantes de salazones o ahumados, quesos, etc.

b) Productos comestibles ultra-procesados: elaborados principalmente con ingredientes industriales, que normalmente contienen poco o ningún alimento entero. Por lo general se busca obtener productos con un lapso de aptitud prolongado, y atractivos al consumidor. La mayoría están diseñados para imitar caracteres organolépticos originales, por lo que en su formulación se utilizan gran cantidad de aditivos sintéticos. Muchos de estos productos ultra-procesados son resultado de tecnologías sofisticadas como procesos de hidrogenación, hidrólisis, extrusión, moldeado y remodelado, deshidratación, o procesos de pre-cocción como el marcado a fritura u horno. Ejemplo de éstos son los productos "instantáneos", sopas, cereales de desayuno, papas fritas, bebidas gaseosas, jugos, galletas, caramelos, mermeladas, salsas, helados, chocolates, fórmulas infantiles, postres, pasteles, productos "listos para calentar", y muchos otros tipos de productos de bebidas y "snacks", "nuggets" de pollo, palitos de pescado precocidos, salchichas, etc.

1.2 – IMPACTO EN LA SALUD

Las alergias e intolerancias alimentarias, constituyen un problema emergente de salud pública, habiéndose registrado en los últimos años un aumento

en la incidencia de estas patologías. Éstas, son un síndrome que comprende diversas entidades clínicas que afectan a diferentes sistemas y órganos, una respuesta fisiológica anormal del cuerpo ante la ingestión del alérgeno, por la pérdida de tolerancia hacia estas proteínas de la dieta.

Si bien en muchas ocasiones hablamos tanto de alergias como intolerancias como si fuesen una misma entidad, hay una diferencia concreta basada en los mecanismos involucrados. Entonces, definamos cada una de ellas para tener una idea clara, *alergia alimentaria*, es la respuesta anormal, directa, del sistema inmunológico al alérgeno. Dentro de este concepto se encuentran a su vez, *reacciones inmediatas* y *reacciones de efecto retardado*. En las primeras, la respuesta inmunológica hacia el alérgeno está mediada por Ig E y producto de esta interacción antígeno – anticuerpo, hay liberación de histamina, responsable de la mayoría de las manifestaciones sintomáticas en piel, respiratorias y del tracto digestivo. Las de efecto retardado, son las denominadas *intolerancias*, que involucran aquellas sensibilizaciones que no comprometen mecanismos inmunológicos.

La Academia Europea de Alergias e Inmunología Clínica (EAACI) propone una clasificación de las reacciones adversas basadas en los mecanismos de acción (Figura 1).

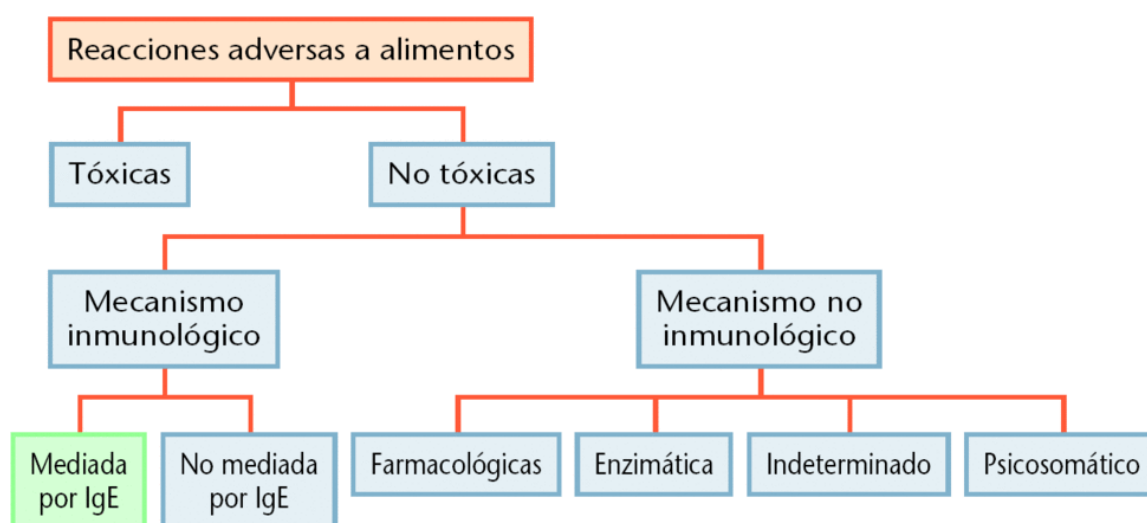


Figura 1: Clasificación de reacciones adversas a los alimentos. (Adaptado de la EAACI)

En todos los casos se trata de *reacciones adversas no tóxicas* en las que el cuerpo se activa en defensa frente a los antígenos dietarios. Como ya se mencionó,

compromete principalmente al tracto gastrointestinal, aunque también puede afectar la piel, árbol respiratorio o inclusive tratarse de un fenómeno sistémico conocido como anafilaxia. Se presenta mayoritariamente en edad pediátrica (5-6%) y en menor medida en adultos (1-4%). Las alergias alimentarias constituyen la primera manifestación de una alergia en un individuo susceptible. En estos casos se induce frente a las primeras exposiciones a los alimentos, razón por la cual la alergia a leche de vaca es la principal alergia alimentaria en numerosas regiones de todo el mundo, incluida Argentina. (Smaldini, Orsini Delgado, Fossati y Docena; 2014).

Se considera que los alérgenos alimentarios son glucoproteínas, que representan una pequeñísima parte del alimento, pero con un gran potencial biológico por lo que, mínimas cantidades son suficientes para desencadenar síntomas importantes. Los alérgenos pueden ser de origen vegetal o animal y si bien, cualquier alimento puede potencialmente ser alergénico, se han identificado 8 (ocho) como los responsables de producir el 90% de las reacciones alérgicas.

Estos alimentos constituyen el denominado grupo de los "Grandes ocho" y son: la leche y sus derivados, el huevo y sus derivados, el maní y sus derivados, el trigo y sus derivados, los frutos secos, la soja, los pescados y los mariscos (ver Figura 2). En Argentina los principales alérgenos alimentarios son la leche y el huevo.



Figura 2: El grupo de los "grandes ocho"
(Fuente: El País; 2019)

Dentro de otro tipo de reacciones adversas experimentadas por algunas personas, se encuentra las provocadas por la presencia de sulfito, utilizado habitualmente como aditivo tecnológico, siendo el responsable de reacciones mediadas por Ig E, principalmente en personas asmáticas. En el siguiente cuadro

se detallan los alérgenos mencionados y algunos de los alimentos que los contienen.

Cuadro 1: Principales alimentos alérgenos (Adaptado de Plataforma Alérgenos en Alimentos, 2013)

| ALERGENO | Ejemplo de Productos | Ejemplo de alimentos y/o ingredientes que podrían contenerlo |
|------------------------------|--|--|
| Trigo | Harinas, sémolas, gluten, fibra, salvado. | Pan, pastas, couscous, productos de papa tratados con trigo, sopas deshidratadas, galletitas, golosinas, alfajores y salsas. |
| Crustáceos y Moluscos | Langostinos, camarones, vieiras, calamar, pulpo, centollas, langostas y almejas. | Sopas y caldos, saborizantes, sándwiches, ensaladas y cazuelas. |
| Pescados | Pescados y derivados, gelatinas de pescado, proteínas de pescado. | Pescado curado, ahumado, enlatado, conservas, caviar, sopas y caldos de pescado, albóndigas de pescado, salsas, pasta de salmón. |
| Huevos | Huevo entero, yema, clara, ovoalbúmina, lisozima, lecitina de huevo, huevo en polvo. | Pastas, merengue, mayonesa, pintado para productos horneados, crema pastelera, flanes, rebozados, bizcochuelos, galletitas, panqueques, albóndigas, buñuelos, queso elaborado con lisozima. |
| Leche | Leche fluida, en polvo, crema de leche, manteca, leches cultivadas y fermentadas (yogur, kéfir, quesos), lactosuero, lactosuero en polvo, proteínas lácteas (caseína, caseinato, lactoglobulina, lactoalbúmina) y lactosa. | Todos los tipos de queso, crema chantilly, crema pastelera, helados, postres y flanes, chocolate, nougat, dulce de leche, algunos derivados cárnicos, margarinas, salsas y aderezos. |
| Maní | Maní salado, aceite de maní (no aplicable en caso de aceites muy refinados), harina de maní. | Manteca de maní, rellenos de repostería, maní con chocolate, praliné, granolas (mezclas de cereales) y turrone. |
| Soja | Porotos y brotes de soja, harina de soja, proteínas de soja, aislados, concentrados y texturizados de soja, lecitinas y proteína vegetal hidrolizada. | Tofu, salsas, caldos, margarina, chocolates, derivados cárnicos (como salchichas, hamburguesas, etc.), milanesa de soja, aliños para ensaladas, saborizantes. |
| Frutos secos | Almendras, avellanas, nueces, castañas de cajú, pecanes, nuez Brasil, pistachio, macadamia, etc | Pasta de nuez, turrone, coberturas para pastelería, mazapán, nougat, pasta de almendras, chocolates, golosinas, pesto, barras de granola, galletitas, panes y productos de gastronomía asiática. |
| Sulfitos | Sulfitos y metabisulfitos | Vino, azúcar, jugos de frutas, bebidas, aderezos, frutos deshidratados, vegetales de cuarta gama. |

1.3 – NECESIDADES DEL SECTOR INDUSTRIAL Y DERECHO DEL CONSUMIDOR

Dado que hasta la actualidad no existe una medida correctiva definitiva para las alergias, la única manera eficaz de prevenirlas es eliminando de la dieta de las personas sensibles, los componentes que desencadenan los efectos adversos, realizando lo que se denomina una dieta de exclusión.

Para ello, es necesario concientización y educación de todos los involucrados en la cadena alimentaria, las empresas del sector que deberán implementar políticas efectivas para la gestión de alérgenos y los organismos oficiales que deberán incluir en su atención, la vigilancia sobre el cumplimiento de la normativa

vigente para la rotulación de alimentos. El consumidor es el eslabón final de esta cadena y es de fundamental importancia que dispongan de toda la información necesaria sobre la composición de los alimentos que va a consumir, para poder realizar una elección adecuada de acuerdo a sus necesidades.

Aproximadamente el 50% de los pacientes con alergias alimentarias sufre reacciones accidentales cada 3-5 años por el contacto con productos alimenticios y no alimenticios que contienen al componente alergénico. Esto puede ser originado por distintas causas: contaminación del alimento con alérgenos (utensilios en restaurantes, durante la manufactura o procesamiento, etc.), desconocimiento de la presencia de un alérgeno en la composición del alimento (caseinatos indicando proteínas de la leche, ovomucoide para proteínas de huevo, emulsificantes para proteínas de soja, etc.), errores u omisiones en el etiquetado, etiquetado poco claro (emulsificante, espesante, saborizante, etc.), o por reactividades cruzadas con otros alérgenos que determinan que el sistema inmune reconozca a dos sustancias distintas como si fueran iguales o similares.

El 6 de octubre de 2010 fue publicada en el Boletín Oficial de la República Argentina la Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca que establecía la incorporación del Artículo *235 séptimo* al Código Alimentario Argentino (CAA) sobre la rotulación de alérgenos en alimentos. De acuerdo a esta Resolución pasarían a ser de declaración obligatoria los alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles. Los mismos deberían ser declarados a continuación de la lista de ingredientes del rótulo siempre que ellos o derivados de ellos estén presentes en los productos alimenticios envasados, ya sean añadidos como ingredientes o como parte de otros ingredientes. Los alérgenos contemplados comprenderían: cereales que contienen gluten: trigo, centeno, cebada, avena y sus variedades híbridas y productos de éstos; crustáceos y productos derivados; huevos y productos de los huevos; pescado y productos de la pesca; maní y productos derivados; Soja y productos derivados; leche y productos lácteos (incluida lactosa), frutos secos (almendras, avellanas, castañas, nueces, piñones, pistacho) y productos derivados; dióxido de azufre y sulfitos, y tartrazina.

Dicha resolución establecía que "*No se admite ninguna frase de advertencia que exprese o sugiera el posible o probable contenido de un alérgeno*". De acuerdo con la Resolución Conjunta N° 106-2011 y N° 297-2011 desde el 6 de junio de 2011 la aplicación de la Resolución Conjunta N° 57 y 548/2010 fue suspendida hasta que la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) elaborase una propuesta de adecuación del artículo 235 séptimo del CAA. En el año 2017 se modifica el Artículo 235 séptimo y entra en vigencia mediante la Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 11-E/2017, donde se otorga a las empresas, a partir del 09 de octubre de 2017 un plazo de trescientos sesenta y cinco días corridos para adecuar la información brindada en los rótulos según la presente normativa.

En productos procesados industrializados, la sustitución de determinadas materias primas, tanto de origen animal o vegetal, en alimentos para consumo humano por otras de menor valor comercial, constituye una adulteración que puede derivar tanto en un fraude comercial como en un riesgo para la salud del consumidor. Puede ser necesario tanto la verificación de su presencia o ausencia, o también los valores declarados en el etiquetado.

La identificación clara de la especie de la cual provienen los alimentos es muy importante y existen al menos tres razones para su justificación:

a) Evitar el fraude económico por sustitución o adulteración del producto, por ejemplo, aquellos elaborados con mezclas de carne donde se sustituye carne bovina por otra especie de menor valor como ingredientes de origen vegetal; así como el control de organismos genéticamente modificados, en productos rotulados como producción orgánica.

b) Requerimientos especiales, relacionados con aspectos de salud o de orden sanitario, como las reacciones adversas alimentarias, no tóxicas -ya desarrolladas anteriormente-entidad que ocurre en individuos susceptibles o que reaccionan ante ciertas proteínas de origen animal; tal como aquellos individuos intolerantes a la lactosa.

c) Por motivos religioso-culturales, especialmente presencia de carne de cerdo en productos cárnicos destinados a una comunidad específica, como la Halal o Kosher.

En enero del año 2013, los periódicos internacionales graficaron el escándalo producido en Europa en la oportunidad que la Autoridad en Seguridad Alimentaria de Irlanda - FSAI (del inglés Food Safety Authority of Ireland) reportó el hallazgo de ADN de carne de equino y de porcino en hamburguesas congeladas de cinco cadenas de supermercados con presencia en el Reino Unido e Irlanda. Se habían realizado ensayos en 27 productos diferentes, en 10 de ellos se detectó la presencia de ADN equino y en 23 de cerdo.

Si bien se determinó que este incidente y todos los controles posteriores que derivaron de éste, no revistieron riesgo para la salud humana, todos los productos analizados posteriormente como empanadas, lasañas y otros productos elaborados "listos para consumo" y congelados, que fueron confirmados, se retiraron del mercado. Algunos de estos alimentos se habían rotulado como "productos Halal", ley islámica que prohíbe estrictamente a los musulmanes, el consumo de carnes de cerdo.

Con el objetivo de valorizar y promover el reconocimiento de productos con calidad vinculada al origen, algunos países han desarrollado programas para la producción y comercialización de *alimentos de calidad diferenciada*.

1.3.1 - TRAZABILIDAD BASADA EN EL ADN

Como se ha mencionado previamente, garantizar la calidad de un producto, en la actualidad, es un requisito que el consumidor exige, autenticando el origen y la calidad del alimento. Internacionalmente, con el correr de los años, se han implementado procedimientos basados en un enfoque integral "desde el campo a la mesa" a lo largo de la cadena agroalimentaria con el objetivo de destacar marcas y procedimientos certificados que aumenten la garantía de calidad y seguridad alimentaria de los productos que llegan al consumidor.

Así, de este modo, llegamos al concepto de **trazabilidad** que el *Codex Alimentarius* define como “la capacidad para seguir el movimiento de un alimento a través de la(s) etapa(s) especificada(s) de la producción, transformación y distribución”, en otras palabras “se entiende como el conjunto de aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer el histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado, a través de herramientas determinadas” (2006).

Seguir el rastro de los productos desde sus orígenes hasta su consumo ayuda a mejorar la eficacia del sistema de control de inocuidad a lo largo de toda la cadena. De esta manera, si aparece un problema de seguridad alimentaria, se dispone de la información necesaria para proceder a su localización dentro del circuito, identificar las causas, adoptar las medidas correctoras y, si es necesario, retirar la partida del mercado.

Un buen sistema de trazabilidad debe permitir seguir el rastro de un producto, tanto hacia atrás como hacia delante, a lo largo de toda la cadena alimentaria, sobre todo en el caso de que se produzca alguna incidencia que afecte a la calidad o la seguridad del producto. Las alertas alimentarias surgidas en los últimos años han creado una gran sensibilización social ante la necesidad de consumir alimentos seguros. Esto se ha traducido en una estricta legislación, que impone el control y la trazabilidad en las etapas de producción, transformación y distribución de alimentos. La importancia que el consumidor da a este hecho hace que el cumplimiento de estas normas vaya más allá de las imposiciones legales y se convierta en un elemento de calidad y marketing que aporta valor diferencial a los productos.

Desde la incorporación del concepto, se han desarrollado distintos tipos de métodos de identificación según la industria ha requerido y que hoy forman parte de lo que podemos denominar “trazabilidad convencional”. La industria cárnica ha sido una de las pioneras utilizando para ello, caravanas, bolos ruminales, la documentación estricta de cada animal, código de barras, packaging, etc., siempre asociado a una base de datos completa y accesible, resguardada en el tiempo. En otro tipo de alimentos, pueden realizarse estudios a través de un conjunto de

características o propiedades comunes que conforman esos productos de una misma región como son los análisis de compuestos volátiles, flora microbiana, isótopos estables, etc.

Ejemplo de esto es el trabajo conjunto que se llevó a cabo en Córdoba entre el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), la Universidad Nacional de Córdoba (UNC) y el Centro de Proyectos y Procesos Córdoba (CEPROCOR), sobre la caracterización del *Maní de Córdoba*, para otorgarle a su producción y comercialización internacional, como valor agregado, la "Denominación de Origen Certificada" (DOC), basado en la determinación de la composición nutricional y el perfil sensorial del maní confitería. La utilización de metodología analítica fue complementando la información necesaria para conformar las bases de datos, con la aplicación de técnicas espectroscópicas (IR e ICP – MS).

La "trazabilidad no convencional", basada en el ADN como huella genética que puede compararse con un patrón de referencia, tiene como ventaja que está presente en todas las células, es inalterable a lo largo de la vida del organismo y se mantiene estable frente a los procesamientos a los que se someten a los alimentos.

Cuando se habla de rastreabilidad en carnes y derivados, no podemos dejar de mencionar que los refuerzos en las medidas para la identificación animal y la introducción de exigencias en la implementación de trazabilidad en la producción de carnes por parte de la Unión Europea (UE), estuvo estrechamente vinculado a la crisis de Encefalopatía Espongiforme Bovina (BEE) ocurrida a finales de la década de 1980 y principios de los 90, con inicios en Gran Bretaña, conocida internacionalmente como "el mal de la vaca loca", dada la sintomatología que presenta esta enfermedad neurológica que afecta a los bovinos. Dado que el mecanismo de contaminación es la alimentación de los animales con piensos, integrados por harinas de huesos y otros tejidos bovinos contaminados con el agente etiológico (prion o proteína priónica), la determinación e identificación a lo largo de toda la cadena de producción resulta fundamental en la garantía de inocuidad. Por esto, con el correr de los años, las reglamentaciones se han hecho extensivas a países exportadores que tienen como destino la Comunidad Europea.

El Reglamento (CE) N° 178/2002 (Parlamento Europeo, 2002) establece desde enero de 2005 la obligatoriedad de que todas las empresas alimentarias y de piensos dispongan de un sistema de trazabilidad que permita garantizar la seguridad de los productos comercializados. Además, como medida preventiva de la propagación de la enfermedad, la prohibición de alimentar a rumiantes y otros animales de abasto con materias primas derivadas de animales. Esto ha potenciado la búsqueda y desarrollo de técnicas analíticas que permitan la detección e identificación de tejidos animales en piensos.

Se puede mencionar otro claro ejemplo como es la cadena de producción de aceite de oliva en la que, como complemento en la implementación de trazabilidad, surge la utilización del análisis de ADN que consta de dos fases: una primera etapa de amplificación de ADN por PCR, y una segunda etapa de separación o análisis de los fragmentos de ADN, obtenidos mediante el uso de biochips, que son pequeñas plaquitas donde se alojan fragmentos de ADN de interés, esto es que están presentes las variaciones denominadas SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) que resultan diferencias muy sutiles capaces de caracterizar el varietal de un olivo. De los resultados de algunos trabajos revisados, surge que las cantidades de ADN obtenidas del aceite de oliva son muy pequeñas y que además se encuentra muy fragmentado. Cada aceituna proviene de la fusión de dos gametos por lo que el aceite contiene ADN muy heterogéneo; por esto, cuáles sean los marcadores elegidos se hace imprescindible contar con una base de datos que incluya la caracterización de la amplia variedad de cultivares.

Con el objetivo de la determinación del origen geográfico de la miel, algunos grupos de investigación han trabajado en definir el protocolo de obtención de ADN que luego pueda ser utilizado en la aplicación de esta tecnología molecular. Los métodos más utilizados de rutina con esta finalidad son el análisis palinológico-análisis del polen y de las propiedades físico químicas de la miel-, métodos cromatográficos u observación directa del comportamiento de las abejas. Aunque frente a la mayor sensibilidad, simplicidad, rapidez y confiabilidad, el uso de herramientas basadas en la extracción y amplificación del ADN obtenido ha ido ganando terreno. Se han reportado la eficiente identificación de mieles multi y

monoflorales evidenciando que el uso de la PCR es una buena alternativa a los métodos tradicionales.

Similar a la necesidad de identificación de procedencia en la miel, es ampliamente conocido en la industria vitivinícola que, según las variedades de vid utilizadas para producir los mostos, son las características finales a los vinos. Con el transcurso de los años la producción de vinos se ha diversificado mientras que se intentan proteger variedades tradicionales. Por lo tanto, la identificación de las variedades utilizadas en la elaboración de los vinos, ya sean monovarietales o mezclas, es de suma importancia. Esta diferencia en el valor comercial que alcanzan determinadas variedades ha conducido a la industria vitivinícola a la búsqueda de métodos más precisos de identificación. Aquellos productos, elaborados y registrados respectivamente como "Denominación de Origen" están legislados celosamente en cuanto a su composición y etiquetado, por lo que cada país debe controlar las variedades utilizadas para asegurar la calidad del producto.

Con el uso la biología molecular, se desarrollaron marcadores como los microsatélites (SSR) que, al ser muy numerosos, polimórficos y estar dispersos en el genoma en número variable de repeticiones, generan mucha información y son fácilmente detectables por PCR. Los microsatélites ya están siendo utilizados en la identificación de las variedades de vid de varias colecciones españolas.

1.3.2 - IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

En los últimos años, el interés por el control de los alimentos en cuanto a la identificación de las especies que los conforman, sean de origen animal o vegetal, tendiente a evitar fraudes, ha ido en incremento de la mano de la diversidad y disponibilidad de alimentos, principalmente de los industrializados.

En capítulo I, el C.A.A. define:

Art. 7 - Alimento *adulterado*: "El que ha sido privado, en forma parcial o total, de sus elementos útiles o característicos, reemplazándolos o no por otros inertes o extraños; que ha sido adicionado de aditivos no autorizados o sometidos

a tratamientos de cualquier naturaleza para disimular u ocultar alteraciones, deficiente calidad de materias primas o defectos de elaboración”.

Art. 8. *Alimento falsificado: "El que tenga la apariencia y caracteres generales de un producto legítimo protegido o no por marca registrada, y se denomine como éste sin serlo o que no proceda de sus verdaderos fabricantes o zona de producción conocida y/o declarada”.*

De estas dos definiciones, se desprende que la sustitución o eliminación de un ingrediente en la composición del alimento, sin que el consumidor sea informado, o una rotulación engañosa sobre su procedencia, constituye parte de las acciones fraudulentas más frecuentes, siempre con un fundamento de tipo económico.

De este modo se han realizado estudios de tipificación de especies, en distintos países, por ejemplo en productos de carne vacuna para la detección de carne de pollo, donde los resultados mostraron que el 94.4% de un total de 90 muestras de hamburguesas contenían carne de pollo (Mehdizadeh *et al*, 2014). Se ha estudiado la eficiencia de la técnica de PCR para detectar adulteración por agregado de leche de origen bovino a quesos elaborados con leche de búfala. Los resultados concluyeron que el 13.6% de las muestras colectadas de quesos disponibles comercialmente en la región objetivo de este estudio, contenían leche bovina (Silva *et al*, 2015).

1.4 –ALGUNOS ANTECEDENTES ANALÍTICOS

La emergencia de la biología molecular ha dado lugar a nuevas herramientas que se han adaptado rápidamente al campo del control de calidad e inocuidad de productos alimenticios. Se han desarrollado múltiples métodos analíticos basados en la detección de dos tipos de macromoléculas: proteínas y ADN.

El ADN es una molécula termoestable y, aunque se degrada durante el proceso de transformación (fragmentación del ADN), los fragmentos generados siguen siendo informativos. Es importante destacar que en muchos de los procesos

de elaboración, los alimentos son sometidos a altas temperaturas y presiones elevadas, por ello se producen fragmentos de entre 100 y 250 pares de bases (pb) aproximadamente. Las proteínas, en cambio, se desnaturalizan, impidiendo su utilización para las técnicas moleculares basadas en ellas.

La concepción de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) a principios de la década de 1980, por el Dr. Kary Mullis - por lo cual obtuvo el Premio Nobel de Química en el año 1993-, produjo una revolución tecnológica permitiendo obtener cantidades ilimitadas de ADN específico y se ha convertido con los años, en una técnica de gran versatilidad en el desarrollo de nuevas aplicaciones.

En la actualidad, la PCR Tiempo Real (qPCR) es una de las variantes más utilizadas por su sensibilidad para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos; aun partiendo de una cantidad muy pequeña de ADN, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Higuchi y colaboradores, en 1992, experimentaron y sentaron las bases para desarrollar esta técnica, al grabar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN, siguiendo la cinética de la reacción, durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV.

Con los años, las mejoras de la técnica y del equipamiento han tenido el mismo objetivo, detectar y cuantificar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El SYBR-Green I fue el primer y más utilizado fluoróforo específico en la qPCR, ya que se une con gran afinidad al surco menor del ADN bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. La detección con SYBR-Green I es tan sensible que llega a identificar la producción de una única molécula. Este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos que luego el fluoróforo detectaría, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados. Se desarrollaron fluoróforos superadores en cuanto a estabilidad y sensibilidad como por ejemplo el Eva Green, reportando mejores resultados en cuanto a la prestación que el SYBR Green, por lo que en la actualidad es de vasta utilización (Wang *et al*, 2006).

Las principales ventajas de las técnicas moleculares son la mayor estabilidad de la molécula de ADN frente a los tratamientos térmicos y que el resultado no depende del tejido analizado, ya que todas las células del organismo poseen la misma información genética.

Los métodos más empleados, por ejemplo, para la identificación de especies animales en carnes y productos cárnicos procesados, se basan en el análisis de proteínas mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas e inmunológicas; y en el análisis de ácidos nucleicos utilizando PCR y qPCR (del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*), que permiten la amplificación in vitro de secuencias específicas de nucleótidos por medio de iniciadores.

La puesta a punto de métodos moleculares rápidos y robustos que permitan la identificación de diferentes especies animales es de gran interés para la detección de adulteraciones y/o productos incorrectamente rotulados, tal como fue mencionado en secciones anteriores.

En el marco del Proyecto "Mejora de las Economías Regionales y Desarrollo Local en la República Argentina" (2014), los doctores Popping B. y Díaz Amigo C. en colaboración con el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de nuestro país realizaron un entrenamiento técnico casi exclusivamente en técnicas de PCR, con la finalidad de transferir conocimiento que sea replicable y de fácil implementación. Propusieron tres temáticas a desarrollar: alérgenos presentes en alimentos, Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y Fraude e identificación de carnes de especies animales. Trabajaron en el desarrollo de protocolos de extracción de ADN basados en el método del Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB).

Con similares objetivos generales y/o ensayos aplicados al presente trabajo, otros grupos de investigación han descrito, la comparación de seis métodos de extracción cruda de ADN con la finalidad de seleccionar un método rápido y de costo bajo para amplificar fragmentos de ADN genómico de la broca, plaga de mayor importancia en el café colombiano, mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. Las técnicas de extracción convencionales con el kit comercial DNeasy Tissue Kit (Qiagen) y el método convencional orgánico fenol-cloroformo, que

incluyeron purificación de ácidos nucleicos, fueron las únicas técnicas que presentaron bandas de alto peso molecular, que indican ADN de alta calidad, mientras que con los otros métodos se observó la presencia de ADN degradado (Acevedo Bedoya F. *et al*– 2007).

En el afán de desarrollar métodos eficientes y confiables para la detección de alérgenos en ingredientes, López Callejas *et al.*, 2013 trabajaron sobre la presencia de avellanas en productos comerciales de matrices variadas, usando qPCR específico de avellana basado en el marcador ITS (70 pb) y una sonda TaqMan marcada con FAM y BHQ.

1.5 –DESDE EL INICIO: LO FUNDAMENTAL

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular que hemos mencionado anteriormente y de todas las técnicas de recombinación de ADN. En este caso, los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes, en este estudio partiendo de una matriz alimentaria, para después realizar análisis específicos mediante la PCR. La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis, de gran impacto en la confiabilidad de los resultados.

Cuando se habla de extracción, se refiere al aislamiento y purificación de moléculas de ADN, procedimiento basado en el aprovechamiento de las características físico - químicas de la molécula, como la alta polaridad conferida por su carga neta negativa. La repulsión entre los grupos fosfatos permite disolver el ADN en soluciones acuosas, formando una capa hidratante alrededor de la molécula, que luego en presencia de etanol se rompe, dejando expuestos los grupos fosfatos. En este contexto se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (Figura 3).

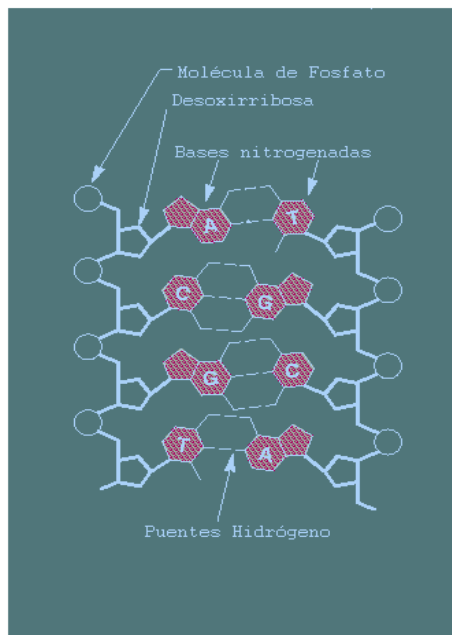


Figura 3: Esquema de la estructura del ADN (Adaptado de www.biblioteca.org)

Con el transcurso de los años, se ha trabajado en el diseño de protocolos de extracción con el objetivo de lograr cantidad y calidad adecuada de ADN, garantizando también la eliminación de moléculas inhibitoras que interfieran u obstaculicen en un posterior tratamiento del ADN o que induzcan a resultados falsos negativos, subestimando la cantidad de ADN aislado.

Comúnmente, se conocen las sustancias inhibitoras presentes en muestras como sangre, tejidos y suelo, tales como hemoglobina, lactoferrina, mioglobina, polisacáridos, proteinasas, calcio iónico, entre otros. Otras fuentes importantes de inhibidores son los materiales y reactivos que toman contacto con las muestras durante el proceso de extracción y purificación de ADN. En ellos se incluyen sales como NaCl, acetato de Na; detergentes iónicos utilizados en la etapa de lisis celular como el SDS (dodecilsulfato sódico), etanol e isopropanol, fenol, etc., según el protocolo elegido. En alimentos y especialmente en aquellos ultraprocesados, esta identificación de compuestos inhibitoros no resulta una tarea tan sencilla dada la complejidad de los mismos.

Las sustancias inhibitoras, generalmente, ejercen su acción interactuando con el ADN mono o bicatenario y/o interfiriendo con la estabilidad de la ADN

polimerasa, bloqueando la actividad de la enzima. El target del inhibidor puede ser la disminución de la disponibilidad del magnesio (Mg^{2+}), cofactor necesario en la reacción, o que interfiera en la unión de éste con la ADN polimerasa.

La aplicación de técnicas moleculares como la PCR y resultados confiables depende en gran medida de la etapa inicial de extracción del ADN. En términos generales, la extracción se compone de tres fases:

1. Disrupción de paredes y membranas celulares que permiten la liberación del ADN, en una fase acuosa que luego es separada de los restos celulares por centrifugación.

2. Eliminación de proteínas y otros componentes celulares, que son removidos de la fase acuosa con solventes orgánicos (fenol, cloroformo).

3. Limpieza y purificación del ADN, que permanece en la fase acuosa, precipita junto al etanol y posteriormente es purificado y suspendido en un buffer adecuado.

Por lo tanto, en los diferentes **protocolos tradicionales** se pueden visualizar estas etapas básicas:

- Homogeneización de la muestra
- Lisis celular
- Separación de proteínas y lípidos
- Precipitación del ADN
- Recuperación del ADN

1.5.1 - HOMOGENEIZACIÓN DE LA MUESTRA

La homogeneización, sea mecánica o química, tiene por objetivo disgregar físicamente la matriz de la muestra, rompiendo las uniones entre células, facilitando la posterior interacción con las soluciones de lisis que colaboran en la liberación del material genético.

Los métodos mecánicos consisten, por ejemplo, en molinillos (similares a los de café), uso de perlas de acero con Vortex, maceración con nitrógeno líquido en mortero pulverizando con pilón, etc. El congelamiento inmediato con el nitrógeno líquido evita la formación de cristales en el interior celular, rompiendo la estructura que deviene en el inicio de la degradación de ADN. En el caso de la utilización de agentes químicos, la muestra se incubaba a altas temperaturas en presencia de detergentes, digestión enzimática (proteasas) y agentes caotrópicos; esta variante es de elección para muestras con matrices blandas.

1.5.2 - LISIS CELULAR

En la etapa anterior comienza la modificación o destrucción de las interacciones moleculares que forman la pared y las membranas celular y nuclear, permitiendo la liberación de los ácidos nucleicos. En esta fase de lisis, esta ruptura se completa mediante el uso de detergentes que solubilizan los restos de membranas celulares, con agentes caotrópicos que tienen por objetivo inactivar las enzimas intracelulares que degradan el ADN.

El bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) es un detergente catiónico muy utilizado por sus propiedades para precipitar los ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos, en soluciones de baja fuerza iónica. En estas condiciones, proteínas y polisacáridos neutros permanecen en solución. En soluciones de mayor fuerza iónica, el CTAB acompleja con las proteínas y polisacáridos ácidos sin precipitar los ácidos nucleicos, por lo tanto, el CTAB es principalmente utilizado para la purificación de ADN en muestras con gran cantidad de polisacáridos como las de origen vegetal. Este protocolo fue desarrollado por Murray y Thompson en 1980, y posteriormente publicado por Wagner y colaboradores en 1987.

Otros agentes utilizados para la desnaturalización de proteínas y otros residuos celulares, en esta parte del proceso, son el tiocianato de guanidina y el dodecilsulfato sódico (SDS). Algunos autores, inclusive, informan la utilización de una combinación de ellos como por ejemplo el CTAB con el polivinilpirrolidona (PVP) con el objetivo de complementar la ruptura celular.

Muchas soluciones de lisis, generalmente contienen ácido etilendiaminotetracético (EDTA) que forma complejo con iones metálicos como el Mg^{2+} , favoreciendo la inactivación de las ADNasas.

1.5.3 - SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS

Lo descrito hasta aquí, es parte del procedimiento común tanto para protocolos tradicionales como kits comerciales. Ahora, la separación de proteínas y lípidos se logra mediante una combinación de etapas de extracción en solventes orgánicos – generalmente en una mezcla de fenol: cloroformo y alcohol isoamílico- y ciclos de centrifugación. Por ejemplo, en el protocolo tradicional del CTAB, la mezcla de solvente remueve el complejo formado por el CTAB/ proteínas/ polisacáridos, además de los lípidos, mientras que los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa que luego será separada por los sucesivos ciclos de centrifugación.

La inclusión de PVP fue con el objetivo de inhibir las enzimas oxidasas intrínsecas, que generan compuestos secundarios a partir de los fenoles y polifenoles presentes en la matriz, que oxidan al ADN; y el aumento en el contenido de EDTA para capturar los iones metálicos divalentes necesarios para el funcionamiento de ADNasas. Estas modificaciones en la solución de lisis, contribuyen a acondicionar estos protocolos para la extracción de matrices complejas como son los alimentos ultraprocesados (Di Pinto *et al*, 2005).

Cuando se trata de protocolos comerciales (combos o kits disponibles comercialmente), se hace referencia a procedimientos fundamentados en alguna de las siguientes técnicas o una combinación de ellas: unión a membrana por afinidad, cromatografía en mini columnas, separación magnética por afinidad, adsorción selectiva, etc.

En el caso de los kits basados en una membrana de sílice, diseñada y seleccionada para este propósito y a la cual se le añade un buffer de unión/etanol, que genera las condiciones óptimas para que se produzca la unión del ADN contenido en la solución acuosa al pasar por la membrana; se elimina la capa

hidratante del ADN dejando expuestos sus grupos fosfatos, situación que favorece la unión de la molécula a la membrana cargada positivamente. Los restos de residuos celulares son eliminados mediante lavados sucesivos y ciclos de centrifugación.

En la separación magnética por afinidad se utilizan partículas o microesferas magnéticas cuya superficie está recubierta con polímeros naturales o sintéticos que presentan una alta afinidad por los ácidos nucleicos. Las esferas magnéticas se añaden al lisado de la muestra lo que permite su unión a las moléculas de ADN. Cuando se sitúa un imán o magneto en la pared del tubo, éste permite el agrupamiento en dicha pared de las esferas con el ADN unido, mientras que los contaminantes de la muestra en solución son eliminados por pipeteo o decantación.

1.5.4 - PRECIPITACIÓN DEL ADN

Luego que son eliminados lípidos, polisacáridos y proteínas, es necesario recuperar el ADN. La precipitación con etanol o isopropanol se utiliza para la concentración y desalinización de los ácidos nucleicos en solución, favorecen la reducción de las fuerzas de repulsión intercatenarias, lo que permite que el ADN se repliegue haciéndose insoluble. El ADN es menos soluble en isopropanol por lo que utilizando este solvente precipitará antes y en menor concentración, pero con el inconveniente de que las sales precipitarán al mismo tiempo. Si se utiliza etanol en este paso, al ser mucho más soluble en este medio, el ADN deberá estar en una mayor concentración para que tienda a precipitar, aunque con la ventaja que las sales permanecerán en solución aún a bajas temperaturas. En pasos posteriores de lavado con etanol al 70% y centrifugación, se obtiene el ADN extraído.

En los protocolos comerciales, esta etapa no se lleva a cabo ya que el ADN se encuentra adsorbido a la matriz inorgánica, ya sea de la membrana de sílice o a las micro-esferas magnéticas. Por esto, en este caso, se debe proceder a recuperar la molécula desde dicha matriz utilizando un buffer adecuado para su conservación posterior.

1.5.5 - RECUPERACIÓN DEL ADN

Lo siguiente es rehidratar el ADN para mantenerlo en solución; para ello se usa buffer Tris/HCl 5mM pH 8.5, también agua deionizada a la que se le ajustará el pH entre 8 – 8.5 ya que ésta usualmente registra valores por debajo de 7. Además, la adsorción de CO₂ conduce a una disminución del pH en soluciones no amortiguadas. La solución amortiguadora más utilizada para la conservación del material es Tris-HCl 10mM y EDTA 0.1M a un pH de 8.0 (solución TE). Cuando se disuelve el ADN precipitado es importante evitar una agitación agresiva que pueden fragmentar el material extraído.

En los kits, mediante una incubación del buffer en la membrana de sílice, permite la hidratación de la molécula que luego es recuperada por centrifugación. Para las partículas magnéticas, el pH del buffer tiene la función de neutralizar las cargas de éstas, separando el ADN mientras que las partículas quedan adheridas al tubo por acción del magneto, facilitando la recuperación del mismo.

1.6 –LO QUE SIGUE: ESTIMACIÓN DEL RENDIMIENTO

1.6.1 - ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA

Indistintamente de la metodología optada, sea convencional o comercial en sus variantes disponibles, una vez extraído el ADN es importante determinar el rendimiento de la reacción. Esto puede valorarse por espectrofotometría; la ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260nm y permite estimar su concentración. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN es de 1cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50µg/ml.

$$\text{ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{Abs}_{260} \times \text{FD} \times 50) / 1000$$

Dónde:

Abs_{260} : absorbancia de la muestra a 260nm

FD: factor de dilución de la muestra

50: factor que indica que una absorbancia de 1.0 corresponde a 50 μ g/ml

1000: factor de conversión de ml a μ l

Las longitudes de onda que se utilizan para evaluar la pureza relativa y la concentración de una muestra de ADN son 260nm y 280nm. Las proteínas absorben luz UV a 280nm, debido en gran parte al anillo aromático del triptófano, la fenilalanina y la tirosina. Un ADN puro en relación A_{260}/A_{280} es de aproximadamente 1.8; si hay proteínas presentes, el valor será menor y si hay ARN, la relación será mayor a 2.0. Entonces, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor a 2.0 estaría indicando la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol.

Con el similar fundamento de la espectrofotometría U.V, pero en este caso específicamente para micro-volumen, se utiliza un instrumento NanoDrop. Este equipo permite realizar medidas de espectrofotometría en un amplio rango de longitudes de onda (220-750nm) con gran exactitud y reproducibilidad, sin necesidad de emplear cubetas. Tan sólo requiere un volumen de muestra de 1-2 μ l y gracias a su pequeño tamaño y fácil manejo permite medir un gran número de muestras en poco tiempo. Su funcionamiento se basa en el empleo de un sistema de retención de muestra que aprovecha la tensión superficial para formar un puente de líquido entre el pedestal inferior y un pedestal superior. En los espectrofotómetros NanoDrop, el pedestal superior es el extremo de una fibra óptica conectada a una fuente de emisión de xenón. Ambos pedestales definen un preciso y estrecho paso óptico cuya longitud varía automáticamente con la concentración de la muestra, permitiendo hacer mediciones en un rango muy amplio de concentraciones sin hacer diluciones. Esta característica lo hace idóneo para determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos.

1.6.2 – ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa es un método simple, pero muy efectivo, de separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN genómico en un rango de tamaño entre 0.5 y 25kb. Es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los soportes comúnmente utilizados son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa.

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de 50pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50pb hasta unas 40kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.8-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa.

La función de los geles es la de un tamiz molecular que permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, van a desplazarse de forma distinta en un gel de electroforesis. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en una solución tampón de pH alrededor de 8 como puede ser el TAE (Tris – Acetato – EDTA) o TBE (Tris – Borato – EDTA). El TAE tiene una menor capacidad de amortiguación que el TBE, y puede resultar en una acidificación del medio si la electroforesis se desarrolla durante un periodo muy prolongado, pero funciona muy bien con tiempos normales de electroforesis, de aproximadamente una hora, además tiene una mayor capacidad de resolución que el TBE para tamaños grandes de ADN. De esta forma, las moléculas de ADN o ARN sometidas a electroforesis migrarán al polo positivo ya que a $\text{pH} > 5$ poseen carga negativa. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema. Una vez finalizada la corrida, puede visualizarse el gel con una lámpara de luz UV, donde se verán las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular. Para que esto sea posible es necesario añadir bromuro de etidio (BrEt),

sustancia que se intercala entre las bases del ADN y que fluoresce cuando se somete a luz UV.

Los protocolos habituales para esta técnica, describen tres pasos generales y a su vez importantes:

- a) Preparación del gel, utilizando una concentración de agarosa que sea apropiada al tamaño de fragmentos de ADN que se quiere separar.
- b) Separación; el ADN de las muestras se coloca en los pocillos del gel y sobre éste, se aplica un voltaje definido por un periodo de tiempo, en el que se logrará una separación óptima.
- c) Revelado; luego de finalizada la corrida, el gel se tiñe por inmersión en un buffer de corrida con bromuro de etidio, o bien se añade al momento de la preparación del gel. En ambos casos, la concentración final del BrEt en el gel o en la solución de teñido debe ser de 0.5µg/ml.

1.7 – REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: AMPLIFICACIÓN

En secciones anteriores se han expuesto las ventajas y avances ocurridos a partir del desarrollo de esta técnica en el ámbito de la biología molecular, por lo que corresponde hacer un breve repaso sobre las condiciones de la reacción y lo que sucede en el paso a paso.

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante los ciclos que dure la reacción, en los que la secuencia blanca es copiada fielmente. Esta reacción se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Cuando se habla de una típica PCR, se utiliza como sustrato ADN genómico como molde (templado), la enzima, los oligonucleótidos o primeros, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora o buffer y agua. Todos estos elementos interactúan en las tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Figura 4).

La reacción se lleva a cabo en un termociclador, que ha sido diseñado para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa.

A lo largo del tiempo se han generado numerosas variantes de la PCR que permiten abordar diferentes estrategias experimentales, una de estas es la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10⁷ equivalentes genómicos de la secuencia blanco) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior.

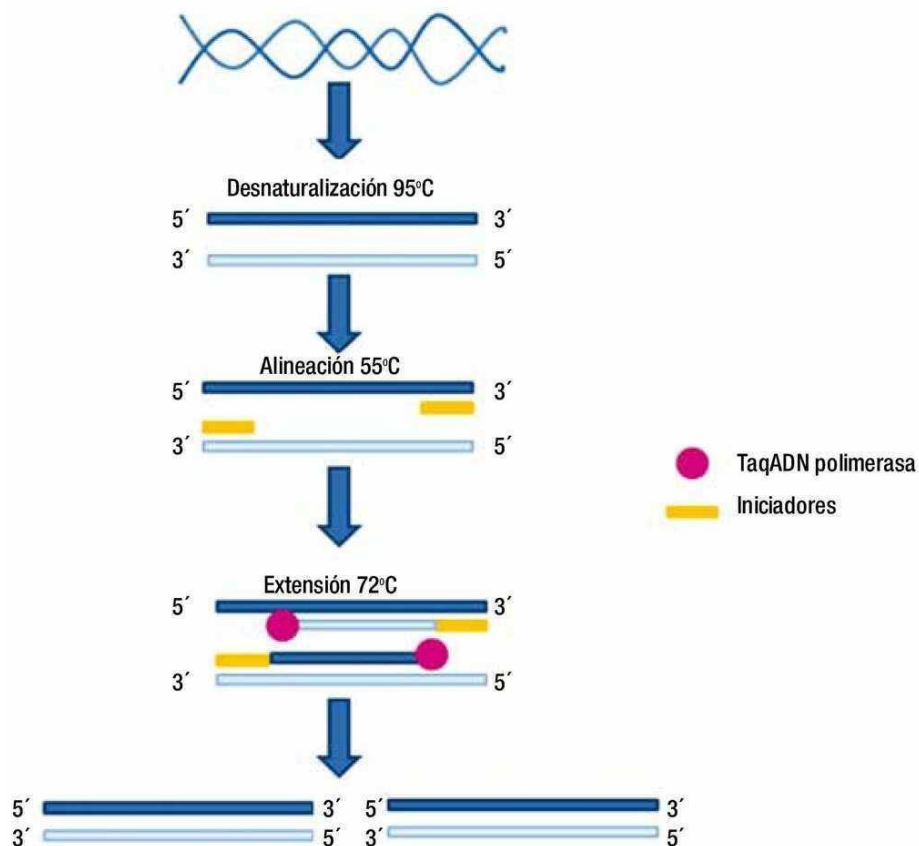


Figura 4: Esquema general de las etapas de la PCR (modificado de www.elsevier.es)

Haciendo uso de un agente intercalante fluorescente como el Eva Green, por ejemplo, cuya fluorescencia aumenta proporcionalmente con el aumento en la cantidad de ADN, permite cuantificar simultáneamente el número de copias que se están generando en cada ciclo de amplificación.

La principal ventaja de la qPCR es que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final.

Hay diferentes estrategias que utilizan la fluorescencia para medir la cinética del PCR; los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos:

a) fluoróforos con afinidad por el ADN, que aumentan su emisión cuando se unen a ADN doble cadena; tienen la ventaja de poder utilizarse en cualquier tipo de reacción y su bajo costo, pero la desventaja de ser inespecíficos (Figura 5). Anteriormente se mencionó que los más utilizados son el SYBR Green y el Eva Green.

b) sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (blanco). Este sistema de detección se puede clasificar en Sondas de hidrólisis, de hibridación o de horquilla. Todas se basan en el principio Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET - del inglés Fluorescence Resonance Energy Transfer), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o quencher), los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el aceptor absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando este par de moléculas se separa, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector. Esto sucede porque cuando la sonda hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el quencher, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Estos

métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan, aunque existen otras que pueden diseñarse según lo requerido.

Cualquiera de los métodos que se utilicen para detectar los productos amplificados en cada ciclo de la reacción, necesita de la tecnología incluida en los termocicladores de qPCR para excitar al reportero, capturar la señal de emisión del fluoróforo y realizar el análisis cuantitativo.

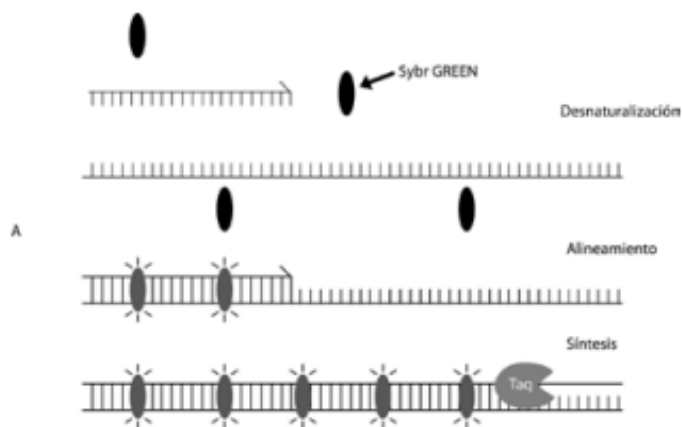


Figura 5: Mecanismo de incorporación del SYBR Green en la doble cadena en la etapa de alineación; la señal de fluorescencia incrementa de manera proporcional a las moléculas de doble cadena producidas durante la amplificación (modificado de <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-TheHandbook.html>).

Luego, para analizar los resultados, el software que trabaja con el termociclador, genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la de amplificación (Figura 6) que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de disociación o curva melting, que muestra información sobre la especificidad de la reacción (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

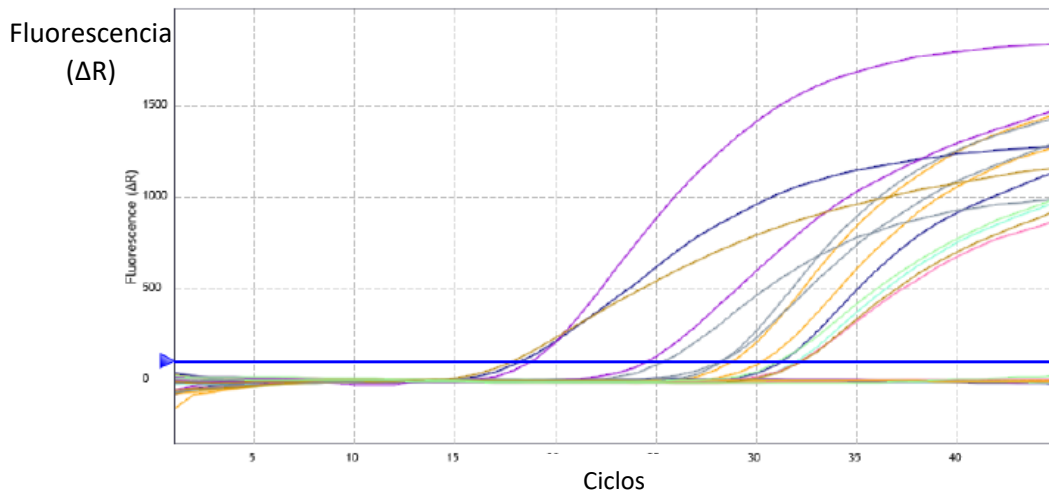


Figura 6: Curva de amplificación, se detecta en cada ciclo de reacción midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN.

1.8 – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.8.1 – HIPÓTESIS

La estandarización y optimización en la metodología de extracción y purificación de ADN presente en los diferentes grupos de alimentos, permitirá obtener material de calidad, cantidad y pureza, acorde al uso de herramientas de biología molecular en la industria alimentaria, como la técnica de PCR Tiempo Real.

1.8.2 – OBJETIVO GENERAL

Explorar y valorar metodologías de extracción y purificación de ADN para diversas matrices de alimentos, mediante la comparación de kit comerciales y la técnica estándar del CTAB con introducción de modificaciones halladas en la revisión bibliográfica.

1.8.3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar matrices de alimentos de acuerdo a su composición y/o proceso y determinar su pre-tratamiento para luego ser sometidos a la metodología de extracción.
- Evaluar los métodos seleccionados de extracción y purificación de ADN: CTAB (con sus modificaciones), Nucleo Spin Food (Macherey – Nagel) y Wizard Magnetic DNA Purification System for Food (Promega).
- Valorar la eficiencia de extracción mediante la determinación de la concentración de ácidos nucleicos por espectrofotometría UV y la calidad en geles de agarosa.
- Determinar las matrices de alimentos para los cuales es necesario un desarrollo metodológico específico.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MUESTRAS DE ALIMENTOS

Se seleccionaron dieciocho alimentos envasados, principalmente ultra procesados, de distinta naturaleza y con diferente grado de complejidad de proceso durante su elaboración como cocción, deshidratación, fermentación, etc. Así mismo se evaluó su rotulación, las expresiones de declaración de alérgenos, ingredientes, dando relevancia a la posibilidad de contaminación cruzada durante las etapas de producción.

En el cuadro 2, se resumen los alimentos seleccionados y parte de la información declarada en los rótulos respecto de su composición.

Cuadro 2: Alimentos utilizados en el estudio y sus referencias de la rotulación.

| Alimento | Ingredientes | Advertencia |
|---|---|--|
| Polvo para preparar flan de chocolate | Azúcar, cacao en polvo, maltodextrinas, sal, gelificante carragenina, edulcorante no nutritivo: acesulfame k, aromatizante vainillina. | Este producto se procesa en un equipo que procesa leche |
| Biscochos cuadraditos agridulces. Galletas dulces | Harina de trigo, oleomargarina, azúcar, sal, harina de malta, levadura, emulsionante lecitina. | Contiene: trigo, gluten, cebada y soja. |
| Miel de abejas | Miel de abejas | Sin referencias |
| Galletitas sabor pizza con queso: Snacks horneados (galletitas saladas) | Harina de trigo enriquecida, grasa bovina, azúcar, jarabe de glucosa, tomate deshidratado, queso en polvo, extracto de malta, aceite de girasol alto oleico, sal, orégano, leudantes químicos: bicarbonato de sodio, bicarbonato de amonio, emulsionante lecitina de soja, aromatizantes. | Contiene: trigo, gluten, leche, cebada, soja, trazas de almendras, avena, centeno, huevo, maní y sésamo. |
| Alimento infantil de trigo y miel | Harina de trigo, azúcar, miel, fosfato disódico, carbonato de calcio, vitaminas y minerales (A, D, E, C, niacina, pantotenato de calcio, B1, B6, ácido fólico, biotina, sulfato de zinc), fumarato ferroso, cultivos bifidus (bifidobacterium lactis), aromatizante vainillina). | Contiene: derivados de trigo. Puede contener leche y derivados de soja. |

| | | |
|--|---|--|
| Galletas de chocolate con semillas de sésamo, amaranto y girasol | Harina de trigo enriq., azúcar, aceite de girasol alto oleico, almidón de maíz, avena arrollada, jarabe de maíz, semillas de girasol, leche en polvo descremada, semillas de amaranto, semillas de sésamo, sal, regulador de acidez bicarbonato de sodio, leudante químico bicarbonato de amonio, saborizante/aromatizante permitidos, antioxidante tocoferoles. | Contiene: trigo y leche. |
| Caldo de verduras deshidratado | Sal, grasa vegetal, azúcar, almidón de maíz, aceite de palma (con antiox BHA y BHT), perejil, apio, pimiento rojo, puerro, pimienta, resaltadores del sabor (glutamato monosódico, inosinato de sodio), colorante cúrcuma y caramelo, aci: ácido cítrico, aromatizantes. | Contiene: apio. Puede contener: derivados de trigo, huevos, leche, soja y mostaza. |
| Budín sabor a vainilla con chips de chocolate | Harina de trigo enriq., azúcar, huevos, oleomargarina bovina, aceite de girasol, chips de chocolate, jarabe de maíz, RAI: bicarbonato de sodio, bicarbonato de amonio, HUM: sorbitol, suero de queso, EMU: mono y diglicéridos de ácidos grasos, sal, CONS: sorbato de potasio y propionato de calcio, esencia artif. De vainilla. | Contiene: trigo, huevo y suero de queso. |
| Queso brie | Leche estandarizada de vaca, cuajo bovino, cloruro de calcio, cloruro de sodio, fermentos lácticos, penicilium camemberti. | Sin TACC |
| Alfajor con cobertura blanca | Dulce de leche 34% (leche entera, azúcar, jarabe de glucosa, humectante sorbitol, estabilizante alginato de sodio, carragenina, agar, conservador sorbato de potasio, aromatizante), harina de trigo enriq., azúcar, grasa bovina, aceites vegetales interesterificados y fraccionados de palma y girasol, jarabe de maíz de alta fructuosa, suero de queso en polvo, cacao en polvo, almidón, sal, leudantes químicos bicarbonato de sodio, bicarbonato de amonio, emulsionante lecitina de soja, conservador propionato de calcio, colorante dióxido de titanio, aromatizantes artificiales vainillina, etilvainillina y aroma naranja. | Contiene: trigo, gluten, leche, soja, trazas de almendras, cebada, centeno, huevo, maní, y sésamo. |

| | | |
|---|--|--|
| Chocolate (para taza) | Azúcar, masa de cacao, manteca de cacao, emulsionante lecitina de soja, poliglicerol, polirricinoleato, aromatizante artificial a vainilla. Cacao 45%. | Contiene: soja y trazas de gluten, leche, maní y almendras. |
| Yogur | Leche, azúcar, leche en polvo descremada, sólidos de leche, fécula de maíz, fermentos lácticos específicos, estabilizantes: gelatina, colorante rojú, saborizante permitido. | Sin referencias |
| Jugo multifrutas | Agua, puré de bananas, JMAF, pulpa concentrada de pera, jugo concentrado de naranja, azúcar, pulpa concentrada de durazno, jugo concentrado de ananá, vitamina C. antioxidantes eritorbato de sodio y ácido ascórbico. | Sin referencias |
| Medallón de pollo crudo | Carne de pollo desmenuzado, harina, almidón, agua, aceite vegetal y sal. | Contiene trigo; puede contener soja |
| Medallón de pescado con espinaca | Carne de merluza desmenuzada, espinaca deshidratada, harina, almidón, agua, aceite vegetal y sal. | Contiene trigo; puede contener soja |
| Maní crudo | Maní | -- |
| Chocolate con maní | Chocolate con leche (Azúcar, manteca de cacao, chocolate, leche descremada, lactosa, grasa de leche, lecitina de soja y aromas artificiales), maní, jarabe de maíz, azúcar, aceite de palma interesterificados, sal, proteínas de huevo, aromas artificiales. | Contiene maní, leche, huevo y soja. Puede contener nuez. |
| Bombón de chocolate relleno con pasta de maní | Azúcar, aceites vegetales (de palma interesterificado y fraccionado, girasol alto oleico, y soja hidrogenado), maní tostado, leche descremada en polvo, harina de trigo enriquecida, manteca de cacao, cacao en polvo, leche entera en polvo, masa de cacao, sal, emulsionante lecitina de soja, poliglicerol polirricinoleato, leudante químico bicarbonato de sodio, aromatizante artificial a avellana y etil vainillina. | Contiene maní, leche, derivados de soja y trigo. Puede contener almendras. |

2.1.1 – PREPARACIÓN DEL MATERIAL

Las muestras sólidas fueron homogenizadas mecánicamente con nitrógeno líquido, utilizando mortero y pilón, con el objetivo de obtener una masa finamente particulada. Las muestras de alimentos líquidos, como jugo multifrutal y yogur bebible, fueron utilizadas en su estado natural.

La totalidad de las muestras se fraccionaron en tubos Eppendorf con 500 mg cada uno y se almacenaron a -20°C para disponer de las mismas durante el tiempo necesario para la realización de los procedimientos.

2.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se compararon dos kits comerciales (Nucleo Spin Food -Macherey-Nagel y Wizard Magnetic DNA Purification System for Food-Promega), y dos métodos estándares (CTAB y CTAB-PVP). Inicialmente se realizó la extracción y purificación de ADN por triplicado de quince alimentos procesados de diferente naturaleza y disponibles comercialmente. El ADN purificado se cuantificó por espectrofotometría UV a 260nm y la calidad del mismo se estimó por la relación UV 260/280nm.

El objetivo de obtener ADN íntegro y lo más puro que sea posible, es fundamental para la aplicación luego de las técnicas de detección molecular como la PCR. Una de las ventajas de utilizar métodos tradicionales es su bajo costo, así como un alto rendimiento. Sin embargo, en ocasiones el material obtenido está fragmentado. Estos métodos son susceptibles de contaminación, variación y errores por los múltiples pasos de manipulación (Störmer *et al*, 2007). El rendimiento de los kits depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, así como de la capacidad de unión de la membrana.

2.3 –EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

2.3.2 - MÉTODO BASADO EN EL CTAB (BROMURO DE CETIL-TRIMETIL AMONIO)

Se trabajó con las muestras fraccionadas inicialmente, 500 mg de alimento homogenizado, a los que se añadieron 1,5ml de buffer de lisis CTAB y 5µl de ARNasa; se incubó a 37°C por 5 min. Se agregó 20µl de enzima PK (proteínasa k) y se colocó nuevamente en incubación a 65°C en baño seco (Labnet) por 30min con vortex (Geni-2) cada 10min.

Se llevó a centrifugación a 8.000g por 5min en microcentrifuga Microfuge 18 (Beckman Coulter); se recogió 1.000µl del sobrenadante y se agregó 800µl de la mezcla de solventes cloroformo – alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló por inversión unas diez veces y se llevó a centrifugación por 15min a 14.500g.

Se extrajo un volumen de fase acuosa (donde se encuentra el ADN), se añadieron 2,5 volúmenes de etanol al 100% frío (-20°C) y 0,1 volumen de acetato de sodio 3M, y se llevó a almacenamiento a -20°C durante 30 min para favorecer la precipitación del ADN. Luego se centrifugó a 4°C a 14800g durante 15min. Se lavó con etanol al 70% frío, para eliminar restos de sales. Se centrifugó nuevamente por 5min a 14.500g y se desechó el sobrenadante. Una vez evaporado el remanente de etanol, se re-suspendió el pellet obtenido en buffer TE (Tris – EDTA) a un volumen final de 100µl (Figura 7).

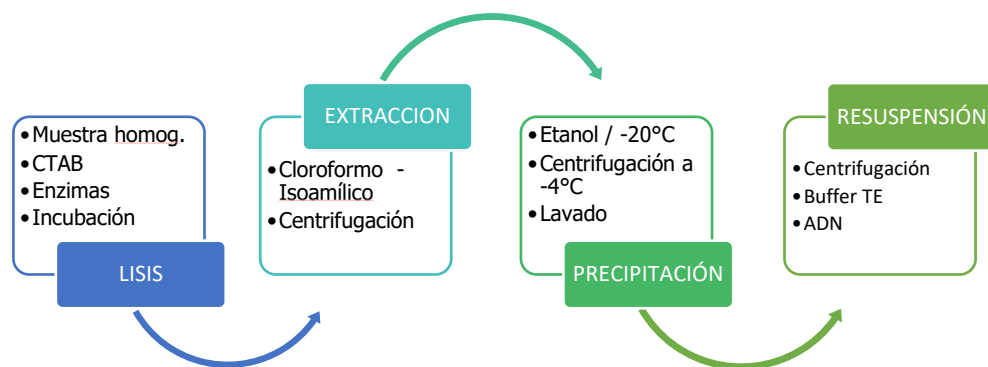


Figura 7: Esquema del método tradicional del CTAB

2.3.3 - MÉTODO BASADO EN EL CTAB MODIFICADO CON ADICIÓN DE PVP (POLIVINILPIRROLIDONA)

También se trabajó con las muestras iniciales de 500mg, pero en este caso se añadió un volumen de 1ml de buffer inicial CTAB con adición de PVP, y 20µl de β-mercaptoetanol. Se homogeneizó con vortex durante 30 segundos. Se llevó a incubación durante 1 hora a 65°C, con vortex cada 10min. Luego se siguió el procedimiento descrito en el ítem 2.3.1) a partir de la centrifugación. (Fig. 8)

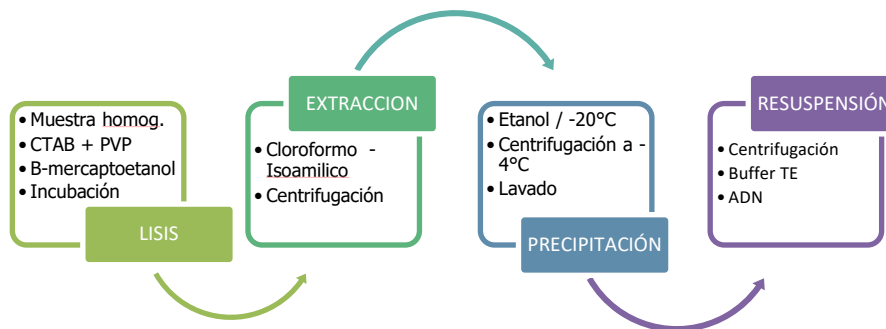


Fig. 8: Esquema del método tradicional del CTAB con adición de PVP

2.3.4 - MÉTODO DE NUCLEO SPIN – MACHEREYNAGEL (KIT COMERCIAL)

Partiendo de la misma cantidad de muestra inicial, se siguieron las instrucciones provistas en el kit, que se detallan a continuación:

En un tubo de 2ml, con la muestra, se agregó 550µl de buffer de lisis (CF), precalentado a 65°C, se mezcló por inversión durante 15s y luego se añadió 10µl de Proteinasa K. Se mezcló y se llevó a incubación durante 30 minutos a 65°C; finalizada ésta, se centrifugó por 10min a 10.000g. Un volumen del sobrenadante (300µl) fue transferido a otro tubo, añadiendo igual volumen del buffer de unión (C4) y etanol, respectivamente. Se mezcló por vortex durante 30s.

Para cada muestra se utilizó una columna provista en el kit, en cada una de ellas se pipeteó 700µl de la mezcla anterior, que luego fue centrifugada por 1min a 11.000g, repitiendo este procedimiento con el remanente de la muestra. Luego

en la siguiente etapa, se realizaron tres lavados sucesivos usando 400µl de buffer CQW, 700µl y 200µl de buffer C5 respectivamente, intercalando entre cada agregado un paso de centrifugación por 1min a 11.000g. Por último, en la etapa de elución, se pipeteó sobre la membrana, 100µl del buffer de elución CE, precalentado a 70°C, incubando por 5min a temperatura ambiente (18 – 25°C). Finalmente se centrifugó por 1min a 11.000g para obtener el ADN en este volumen final. En la siguiente figura puede verse el esquema general.

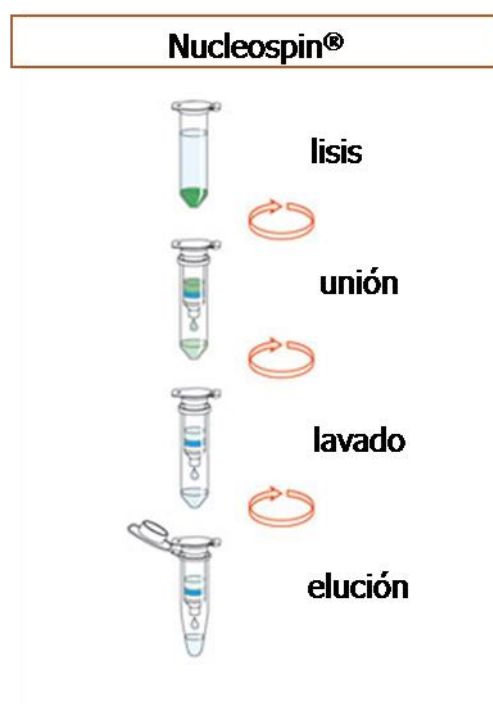


Figura 9: Etapas principales del procedimiento con NucleoSpin

2.3.5 - MÉTODO WIZARD MAGNETIC DNA PURIFICATION SYSTEM FOR FOOD-PROMEGA

En esta metodología, igual que en el ítem anterior, se siguieron las instrucciones del proveedor del kit (Figura 10). A la muestra homogenizada, se añadió 500µl de tampón de lisis A y 5µl de enzima ARNasa, luego de agitación vigorosa, se agregaron 250µl de tampón de lisis B y se procedió con agitación durante 10 – 15s. Se incubó durante 10min a temperatura ambiente (22 – 25°C); se agregó a lo anterior 750µl de solución de precipitación y se agitó enérgicamente.

Se llevó a centrifugación durante 10 min a 13.000g. El sobrenadante obtenido se transfirió a otro tubo de 2ml, al que se le añadió 50µl de MagneSil®, previamente agitado para re-suspender las partículas magnéticas. Se mezcló con ayuda de vórtex y se añadió 0,8 volúmenes de isopropanol; se mezcló el contenido por inversión del tubo entre 10 y 15 veces. Se dejó en incubación durante 5 min a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Los tubos fueron insertados en el MagneSphere® (soporte de separación magnética) por el espacio de 1 min. Transcurrido este tiempo se descartó la fase líquida, luego se removieron del soporte magnético y se agregaron 250µl de buffer de lisis B a las partículas remanentes en el tubo. Se colocó nuevamente el tubo en el soporte y se repitió el paso anterior. Luego se resuspendieron las partículas magnéticas en 1ml de etanol al 70 % y se colocaron los tubos nuevamente en el soporte magnético por otro minuto. Se removió y descartó la solución como en los pasos previos, se repitió esta acción por un total de tres lavados. Se desechó el sobrenadante utilizando micropipeta.

Las partículas se secaron a temperatura ambiente por 10min a 65°C; una vez secas, se resuspendió en 100µl de buffer TE, se agitó por vortex y se incubó a 65°C por 5 min. Se insertaron los tubos en el soporte magnético nuevamente, dejando en reposo durante 1 minuto. Luego de este tiempo, con ayuda de una micropipeta se transfirió cuidadosamente el buffer que contenía el ADN extraído a un nuevo tubo Eppendorf.

Todos los extractos fueron conservados a -20°C hasta su utilización posterior. Cada metodología de extracción fue realizada por triplicado.

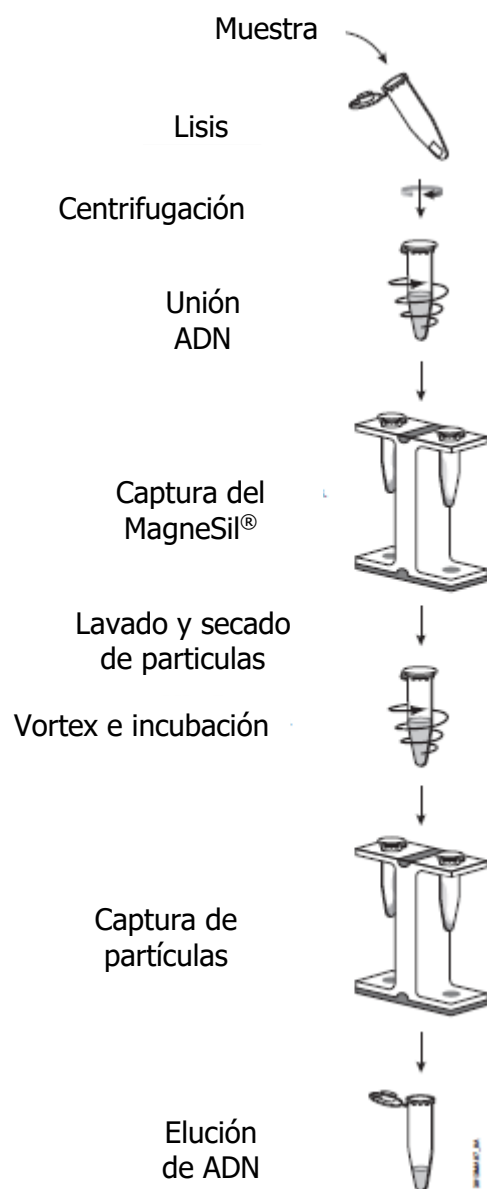


Figura 10: Extracción de ADN mediante el Sistema Magnético de Purificación de ADN en alimentos Wizard®.

2.4 –RENDIMIENTO Y PUREZA DEL ADN

El rendimiento y la pureza de los extractos se evaluaron mediante espectrofotometría UV, usando Espectrofotómetro UV LAMBDA 25 (PERKIN ELMER). La absorbancia fue leída a 260 y 280nm para estimar la concentración de ADN, y la pureza utilizando la relación 260/280, con cubetas de cuarzo de 200µl, protocolo de cuantificación de ácidos nucleicos con el tipo de muestra definido para ADN de doble cadena.

La calidad de los extractos de ADN fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y resuelto en cuba OWL B3 (ThermoScientific) en solución TBE 50X, durante 20 min a 200V con Fuente de Poder 200/2.0 (Bio-Rad); luego teñido por inmersión en solución de bromuro de etidio. El gel de agarosa se visualizó en transiluminador de luz UV y se obtuvo una imagen digital utilizando software Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

2.5 –AMPLIFICACIÓN POR PCR – ENSAYO DE APLICACIÓN

Se realizó una amplificación por qPCR por duplicado utilizando el kit Sure Food Peanut/R-Biopharm que detecta secuencias de ADN específicas de maní a aquellos extractos seleccionados que, según la información brindada en la rotulación de los alimentos, tenía declarado maní como ingrediente, presencia en trazas por contaminación, o no declarado de ninguna forma. Los extractos de ADN utilizados fueron los correspondientes a los siguientes alimentos:

- Alfajor con dulce de leche y cobertura blanca
- Chocolate para taza
- Maní crudo
- Bombón relleno con pasta de maní
- Cereal instantáneo (trigo y miel)

2.5.1 PCR – REAL TIME

Las amplificaciones por PCR se efectuaron en un termociclador (AriaMx-Agilent) con software Agilent Aria v1.4. Se trabajó con un volumen total de mezcla de reacción de 25µl que contiene: 19.9µl de mezcla de reacción, 0.1µl de Taq polimerasa, siguiendo las instrucciones del fabricante (S3203-Manual Allergen Quant Peanut 1.0) y 5µl de ADN de cada muestra estudiada. El programa de reacción de PCR consistió de un ciclo de desnaturalización inicial de 5min a 95°C; 45 ciclos de 15s a 95°C (desnaturalización) y 30s a 60°C (hibridación/extensión). Se utilizó el canal FAM para la detección al final de cada paso de extensión.

En todos los casos se amplificó un control positivo y un control de reactivos (NTC).

La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al incremento de ADN sintetizado en la reacción. El valor del punto de cruce en la línea de base o umbral (C_q: ciclo de cuantificación), refiere al número de ciclos donde la fluorescencia de la muestra aumenta significativamente sobre el umbral, fue determinado automáticamente por el software del termociclador como el primer máximo de la derivada segunda de la curva. La medición continua de la fluorescencia se relaciona con la cantidad de producto de la PCR en tiempo real, lo que arroja un resultado cuantitativo sobre la presencia de la especie objetivo (López – Calleja *et al.*, 2013). Este valor de C_q es inversamente proporcional a la cantidad inicial de copias de la secuencia objetivo (*target*) en la muestra original.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1–OBTENCIÓN DE ADN

Se valoraron distintas estrategias de extracción y purificación de ADN, para extraer en alimentos. La concentración de ADN se determinó espectrofotométricamente midiendo la Absorbancia de los extractos. En la tabla 1, se presentan los datos de concentración (expresados en ng/ μ l) y pureza del ADN (estimado mediante el coeficiente A260/A280) de las muestras procesadas. El ADN, se consideró de pureza satisfactoria cuando los valores estuvieron dentro del rango 1.7 – 2.0. La contaminación del ADN con proteínas que no fueron eliminadas en el proceso de extracción, por lo general, reduce esta relación a valores menores de 1.7; del mismo modo las impurezas remanentes del proceso de extracción como etanol o solventes orgánicos también reducen esta relación. Los residuos químicos procedentes del proceso de extracción de ácidos nucleicos pueden resultar en una sobreestimación en la concentración de ADN (Piskata *et al.*, 2017).

Tabla 1: Datos de cuantificación y pureza estimados mediante espectrofotometría UV, correspondientes a la media de tres extracciones independientes de ADN, con los métodos *Nucleospin*, *WizardMagnetic*, CTAB y CTAB+ PVP. (NR: no realizado).

| MUESTRAS | METODOS | | | | | | | |
|--|-------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------|
| | NUCLEOSPIN | | WIZARD MAGNETIC | | CTAB | | CTAB + PVP | |
| | [ADN] ng/μl | Estimación Pureza ADN (A260/A280) | [ADN] ng/μl | Estimación Pureza ADN (A260/A280) | [ADN] ng/μl | Estimación Pureza ADN (A260/A280) | [ADN] ng/μl | Estimación Pureza ADN (A260/A280) |
| <i>Snacks horneados</i> | 197 | 1,97 | 154.5 | 1,91 | 927 | 1,77 | 951.3 | 1,81 |
| <i>Galletitas agridulces azucaradas</i> | 82,4 | 1,93 | 168.5 | 1,98 | 619,5 | 1,80 | 615,0 | 1,74 |
| <i>Galletas de chocolate con semillas</i> | 229 | 1,91 | 95,7 | 1,92 | 837,5 | 1,65 | 815,7 | 1,64 |
| <i>Budín de vainilla</i> | 26,3 | 1,59 | 80.9 | 1.85 | 429,2 | 1,53 | 534,2 | 1,44 |
| <i>Alfajor con cobertura blanca</i> | 70,2 | 1,93 | 61 | 1,80 | 540,8 | 1,61 | 661,7 | 1,71 |
| <i>Cereal inst. (trigo y miel)</i> | 57,3 | 2,01 | 49,6 | 3,19 | 309,8 | 1,79 | 423,7 | 1,74 |
| <i>Miel</i> | 3,33 | 1,33 | 3,02 | 3,33 | 30,9 | 1,36 | 6,7 | 1,17 |
| <i>Polvo de prep. flan sabor chocolate</i> | 121,8 | 0,99 | 115,5 | 1,34 | 628,3 | 1,31 | 1661 | 1,26 |
| <i>Chocolate para taza</i> | 40,3 | 1,42 | 75,1 | 1,34 | 606,7 | 1,59 | 1118 | 1,52 |
| <i>Chocolate con maní y almendras</i> | 18 | 1,50 | NR | NR | 962 | 1,17 | NR | NR |
| <i>Bombón choc. con relleno de pasta de maní</i> | 28,5 | 1,84 | NR | NR | 829,5 | 1,10 | NR | NR |
| <i>Maní crudo</i> | 257 | 2,05 | NR | NR | 3708 | 1,00 | NR | NR |
| <i>Jugo multifrutal</i> | 6,4 | 1,34 | 11,2 | 2,14 | 24,6 | 2,35 | 23,9 | 1,96 |
| <i>Yogur sabor dulce de leche</i> | 7,7 | 1,36 | 19,6 | 1,09 | 62,3 | 1,39 | 78,00 | 1,22 |
| <i>Queso brie</i> | 3,3 | 1,75 | 58,2 | 1,33 | 210 | 1,43 | 339,2 | 0,88 |
| <i>Medallón de pollo rebozado pre cocido</i> | 55,9 | 1,95 | 113 | 1,81 | 1498 | 1,94 | 1895 | 1,96 |
| <i>Medallón de pescado con espinaca reb.</i> | 44,7 | 1,95 | 85,0 | 1,73 | 1105 | 1,88 | 1740 | 1,89 |
| <i>Caldo verduras deshidratado (cubo)</i> | 17,5 | 1,75 | 28,7 | 1,93 | 160,3 | 1,66 | 221,3 | 1,68 |

El rendimiento, entendido como la cantidad total de ADN recuperado a partir de una muestra, de los métodos estándares fue mayor al de los kits comerciales, en términos generales en todas las matrices ensayadas. Los datos arrojan un mejor beneficio en las extracciones realizadas con el CTAB y que con el agregado de PVP al buffer CTAB tiende a mejorar, en comparación con las metodologías comerciales (Nucleospin® y Wizard® magnetic). Por ejemplo, en la muestra de chocolate para taza se obtuvo 606,7ng/μl de ADN con el método de CTAB, que aumentó a 1118ng/ul cuando se le adicionó PVP, mientras que con Nucleospin® fue de 40,3ng/μl y con WM 75,1ng/μl, notoriamente menor cantidad final de ADN recuperado en el proceso de extracción. Se incluyó PVP fue con el objetivo de inhibir las enzimas oxidasas intrínsecas, que generan compuestos secundarios a partir de los fenoles y polifenoles presentes en la matriz, que oxidan al ADN; y el aumento en el contenido de EDTA para capturar los iones metálicos divalentes necesarios para el funcionamiento de ADNasas. Estas modificaciones en la solución de lisis, contribuyeron a acondicionar estos protocolos para la extracción de matrices complejas como son los alimentos ultraprocesados. Alternativamente, los inhibidores de la PCR pueden ser eliminados mediante la técnica de columna de intercambio iónico donde, con la ayuda de agentes caotrópicos, el ADN se une a las membranas de sílice durante la extracción (Di Pinto *et al.*, 2005).

Entre los métodos comerciales, en una matriz de vegetales deshidratados con soporte graso como es el caldo vegetal en cubos se obtuvieron, con el método magnético, cantidad de ADN ligeramente superior (28,7ng/μl) que con el método NS (17,5ng/μl), mientras que para galletas de chocolate con semillas, si bien los valores de pureza son similares, el contenido de ADN obtenido por NS es mucho mayor que para WM (229 ng/μl y 95,7ng/μl respectivamente).

Ahora bien, si se observa más detenidamente en los diferentes alimentos, se encuentran algunas diferencias más, principalmente en el grupo de los procesados derivados de harinas como los diferentes tipos de galletas que fueron muestreadas, el chocolate y los lácteos; se observa una dependencia, tanto en el rendimiento como en la calidad del ADN, de la matriz purificada. Por ejemplo, tanto

en el yogur como el queso de pasta blanda, ambas matrices de alto contenido acuoso (aproximadamente un 85%), se obtuvo bajo rendimiento de ADN y pureza deficiente, para todas las metodologías.

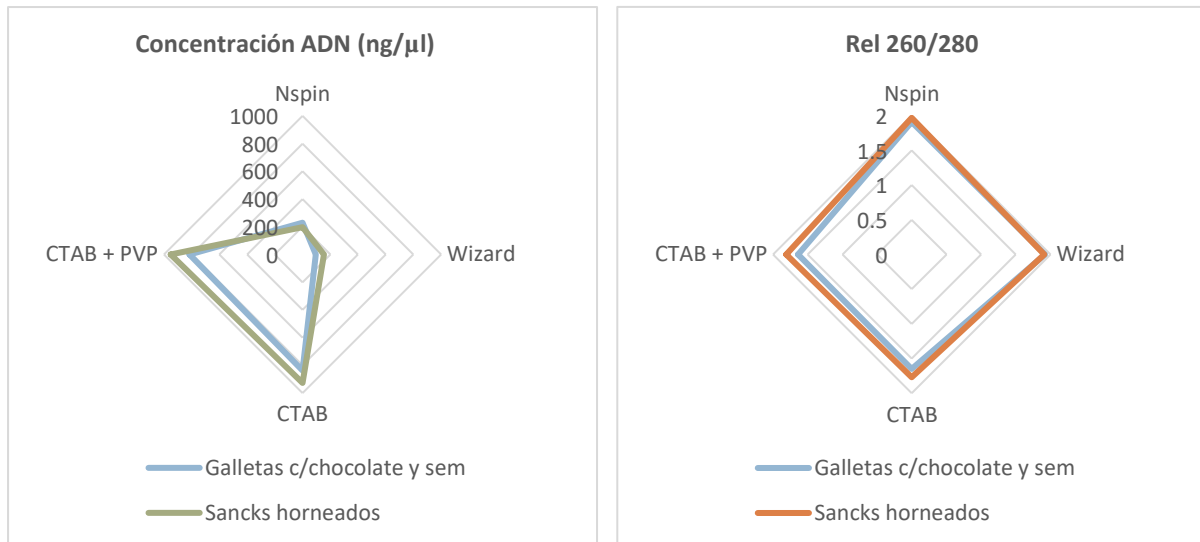


Gráfico 1: Comparación en la media de la concentración de ADN para galletas de chocolate y semillas, y snacks horneados, y su estimación de pureza a partir de los extractos obtenidos en tres purificaciones independientes para cada una de las metodologías propuestas.

Durante las extracciones se pudo observar que, con los métodos estándares, los pellets de ADN obtenidos de alimentos como galletas de chocolate con semillas se observaban coloreados, evidenciando la presencia de algún compuesto que no pudo ser eliminado en los pasos previos de separación y eliminación de proteínas y lípidos, siendo consistente con la valoración de la pureza que mostró el coeficiente de A_{260}/A_{280} . En el gráfico 1, para el caso de las galletas de chocolate, se muestra que la mayor concentración de ADN es obtenida en cantidades similares para los métodos estándares, pero de una calidad menor que el obtenido con los kits comerciales, reflejado en los valores 1,91 y 1,92 para Núcleo Spin y Wizard contra 1,65 y 1,64 para los métodos con CTAB. Estos resultados podrían deberse a residuos orgánicos propios del proceso de extracción que llevan a una disminución de esta relación, y remanentes moleculares de la matriz que no pudieron ser eliminados y llevan a una sobreestimación de la concentración de ADN. Los snacks horneados pudieron ser purificados con todos los métodos ensayados.

Los productos horneados/tostados, resultan un desafío debido a los posibles inhibidores, derivados de la reacción de Maillard, resultantes de la interacción de

azúcares y proteínas sometidos a altas temperaturas. Estas sustancias pueden resultar inhibitoras en aplicaciones posteriores. Sajali *et al.*, (2018), describieron mayor eficacia al usar un método con columnas de sílica que el método estándar del CTAB/DTAB para la extracción de granos de *Triticum aestivum* (trigo), sometidos a 200°C durante 1 hora.

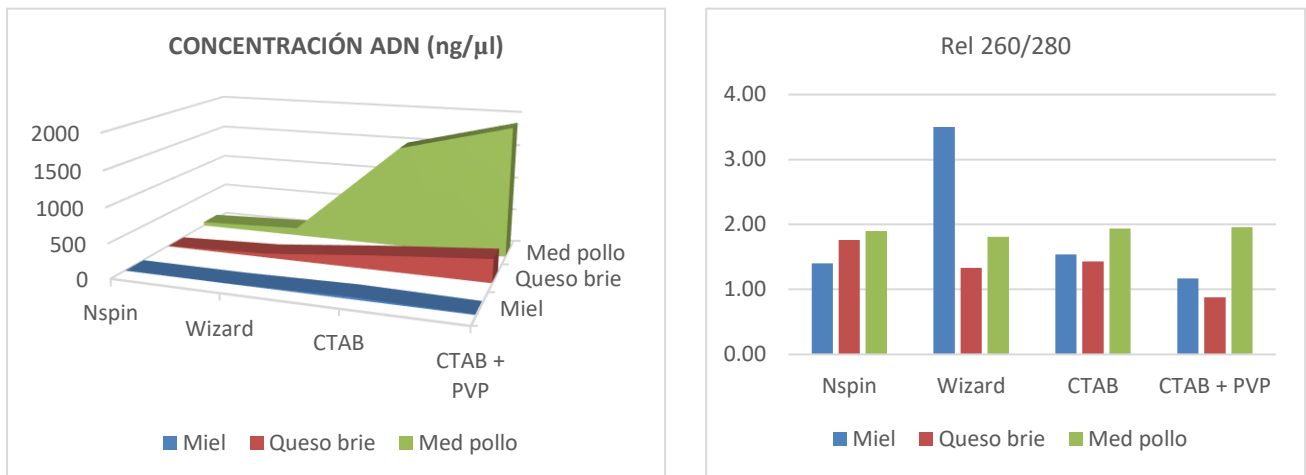


Gráfico 2: Comparación de la media de concentración de ADN obtenida y su estimación de pureza, para tres alimentos de matriz bien diferentes: miel, queso brie y medallón de pollo rebozado.

La miel, producto natural con 82% de carbohidratos, presentó muy baja recuperación y calidad del ADN, en concordancia con los resultados bibliográficos informados por Soares S. *et al.*, (2014), que trabajaron específicamente en la extracción de ADN en miel y obtuvieron concentraciones muy bajas, y en algunos casos, no detectables según el pre-tratamiento y método de extracción empleado.

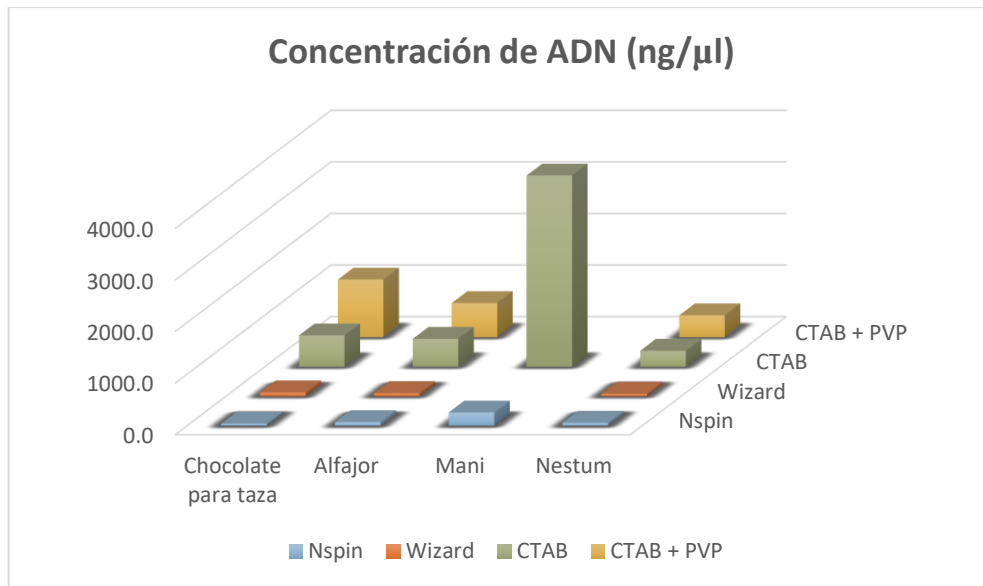


Gráfico 3: Comparación de la media de ADN para alimentos como chocolate, alfajor, maní crudo y cereal, extraído en tres ensayos independientes para cada uno de los diferentes procedimientos. En el caso del maní, sólo se hicieron extracciones por NS y CTAB.

López Callejas *et al.*, 2013, evaluaron 179 productos alimenticios de diferentes marcas, de distinta naturaleza, con distinta declaración en su etiqueta con respecto al contenido de avellana (30 contenían avellana como ingrediente, 61 podían contener trazas y 88 no contenían). Los resultados obtenidos de la PCR, se correspondieron con lo informado en las etiquetas de los productos en todas las muestras, a excepción de 40 de ellos donde la detección de trazas de avellana fue positiva, no estando declarado en su rotulación. Si bien el objetivo de ese equipo de investigación no fue la evaluación de las etapas de extracción y purificación como en este trabajo, combinaron la metodología estándar y una posterior purificación utilizando el kit *Wizard DNA Clean - up System (Promega)* por igual para todos los diferentes tipos de alimentos muestreados, sin reportar ninguna modificación en el pre-tratamiento dependiente de la matriz; entre ellos, chocolates, bombones, galletas, galletas de arroz, jugos, panes, yogurt, turrone, barras de nuez, cereales, productos cárnicos, etc.

A partir del gráfico 3 se puede ver que la obtención de mayores concentraciones de ADN, no necesariamente se correlaciona con una óptima relación 260/280 como se evidencia por ejemplo en el chocolate para taza, que muestra cantidades de ADN muy diferentes para cada procedimiento, pero con una estimación de pureza

similar para los cuatro tratamientos con valores por debajo del rango considerado recomendado (1.7 – 2.0).

Otros casos como el budín de vainilla, polvo para preparar flan y chocolate con maní, muestran una cantidad aceptable de ADN pero baja relación 260/280, acerándonos a la idea de una calidad muy deficiente. Sin embargo, en el ensayo de aplicación, se logró amplificar una secuencia de maní, en todos los extractos (ver sección 3.2 “Resultados del ensayo de aplicación”).

Inicialmente y como fue planteado dentro de los objetivos específicos, la calidad de los extractos obtenidos en los primeros tratamientos fue valorada mediante electroforesis en gel de agarosa, con el fin de observar su integridad. El ADN no pudo ser visualizado cuando fue revelado el gel; lo cual permitió inferir sobre el rango de concentración tan pequeño con el que se estaba trabajando.

3.2–RESULTADOS DEL ENSAYO DE APLICACIÓN

Ahora bien, obtenidos los extractos de ADN, se presenta el interrogante de que si muestras con coeficiente menor a 1.7 o con bajo rendimiento podrían ser utilizados igualmente para amplificar por PCR para su posterior utilización. Entonces se diseñó un ensayo simple (tal como fue descrito en el apartado 2.5 de este trabajo), que consistió en una amplificación por qPCR por duplicado utilizando el kit Sure Food Peanut/R-Biopharm que detecta secuencias de ADN específicas de maní a aquellos extractos seleccionados que, según la información brindada en la rotulación de los alimentos, declararon maní como ingrediente, presencia en trazas debido al proceso, o no declarado de ninguna forma. Los extractos de ADN utilizados fueron los correspondientes a los siguientes alimentos: alfajor con dulce de leche y cobertura blanca, chocolate para taza, maní crudo, bombón relleno con pasta de maní y cereal instantáneo (trigo y miel).

En el desarrollo de este apartado se podrá observar que todas las muestras ensayadas, con contenido de maní declarado como ingrediente o como trazas en el rótulo por el elaborador, pudieron ser amplificadas por qPCR para detectar

secuencias específicas de maní, mientras que aquellas muestras sin contenido de éste en sus ingredientes no mostraron señal.

Es sabido que, como se ha tratado anteriormente, los compuestos inhibitorios pueden interferir a distintos niveles de la reacción, dando lugar a diferentes grados de atenuación, siendo el grado de inhibición final dependiente de su concentración. En el gráfico 4 se evidencia esta condición; para cada muestra se grafica la fluorescencia detectada a lo largo de los ciclos de la qPCR.

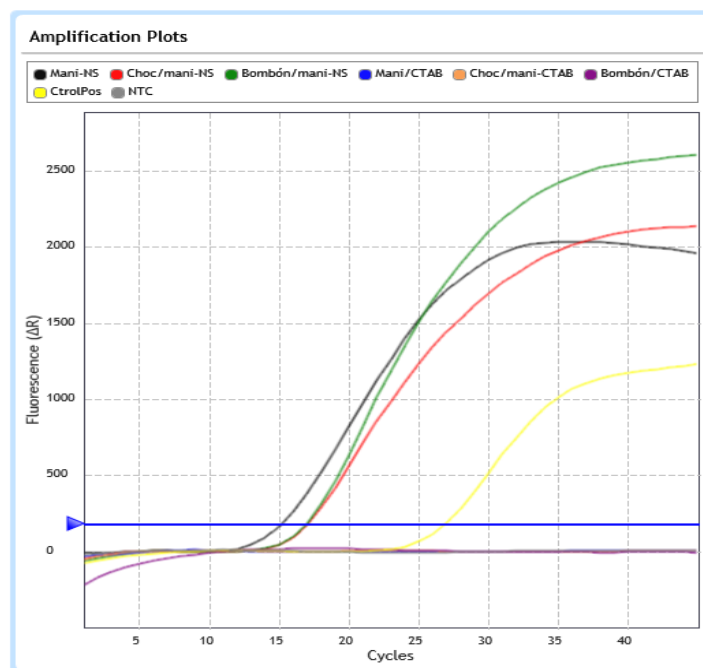


Gráfico 4: Curva de amplificación de ADN correspondiente a extractos de maní crudo, chocolate con maní y bombón relleno con pasta de maní, purificados por NS y CTAB. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit. Los extractos purificados por CTAB no amplifican.

Tabla 2: Comparación de valores de Cq correspondiente a los extractos amplificados de maní, chocolate con maní y bombón relleno con pasta de maní (mostrados en la Grafica 4).

| Muestra | Método | Cq |
|--------------------------|--------|-------|
| Maní crudo | NS | 15.38 |
| Chocolate con maní | | 17.25 |
| Bombón con pasta de maní | | 17.13 |
| Maní crudo | CTAB | No Cq |
| Chocolate con maní | | No Cq |
| Bombón con pasta de maní | | No Cq |
| Control positivo | -- | 27.11 |
| NTC | -- | No Cq |

Los extractos purificados por la metodología estándar CTAB no muestran amplificación (Gráfico 4 y Tabla 2); esta falta de amplificación da sospecha de posible inhibición en la reacción, que se verifica con el control de inhibición y repitiendo la reacción específica con las diluciones correspondientes. Entonces, para verificar la presencia de éstos en las muestras en cuestión, se realizó un ensayo específico: una reacción de amplificación de ADN exógeno agregado a la reacción, que valoró la inhibición de compuestos presentes en las muestras. El resultado se muestra en la gráfica 5.

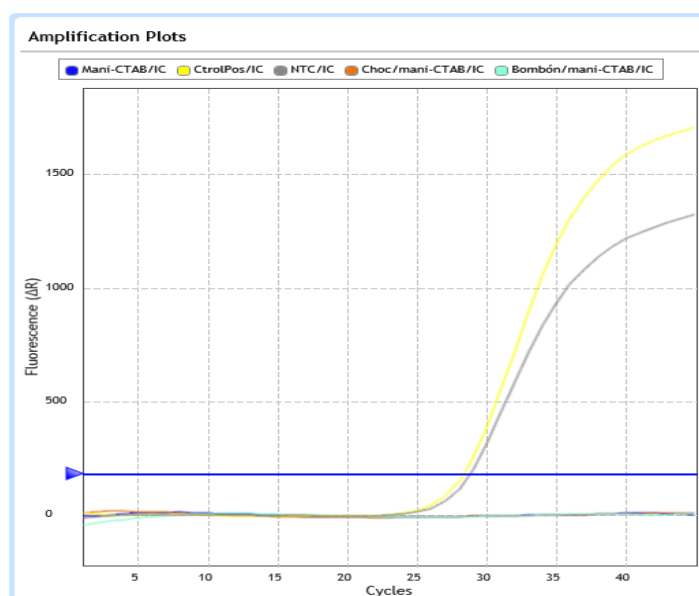


Gráfico 5: Curva de amplificación de ADN correspondiente a extractos de maní crudo, chocolate con maní y bombón relleno con pasta de maní, purificados por CTAB. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit y un IC (control de inhibición).

Una vez que se comprobó la presencia de inhibidores, se realizó una dilución de los extractos, con la lógica de diluir también los inhibidores, a una concentración de 10ng/μl, utilizando 5μl de cada muestra en el mix de reacción, es decir 50ng, y se volvió a realizar la amplificación de control de inhibición, pero esta vez con todas las muestras tratadas por cada una de las metodologías evaluadas. Esta dilución permitió amplificar las muestras sin la interferencia de los inhibidores de reacción, obteniendo así un gráfico general (Gráfico 6).

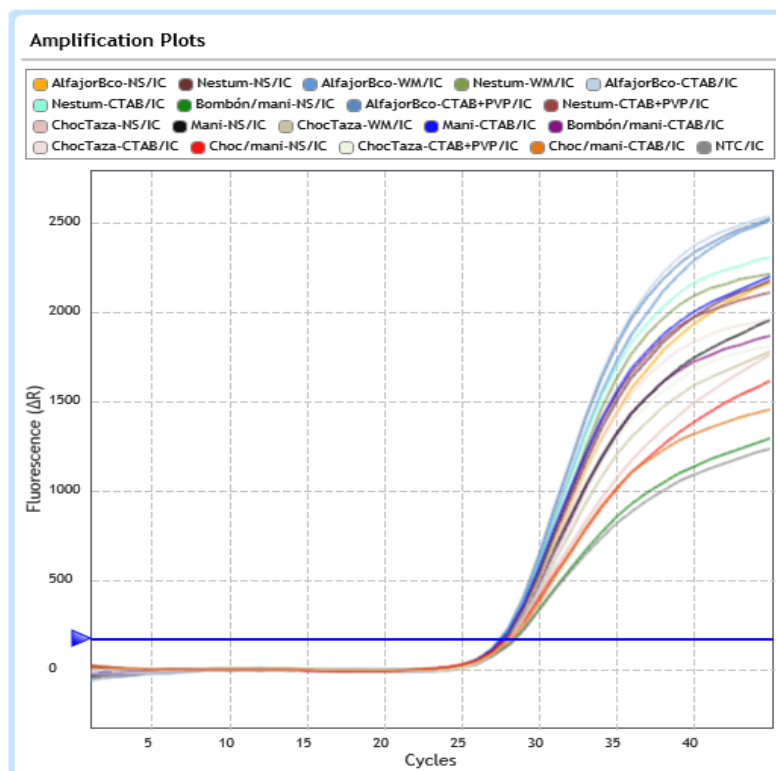


Gráfico 6: Seguimiento de la amplificación de ADN en la reacción de inhibición realizada con todos los extractos de alimentos involucrados en el ensayo de aplicación, purificados por NS, WZ, CTAB y CTAB + PVP. NTC (control sin templado) y el IC (control de inhibición).

En este ensayo (Gráfico 7) también fue incluida una muestra de material genómico de aceite de maní, que se extrajo mediante la metodología NS, y que no amplificó; este resultado es concordante con algunas referencias bibliográficas que indican que para lograr material genético de aceites, considerando el proceso de extracción del mismo, es necesario procesar grandes cantidades del alimento para poder obtenerlo.

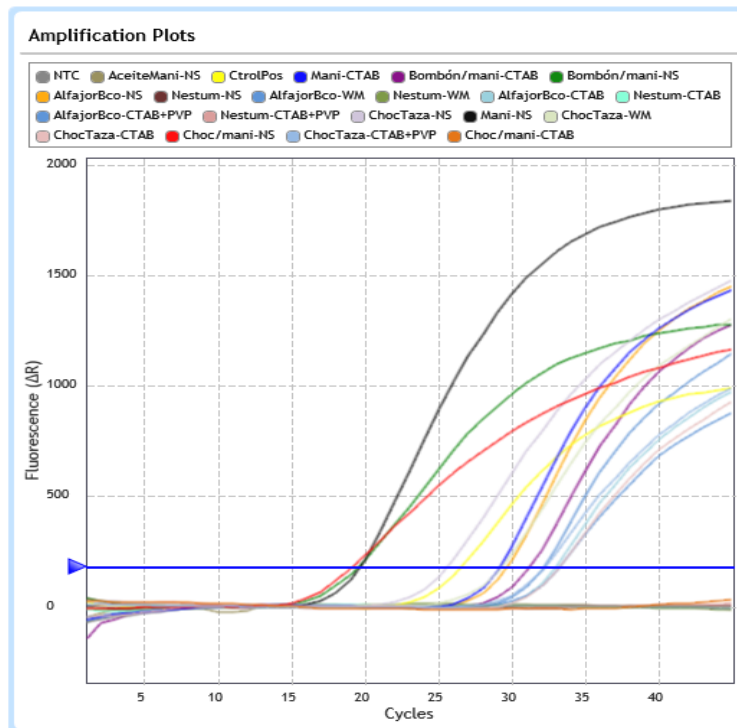


Gráfico 7: Seguimiento de la amplificación de ADN en la reacción con el target maní. Con todos los extractos de alimentos del ensayo de aplicación, purificados por NS, WZ, CTAB y CTAB + PVP. NTC (control sin templado) y control positivo provisto por el kit.

El gráfico 8 muestra la curva de amplificación correspondiente al ADN obtenido de la matriz de un alfajor con cobertura blanca, para cada una de las metodologías propuestas, se observa que la mejor amplificación del ADN específico se logró en la muestra procesada con NS con un Cq de 28.91; seguida por WM, CTAB y CTAB con agregado de PVP, con valores de Cq 31.38; 32.13 y 32.36 respectivamente (tabla 3). Estos resultados no guardan correlación con la concentración de ADN total medido a 260nm para cada una de las muestras, por el contrario, las concentraciones menores fueron obtenidas con los kits comerciales.

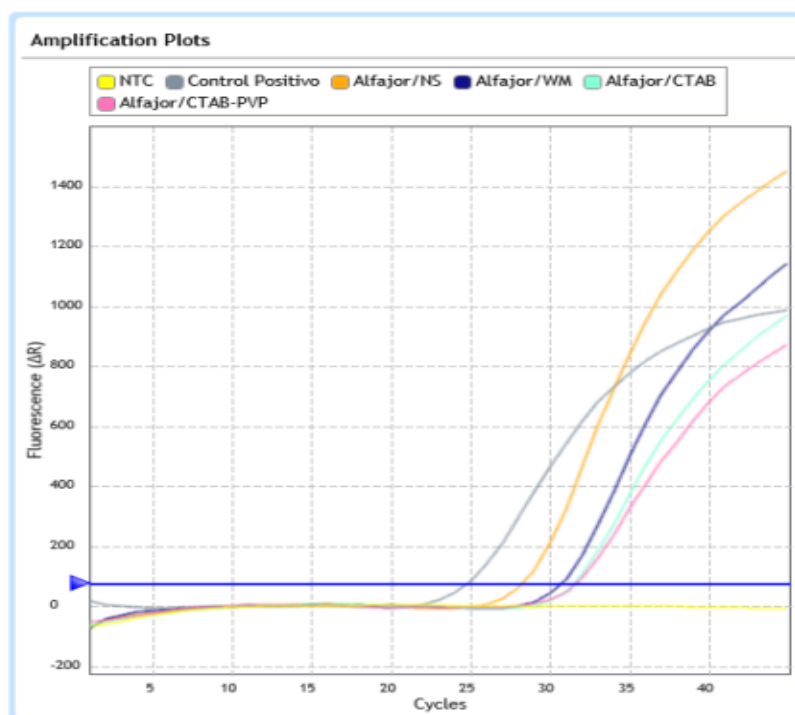


Gráfico 8: Curva de amplificación de ADN correspondiente al extracto de alfajor con cobertura blanca. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit, extractos purificados por NS, WM, CTAB y CTAB+PVP.

Tabla 3: Comparación de valores de Cq para algunos alimentos con maní para cada una de las metodologías usadas.

| MÉTODO | Cq | | | |
|-------------------|----------------------------|---------------------|------------|----------------------------------|
| | Alfajor c/cobertura blanca | Chocolate para taza | Maní crudo | Bombón relleno con pasta de maní |
| NS | 28.91 | 24.70 | 18.91 | 18.47 |
| WM | 31.38 | 28.40 | -- | -- |
| CTAB | 32.13 | 32.38 | 28.40 | 30.42 |
| CTAB + PVP | 32.36 | 31.29 | -- | -- |

Similar comportamiento se observa para el caso del chocolate para taza, tal como se muestra en el Gráfico 9. En ambos casos, la rotulación indica la presencia de maní, no como parte de su formulación sino en cantidades trazas como contaminante del proceso, posiblemente por ser elaborado en instalaciones compartidas donde ha sido procesado otro alimento que sí contenía maní o derivados de éste como ingrediente.

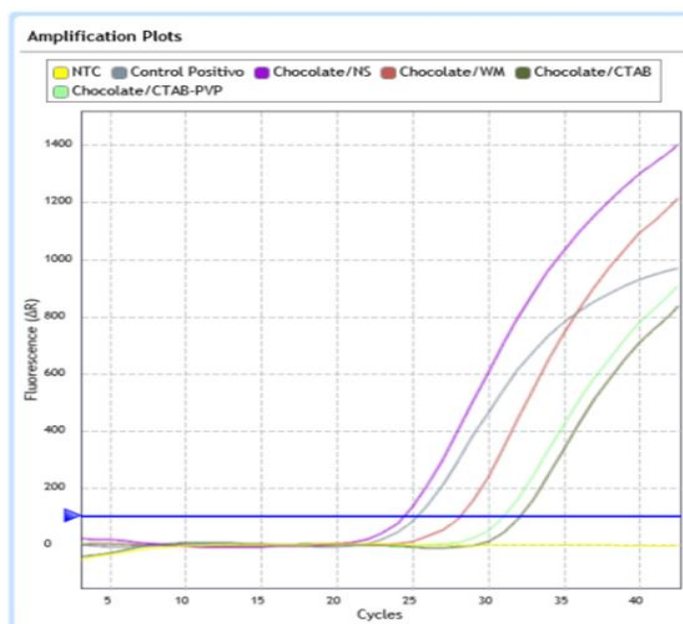


Gráfico 9: Curva de amplificación de ADN correspondiente al chocolate para taza. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit, extractos purificados por NS, WM, CTAB y CTAB+PVP.

También fueron amplificados en este ensayo, ADNs genómicos extraídos de una muestra de bombón de chocolate relleno con pasta de maní y de granos de maní crudo por lo que, como era de esperarse, las curvas muestran la amplificación con valores de Cq menores a los dos presentados anteriormente, evidenciando mayor eficiencia en amplificar el fragmento de interés (Gráfico 10). En este caso, también funciona mejor la extracción con NS que con CTAB, de hecho, el corrimiento aun con mayor rendimiento evidencia la presencia de inhibidores de la PCR.

Además, se puede notar que, para los dos alimentos extraídos por la metodología NS, el valor de Cq es casi igual (18.91 y 18.47) pero la forma de la curva es diferente, mostrando más eficiencia el maní crudo (ADN puro de maní), dejando en evidencia el efecto de la matriz más compleja como es la del bombón.

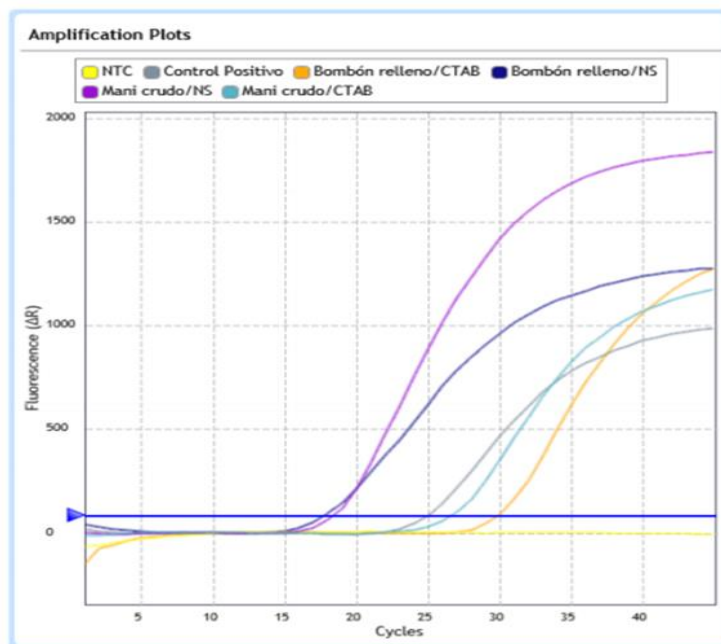


Gráfico 10: Curva de amplificación por qPCR de un extracto de ADN de bombón relleno con pasta de maní. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit, extractos purificados por NS y CTAB.

En contraposición, en el gráfico 11 se muestra el resultado de la amplificación correspondiente al extracto genómico de la muestra de alimento infantil a base de trigo y miel, donde la única curva que se observa es la del control positivo, es decir, no pudo ser detectada ninguna molécula de ADN de maní en dicha muestra procesada por los diferentes métodos.

Se evidencia en los valores de **C_q**, la mayor amplificabilidad del ADN en las muestras purificadas con los kits comerciales (Tabla 3).

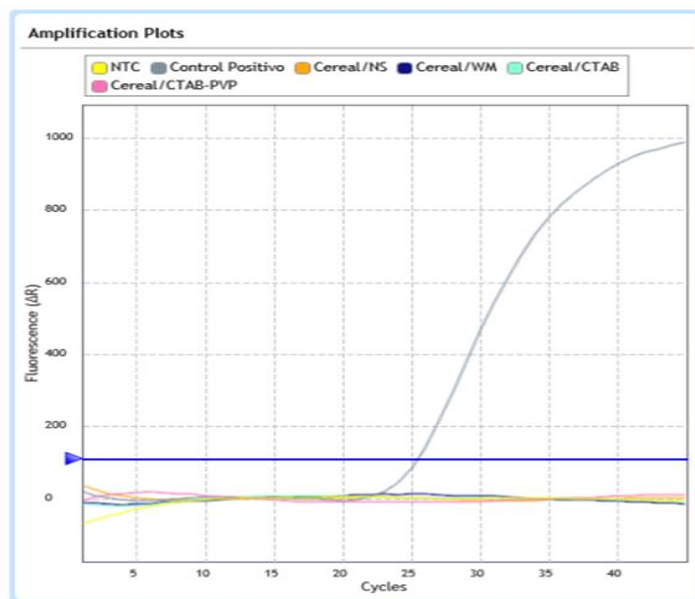


Gráfico 11: Curva de amplificación por qPCR de un extracto de ADN de alimento infantil con trigo y miel. NTC (control sin templado), control positivo provisto en el kit, extractos purificados por NS, WM, CTAB y CTAB+PVP.

En la tabla 3, se expresan los valores de Cq de las muestras amplificadas a partir de los extractos obtenidos por cada una de las metodologías propuestas. Estos resultados comparativos confirman que el kit comercial Nucleo Spin Food[®], permite obtener un material genómico de mejor calidad para su posterior amplificación. Si bien, con las metodologías estándar se obtuvo material genético de menor calidad, puede amplificarse, por lo tanto, si lo que se busca es verificar la presencia de maní como alérgeno, el cometido estaría cumplido aun partiendo de un material de menor calidad.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES

El presente estudio nos permitió llegar a las siguientes conclusiones finales:

- ⊗ Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que las metodologías estándar permiten obtener fragmentos genómicos amplificables mediante PCR, al igual que los kits comerciales, pero éstos permiten obtener material genómico de mayor pureza.
- ⊗ La etapa de extracción de ADN de matrices alimentarias, tan complejas como los alimentos ultraprocesados, es el punto fundamental para lograr un material de partida de buena calidad y cantidad, que nos asegure el éxito de los tratamientos posteriores como la amplificación por PCR.
- ⊗ Para lograr el punto anterior, es importante la pericia del operador durante el procesamiento de la muestra para su extracción y el conocimiento y/o información sobre la composición del alimento que permita discernir las mejores opciones para ese procedimiento.
- ⊗ La mayoría de los protocolos, tanto estándares como comerciales, incluyen en el proceso de purificación de ADN las etapas de remoción de proteínas, sales y residuos orgánicos que luego interfieren en la PCR. No obstante, resultó evidente la variación en la eficiencia para lograrlo según cada metodología.
- ⊗ Todos los métodos resultaron sensibles como quedó evidenciado en que fue posible la amplificación por PCR, al menos en los extractos de los alimentos trabajados en el Ensayo de Aplicación.
- ⊗ La baja recuperación de ADN en productos excesivamente procesados, como aquellos que durante su producción sufren tratamientos térmicos, fermentación, refinamiento, etc. puede correlacionarse con ADN muy

degradado que luego presenta mayores dificultades en la amplificación por PCR.

- ⊗ Es factible trabajar en desarrollos de una metodología mixta donde la extracción se haga con CTAB, pero usando membranas en columnas con afinidad por los ácidos nucleicos para contribuir al aumento en la calidad de ADN obtenido (sin tantos contaminantes remanentes). Poniendo en consideración los costos de las técnicas comerciales frente a las metodologías estándares y, en algunos casos, el mayor material de partida requerido en algunas muestras, resultan de preferencia las técnicas estándares.
- ⊗ La realización de este estudio exploratorio puede ser tomado como base para un diseño metodológico con base estadística para permitir mayor eficiencia en el tratamiento de los datos e interpretación de los resultados.

CAPÍTULO V
BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2007). Informe del Comité Científico sobre Alergias Alimentarias. AESAN – 2007 – 001.
- Acevedo F., Navarro L., Constantino L., Gil Z., Benavidez P., (2007). Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. *Cenicafé*, 58 (2):134 – 141.
- Alejos Velázquez, L., Aragón Martínez M., Cornejo Romero, A. Herramientas moleculares aplicadas a la ecología: Extracción y purificación de ADN - <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/710/extracción> (consultado Mayo/2017).
- ANMAT - Directrices para el rotulado de alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles de productos alimenticios envasados – CONAL 2017. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>
- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J.; Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology* - John Wiley&Sons, Inc.
- Código Alimentario Argentino –Ley 18.284– Recuperado de: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_caa.asp.
- Contreras Hernández, J. (2005) La modernidad Alimentaria: entre la sobreabundancia y la inseguridad. *Revista Internacional de Sociología*, 40 (01) (109 – 132).
- Cornejo Romero, A.; Serrato Díaz, A.; Rendón Aguilar, B.; Rocha Munive, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas a la ecología: aspectos teóricos y prácticos* – Secretaría de Medioambiente y Recursos Naturales. ISBN: 978-607-8246-72-4. México D.F.
- Di Pinto, A.; Forte, V.; Conversano, M.; Tantillo, G. Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources (2005). *Food Control*, 16: 391 -394.
- Espinoza, T.; Mesa, F.R.; Valencia, E.; Quevedo, R. (2015). Tipos de fraudes en carnes y productos cárnicos: una revisión. *Scientia*, 6 (3):

23-233. Recuperado de:

<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>.

- Felmer, R., Chávez R., Catrileo, A., Rojas, C. (2006). Tecnologías actuales y emergentes para la identificación animal y su aplicación en la trazabilidad animal. *Archivo Medicina Veterinaria* 38 (3) 197 - 206. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v38n3/art02.pdf>.
- Green, M.; Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Jain, S.; De Jesús, F.; Marchioro, G.; De Araujo, E. (2013). Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science Technology, Campinas*, 33(4): 753-756. Recuperado de: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v33n4/v33n4a22.pdf>.
- López Andreo, M. (2013). Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real. Tesis inédita de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV.
- Martínez, M.; Silva, M.; Badini R.; Aguilar, R.; Inga, M.; Tomasoni, M.; Spahn, G.; Poliotti, M.; Ackerman, B.; Brailovsky, V.; Bertinatti, A.; Grosso, N. (2010). Maní de Córdoba / Córdoba Peanuts: Denominación de Origen Certificada (DOC). XXV Jornada Nacional de Maní. Recuperado de: <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA.pdf>.
- Maurer, J. (2006). *PCR Methods in foods*. Athens, GA, USA. Springer Science.
- Menghi, A. (2002). Alergias e intolerancias alimentarias. *Invenio*, 5 (8): 123-132.
- Parzanese, M. Análisis de alérgenos en alimentos y control en la industria. Recuperado de: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_26_Analisis%20de%20alergenos%20en%20alimentos.pdf. (Consultado 2019).

- Piskata, Z.; Pospisilova, E.; Borilova, G. (2017). Comparative study of DNA extraction methods from fresh and processed yellowfin tuna muscle tissue. *International Journal of food properties*. 20 (S1): S430–S443.
- Plataforma Gestión de Alérgenos en Alimentos (2013). Guía para la gestión de Alérgenos en la Industria Alimentaria. INTA – ANMAT.
- Popping, B.; Díaz Amigo, C. (2014). Detección de Alérgenos, Organismos Genéticamente Modificados (OGM) e Identificación de Especies en Alimentos por Biología Molecular. Recuperado de: <https://inti.gob.ar/ue/pdf/publicaciones/cuadernillo10.pdf>.
- Promega. Technical Bulletin: Wizard® Magnetic DNA purification system for food. Part# TB 284; revised 4/09; USA.
- Rangel Rodríguez, C.; De la Rosa Carrillo, L. (2013). Proteínas en frutos secos: algo más que alérgenos. *Acta Universitaria*, 23 (5): 3-9.
- Rosas, M. (2006). Alergia e intolerancia alimentaria. *Ámbito farmacéutico*, 25 (7): 52 – 59.
- Sajali, N.; Wong, S.; Hanapi, U.; Jamaluddin, S.; Tasrip, N. y Desa, M. (2018). The challenges of DNA extraction in different assorted food matrices: A review. *Journal of Food Science*, 83 (10): 2409 - 2414.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. -
- Sánchez-Paniagua López, M.; Frutos Cabanillas, G.; Lobo Castañón, M.; López-Ruiz, M. (2014). Detección de alérgenos de cacahuete mediante un sensor de ADN [en línea]. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 80 (2): 377-392.
- Smaldini, P.; Orsini Delgado, M.; Fossati, A.; Docena, G. (2014). Avances en las inmunoterapias para alergias alimentarias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 50 (1): 61 - 75.
- Soares S.; Amaral J.; Oliveira M. y Mafra I. (2014). Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification. *Food Control* 48: 130 -136.


- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2 (2): 70-78. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- Thermo Scientific (2010). NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual - Thermo Fisher Scientific Inc. Recuperado de: www.nanodrop.com
- Vázquez, N.; Bachur, S.; Bello, M.; Binotti, S. (2014). Real time PCR: Identificación de especies de origen animal. Recuperado de: <https://ialimentaria.com.ar/real-time-pcr-identificacion-especies-origen-animal>
- Weijie, W.; Kunsong, C.; Changjie X. (2006). DNA quantification using Eva Green and a real-time PCR instrument. *Analytical Biochemistry*, 356: 303–305.


CAPÍTULO VI


PÓSTER

6.1 - PÓSTER

Trabajo presentado en el Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (Clicap 2018) – Universidad Nacional de Cuyo – San Rafael, Mendoza en abril de 2018.







COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA ANÁLISIS DE ALIMENTOS POR PCR

María Soledad Oltra, Guillermo Gaj-Medina, Fernando Dell Innocenti, Juan C. Rondán Escobar y Andrea Belaus
 Centro de Excelencia en Procesos y Productos de Córdoba (CEPROCOR), Sede Santa María de Yunta, Rebelión CEPROCOR (30254)
 e-mail: abelau@ceprocor.unccor.edu.ar

INTRODUCCIÓN


En los últimos años distintos países, incluido Argentina, han avanzado con regulaciones para garantizar la inocuidad alimentaria. Varios métodos moleculares se han propuesto como herramientas útiles para el análisis de alimentos. A pesar de que los métodos basados en el ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son altamente específicos, reproducibles, sensibles y caracterizados por el alto poder de discriminación, están fuertemente limitados por la presencia de inhibidores, abundantes en particular en muestras de alimentos. Los compuestos inhibidores pueden interferir en la reacción a diferentes niveles, desde disminución de la eficiencia hasta una inhibición completa de la actividad de la ADN polimerasa. Por lo tanto, los métodos basados en ADN son altamente dependientes de las técnicas de extracción y purificación del ADN. En particular, los métodos moleculares aplicados a muestras de alimentos requieren estrategias de extracción y purificación eficiente de los ácidos nucleicos y la remoción de numerosos compuestos inhibidores de PCR.

OBJETIVO

Comparar cuatro estrategias de extracción y purificación de ADN a partir de diferentes matrices alimentarias, considerando al rendimiento del método, la pureza del ADN y la amplificabilidad del ADN por qPCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se compararon dos kits comerciales (Nucleo Spin Food-Macherey-Nagel y Wizard Magnetic DNA Purification System for Food-Promega), y dos métodos estándares (CTAB y CTAB-RVP) esquematizados en la Figura 1. Se realizó la extracción y purificación de ADN por triplicado de dieciséis alimentos procesados de diferente naturaleza y disponibles comercialmente. El ADN purificado se cuantificó por espectrofotometría UV a 260nm y la calidad del mismo se estimó por la relación UV 260/280nm. Para evaluar la amplificabilidad del ADN obtenido se seleccionaron muestras y se amplificaron por qPCR por duplicado utilizando el kit SureFood Manti-BioPharm que detecta secuencias de ADN específicas de miel, considerando la información en la rotulación normalizada del envase.



RESULTADOS

Tabla 1: Cuantificación y relación de pureza de alimentos procesados por los distintos métodos.

| Alimento | Nucleo Spin Food | | Wizard Magnetic DNA Purification System | | CTAB | | CTAB-RVP | |
|---|------------------|------------|---|------------|--------|------------|----------|------------|
| | UV 260 | UV 260/280 | UV 260 | UV 260/280 | UV 260 | UV 260/280 | UV 260 | UV 260/280 |
| Almendras tostadas | 1.2 | 1.8 | 1.1 | 1.7 | 1.0 | 1.6 | 1.1 | 1.7 |
| Alfalfa deshidratada | 1.1 | 1.7 | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 1.0 | 1.6 |
| Alfalfa deshidratada (con miel) | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 0.8 | 1.4 | 0.9 | 1.5 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) | 1.1 | 1.7 | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 1.0 | 1.6 |
| Alfalfa deshidratada (con miel) (sin azúcar) | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 0.8 | 1.4 | 0.9 | 1.5 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) (sin azúcar) | 1.1 | 1.7 | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 1.0 | 1.6 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) (sin azúcar) (sin proteína) | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 0.8 | 1.4 | 0.9 | 1.5 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) (sin azúcar) (sin proteína) (sin fibra) | 1.1 | 1.7 | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 1.0 | 1.6 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) (sin azúcar) (sin proteína) (sin fibra) (sin agua) | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 0.8 | 1.4 | 0.9 | 1.5 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) (sin azúcar) (sin proteína) (sin fibra) (sin agua) (sin sales) | 1.1 | 1.7 | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 1.0 | 1.6 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) (sin azúcar) (sin proteína) (sin fibra) (sin agua) (sin sales) (sin minerales) | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 0.8 | 1.4 | 0.9 | 1.5 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) (sin azúcar) (sin proteína) (sin fibra) (sin agua) (sin sales) (sin minerales) (sin vitaminas) | 1.1 | 1.7 | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 1.0 | 1.6 |
| Alfalfa deshidratada (sin miel) (sin azúcar) (sin proteína) (sin fibra) (sin agua) (sin sales) (sin minerales) (sin vitaminas) (sin ácidos nucleicos) | 1.0 | 1.6 | 0.9 | 1.5 | 0.8 | 1.4 | 0.9 | 1.5 |

Figura 2: Gráfico de ADN purificado de muestras seleccionadas de acuerdo al contenido (A, B, C) en azúcar de miel (D), según información del rótulo de amplificadas por qPCR con el SureFood-Manti. A) Alfalfa con colorante blanco; B) Colorante para miel; C) Miel cruda y también refinada; D) Colorante (azúcar y miel). Además se amplifica control positivo y control de muestra (NPC). E) Valores de Ct para cada muestra ensayada por qPCR.

CONCLUSIÓN



- Los métodos evaluados permiten la extracción y purificación del ADN a partir de un grupo de matrices alimentarias.
- El ADN purificado es factible de amplificarse por qPCR.
- Necesidad de evaluar otras matrices alimentarias (principalmente ultraprocesados).

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1 - INSTRUCTIVOS

7.1.1 TÉCNICA ESTÁNDAR DEL BROMURO DE CETIL-TRIMETIL AMONIO

| | | | |
|---|---|-----------------------|------------------------|
|  GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA |  | I PBM 0001 | |
| Instructivo | Técnica estándar del Bromuro de cetil- trimetil amonio | Vigencia: dd/mm/aa | Rev.00 Pág. 83 de 2 |

1- Objetivo

Este procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por la Unidad de Biología Molecular para realizar la extracción y purificación de ADN en muestras de alimentos.

2- Alcance

Se aplica para extracción de ADN en muestras de alimentos que luego sea utilizado para amplificar por PCR.

3- Principio

El método está basado en las etapas de lisis con el buffer CTAB, extracción con solventes orgánicos y purificación mediante precipitación y separación por micro-centrifugación.

4- Desarrollo

4.1- Preparación de la muestra

4.1.1. En el caso de alimentos sólidos o semisólidos, homogenizar el alimento en mortero con nitrógeno líquido para facilitar su fino particulado; de tratarse de alimentos líquidos, homogeneizar bien previo al pesado. Pesar 500mg y colocar en tubo cónico.

4.2- Lisis

4.2.1. Añadir 1,5ml de buffer de lisis CTAB y homogeneizar; agregar 5µl de RNAasa. Incubar a 37°C por 5min.

4.2.2. Agregar 20µl de enzima PK (proteinasasa k) y colocar nuevamente en incubación a 65°C en baño seco por 30min con vortex cada 10min. Centrifugar a 8.000g por 5min en microcentrifuga; recoger 1.000µl del sobrenadante.

4.3- Extracción

4.3.1. Al sobrenadante anterior agregar 800µl de la mezcla de solventes cloroformo – alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por inversión unas diez veces y centrifugar por 15min a 14.500g. Extraer un volumen de fase acuosa (donde se encuentra el ADN).

4.4- Precipitación



4.4.1. Al volumen extraído en la etapa anterior, añadir 2,5 volúmenes de etanol al 100% frío (-20°C) y 0,1 volumen de acetato de sodio 3M, y almacenar a -20°C durante 30min para favorecer la precipitación del ADN. Luego centrifugar a 4°C a 14800g durante 15min.

4.4.2. Lavar con etanol al 70% frio, para eliminar restos de sales. Centrifugar nuevamente por 5min a 14.500g y desechar el sobrenadante; evaporar el remanente de etanol.

4.5- Recuperación del ADN

4.5.1. Re-suspender el pellet obtenido en buffer TE (Tris – EDTA) a un volumen final de 100µl.

7.1.2 TÉCNICA ESTÁNDAR DEL BROMURO DE CETIL-TRIMETIL AMONIO CON ADICIÓN DE PVP (POLIVINILPIRROLIDONA)

| | | | |
|---|--|-----------------------|------------------------|
|  GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA |  | I PBM 0002 | |
| Instructivo | Técnica estándar del Bromuro de Cetil-trimetil Amonio con adición de PVP (polivinilpirrolidona) | Vigencia: dd/mm/aa | Rev.00 Pág. 85 de 2 |

1- Objetivo

Este procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por la Unidad de Biología Molecular para realizar la extracción y purificación de ADN en muestras de alimentos.

2- Alcance

Se aplica para extracción de ADN en muestras de alimentos que luego sea utilizado para amplificar por PCR.

3- Principio

El método está basado en las etapas de lisis con el buffer CTAB y PVP extracción con solventes orgánicos y purificación mediante precipitación y separación por micro-centrifugación.

4- Desarrollo

4.1- Preparación de la muestra

4.1.1. En el caso de alimentos sólidos o semisólidos, homogenizar el alimento en mortero con nitrógeno líquido para facilitar su fino particulado; de tratarse de alimentos líquidos, homogeneizar bien previo al pesado. Pesar 500mg y colocar en tubo cónico.

4.2- Lisis

4.2.1. Añadir 1,0ml de buffer de lisis CTAB –PVP (1% de polivinilpirrolidona), y 20µl de β-mercaptoetanol; homogeneizar con vortex durante 30 segundos. Llevar a incubación en baño seco durante 1 hora a 65°C, con vortex cada 10min.

4.2.2. Centrifugar a 8.000g por 5min en microcentrifuga; recoger 1.000µl del sobrenadante.

4.3- Extracción

4.3.1. Al sobrenadante anterior agregar 800 µl de la mezcla de solventes cloroformo – alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por inversión unas diez veces y centrifugar por 15min a 14.500g. Extraer un volumen de fase acuosa (donde se encuentra el ADN).

4.4- Precipitación

4.4.1. Al volumen extraído en la etapa anterior, añadir 2,5 volúmenes de etanol al 100% frío (-20°C) y 0,1 volumen de acetato de sodio 3M, y almacenar a -20°C durante 30min para favorecer la precipitación del ADN. Luego centrifugar a 4°C a 14800g durante 15 min.

4.4.2. Lavar con etanol al 70% frío, para eliminar restos de sales. Centrifugar nuevamente por 5min a 14.500g y desechar el sobrenadante; evaporar el remanente de etanol.

4.5- Recuperación del ADN

4.5.1. Re-suspender el pellet obtenido en buffer TE (Tris – EDTA) a un volumen final de 100 µl.

7.1.3 NÚCLEO SPIN FOOD MACHEREY - NAGEL

| | | | | | |
|---|---|---|--|-----------------------|------------------------|
|  GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CORDOBA | |  | | I PBM 0003 | |
| Instructivo | Núcleo Spin Food Macherrey-Nagel | | | Vigencia: dd/mm/aa | Rev.00 Pág. 87 de 2 |

1- Objetivo

Este procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por la Unidad de Biología Molecular para realizar la extracción y purificación de ADN en muestras de alimentos utilizando el kit comercial NucleoSpin Food de Machery – Nagel.

2- Alcance

Se aplica para extracción de ADN en muestras de alimentos, que luego será utilizado para amplificar por PCR.

3- Principio

El ADN se extrae mediante la lisis con una solución que contiene sales caotrópicas, agentes desnaturalizantes y detergentes. Los residuos celulares son separados por centrifugación y/o filtración mientras el ADN se une a la membrana de sílica NucleoSpin® provista en las columnas del kit.

4- Desarrollo

4.1- Preparación de la muestra

4.1.1. En el caso de alimentos sólidos o semisólidos, homogenizar el alimento en mortero con nitrógeno líquido para facilitar su fino particulado; de tratarse de alimentos líquidos, homogeneizar bien previo al pesado. Pesar 500 mg y colocar en tubo cónico.

4.2- Lisis

4.2.1. Añadir 550µl de buffer CF, precalentado a 65°C. Mezclar cuidadosamente por 15s; agregar 10µl de Proteinasa K y agitar 2 ó 3s. Incubar a 65°C por 30min.

4.2.2. Centrifugar a 10.000g por 10min en microcentrifuga; recoger el sobrenadante en un tubo cónico.

4.3- Extracción

4.3.1. Al sobrenadante anterior agregar 1 volumen de buffer C4 y 1 volumen de etanol (por ejemplo, tomar 300µl de muestra y añadir 300µl de buffer C4 y 300µl de etanol). Aplicar vortex a la mezcla por 10s.

4.4- Unión del ADN

4.4.1. Para cada preparación, disponer una columna NucleoSpin® en un tubo para microcentrífuga. Pipetear 700µl de la mezcla anterior en la columna. Centrifugar por 1min a 11.000g. Descartar lo filtrado y repetir el procedimiento con el remanente de la mezcla de extracción que contiene la muestra.

4.5- Lavado y secado de la membrana de sílica

4.5.1. Primer lavado: pipetear 400µl de buffer CQW sobre la columna NucleoSpin®. Centrifugar por 1min a 11.000g. Descartar el líquido filtrado.

4.5.2. Segundo lavado: pipetear 700µl de buffer C5 sobre la columna NucleoSpin®. Centrifugar por 1min a 11.000g. Descartar el líquido filtrado.

4.5.2. Tercer lavado: pipetear otros 200µl de buffer C5 sobre la columna NucleoSpin®. Centrifugar por 2min a 11.000g. Descartar el líquido filtrado.

4.6- Elución y recuperación del ADN

4.6.1. Colocar la columna NucleoSpin® en un nuevo tubo para microcentrífuga de 1.5ml. Pipetear 100µl del buffer de elución CE, precalentado a 70°C sobre la membrana. Incubar por 5min a temperatura ambiente (18 – 25 °C). Centrifugar por 1min a 11.000g para eluir el ADN obtenido.

7.1.4 EXTRACCIÓN DE ADN PARA ALIMENTOS (WIZARD MAGNETIC)

| | | | |
|---|---|-----------------------|------------------------|
|  GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CORDOBA |  | I PBM 0004 | |
| Instructivo | Extracción de ADN para alimentos (Wizard Magnetic) | Vigencia: dd/mm/aa | Rev.00 Pág. 89 de 3 |

1- Objetivo

Este procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por la Unidad de Biología Molecular para realizar la extracción y purificación de ADN en muestras de alimentos utilizando el kit comercial Wizard Magnetic® para alimentos.

2- Alcance

Se aplica para extracción de ADN en muestras de alimentos, que luego será utilizado para amplificar por PCR.

3- Principio

El sistema utiliza partículas magnéticas (MagneSil®), en función de fase sólida móvil, sobre los que se produce la unión del ADN.

4- Desarrollo

4.1- Preparación de la muestra

4.1.1. En el caso de alimentos sólidos o semisólidos, homogenizar el alimento en mortero con nitrógeno líquido para facilitar su fino particulado; de tratarse de alimentos líquidos, homogeneizar bien previo al pesado. Pesar 500mg y colocar en tubo cónico de 2ml.

4.2- Lisis

4.2.1. Añadir 500µl de buffer de lisis A y 5µl de ARNasa a la muestra. Mezclar vigorosamente. Dependiendo de las características de la muestra, se puede ajustar el volumen agregado del buffer. Adicionar 250µl de buffer de lisis B

y mezclar con vortex durante 10 - 15s. Incubar a temperatura ambiente (22 – 25°C) por 10min.

4.3- Precipitación

4.3.1. Añadir 750µl de Solución de Precipitación; luego agitar vigorosamente.

4.3.2. Centrifugar a 13.000 g por 10 min en microcentrifuga; transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml. Si se ha formado una capa de material en la parte superior del tubo, extraer cuidadosamente con pipeta el líquido por debajo de la misma.

4.3.3. Agitar el envase con las partículas metálicas MagneSil®PMPs por 15 – 30s para asegurar que las partículas se re-suspendan completamente. Añadir 50µl de MagneSil®PMPs y agitar con vortex.

4.3.4. Adicionar 0.8 volúmenes de isopropanol (por ejemplo, para 1000µl de sobrenadante, añadir 800µl de isopropanol). Invertir el tubo entre 10 y 15 veces para mezclar el contenido. Incubar durante 10min a temperatura ambiente (22 – 25 °C), mezclando por inversión ocasionalmente con el cuidado de que no queden partículas en las paredes del tubo. Insertar el tubo en el Soporte magnético de separación (MagneSphere®) y dejarlo por 1min. Mientras el tubo permanece en el soporte, retirar y descartar la fase líquida por pipeteo.

4.3.5. Remover el tubo del soporte y añadir 250 µl de buffer de lisis B; invertir el tubo 2 -3 veces para mezclar. Reubicar el tubo en el soporte magnético y dejarlo por 1min; luego remover y descartar el líquido como en el paso anterior.

4.4- Recuperación del ADN

4.4.1. Re-suspender las partículas en 1 ml de solución de etanol al 70% y devolver el tubo al soporte magnético durante 1 minuto. Retirar y desechar la solución como en el paso 4.3.4.

4.4.2. Repetir el paso anterior dos veces para un total de 3 lavados. Con una pipeta, retirar la mayor cantidad de fase líquida como sea posible en el último lavado; descartar.

4.4.3. Secar las partículas a temperatura ambiente durante 15-30 minutos (o a 65 ° C durante 10 minutos). El tiempo de secado puede extenderse dependiendo de las condiciones ambientales.

4.4.4. Agregar 100µl de tampón TE o agua libre de nucleasa, agitar en vórtex para mezclar e incubara 65°C durante 5 minutos. Insertar el tubo en el soporte de separación magnética por 1min; luego recoger el ADN dejando el tubo en el soporte y transfiriendo cuidadosamente el líquido a un tubo nuevo.