

# Técnicas Biotecnológicas en Seguridad Alimentaria y Trazabilidad de los Alimentos

Se revisan los métodos biotecnológicos más sobresalientes para su empleo en la seguridad alimentaria: ELISA, Electroinmunotransferencia (Western Blot), Hibridación Southern (Southern Blot), PCR, biosensores.

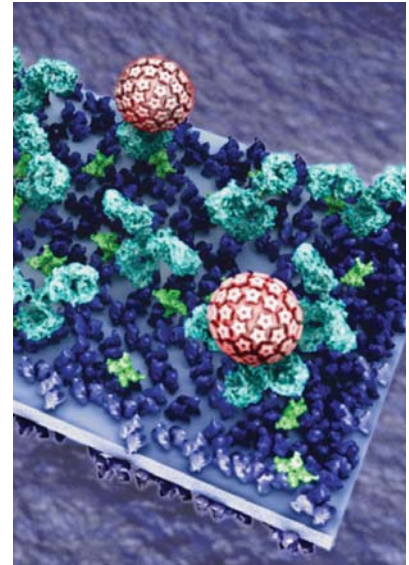


Foto: Bashir Biosensor Purdue University

## Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Es un método de detección basado en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. Permite la detección de distintas sustancias antigénicas mediante la unión de anticuerpos específicos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto es visible y puede ser medido. Esta reacción se produce debido a que el anticuerpo lleva unida (conjugada) una enzima, que suele ser peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina, que en presencia del sustrato adecuado genera un producto coloreado.

Los anticuerpos son proteínas sintetizadas por el sistema inmunológico como respuesta a la presencia de una sustancia extraña o antígeno, que se unen de manera selectiva a esta sustancia. Pueden ser monoclonales, que son aquellos que reconocen una región concreta de un antígeno, o policlonales que son aquellos que reconocen distintas regiones del antígeno.

De manera general el método que se utiliza es la inmovilización del antígeno sobre un sustrato generalmente plástico. Lo más frecuente es utilizar placas multipocillo, que contienen

distinto número de pocillos y pueden leerse de manera automática con lectores de placas, aunque pueden utilizarse otros soportes como tubos, tiras de nitrocelulosa o paletas, por ejemplo. La técnica consta de una serie de etapas que se describen a continuación:

- Inmovilización del antígeno. Se deposita la muestra en un pocillo y se incuba de modo que los antígenos tapicen la superficie del mismo.
- Tapizado con una proteína no específica para bloquear los huecos que queden sin tapizar por el antígeno con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos.
- Adición de los anticuerpos. Estos anticuerpos se unirán a aquellos antígenos específicos que se encuentren unidos en la superficie del pocillo.
- Tras varios lavados para eliminar aquellos anticuerpos que no se hayan unido, se procede a añadir el sustrato específico de la enzima conjugada al anticuerpo. Por la acción de esta enzima sobre el sustrato se produce la aparición de un producto coloreado cuya concentración puede medirse y si se dispone de una recta patrón relacionarse con una concentración determinada.

En ocasiones no se dispone de anticuerpos específicos contra una sustancia determinada conjugados con enzimas, por lo que es necesario realizar un ELISA indirecto, utilizando un segundo anticuerpo conjugado con una enzima que se une al anticuerpo primario.

Sobre este esquema general se pueden hacer distintas modificaciones. En ocasiones, en lugar de inmovilizar el antígeno se inmoviliza el anticuerpo, como por ejemplo cuando la concentración de antígeno es pequeña o no es posible realizar su inmovilización.

## Electroinmunotransferencia (Western Blot)

Es una técnica inmunoenzimática que se utiliza para la detección de proteínas. Se basa en la separación de las proteínas de una muestra en función del tamaño mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y una detección posterior con anticuerpos específicos contra la proteína que se desea detectar.

Permite determinar el contenido relativo de proteínas presente en diferentes muestras.

El método consta de distintas fases:

- Separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS de las proteínas. El SDS es un agente desnaturante de proteínas que provoca la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de las mismas, de modo que adquieren todas la misma forma. Además les proporciona carga neta negativa, de modo que la separación se realiza en función del tamaño.
- Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.
- Incubación de la membrana con proteínas inespecíficas para bloquear los sitios de unión de anticuerpos a la membrana.
- Adición de un anticuerpo primario contra las proteínas que se quieren detectar.
- Adición de un anticuerpo secundario conjugado con una enzima, que reconoce al anticuerpo primario.
- Revelado.

## Hibridación Southern (Southern Blot)

Es una técnica de hibridación que se utiliza para la detección de secuencias de ADN concretas dentro de una mezcla compleja. Consiste en la separación de fragmentos de ADN en función del tamaño mediante una electroforesis en geles de agarosa, su transferencia a membranas de nitrocelulosa o nylon y posterior incubación con sondas de ADN complementarias a las regiones que se desea detectar. Estas sondas en caso de que existan fragmentos complementarios hibridarán con ellos pudiéndose detectar marcaje. Las etapas de las que consta esta técnica son:

- Fragmentación del ADN problema mediante endonucleasas de restricción.

- Electroforesis en condiciones desnaturantes con urea o formaldehído para obtener ADN de cadena sencilla.
- Transferencia a una membrana de nylon o nitrocelulosa. Una vez las bandas se han transferido a la membrana es necesario fijarlas de manera irreversible mediante tratamiento a 80-85 °C en el caso de las membranas de nitrocelulosa o con luz ultravioleta en el caso de las membranas de nylon.
- Prehibridación de la membrana con ADN heterólogo para bloquear los sitios de unión que han quedado libres y evitar uniones inespecíficas de las sondas.
- Hibridación con la sonda y revelado del filtro para detectar con qué bandas ha hibridado la sonda.

## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR en sus siglas en inglés) es un método de análisis rápido y sencillo que permite la detección y amplificación de fragmentos específicos de ADN. La polimerasa es una enzima cuya actividad es la síntesis de una cadena de ADN complementaria a una cadena de ADN sencilla. Para ello necesita la presencia de pequeñas secuencias de ADN denominadas cebadores que deben ser complementarias de los extremos de la secuencia que se desea ampliar. La PCR consta de tres pasos que se repiten un número determinado de ciclos:

- Separación del ADN para que se encuentre en forma de cadena sencilla.
- Unión de los cebadores al ADN de cadena sencilla.
- Síntesis de la cadena complementaria de ADN a partir de los cebadores.

La repetición de estos ciclos hace que la cantidad del fragmento de ADN que se está amplificando aumente de

manera exponencial, de modo que aunque se parta de una cantidad muy pequeña al final de un número determinado de ciclos se obtendrá una cantidad muy importante.

El diseño de los cebadores es muy importante y su especificidad dependerá del tipo de amplificación que se desee hacer, pudiendo utilizarse cebadores específicos, semiespecíficos o arbitrarios.

Pueden realizarse análisis por PCR de tipo cualitativo o cuantitativo.

## Análisis cualitativo de ADN mediante PCR

Este tipo de análisis permite detectar la presencia o ausencia de determinadas secuencias de ADN en una muestra, como secuencias características de determinados organismos o secuencias indicativas de la presencia de transformación genética, como en el caso de los OMGs.

## Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP)

Es un método rápido de identificación basado en la aplicación de enzimas de restricción, que son enzimas que cortan la molécula de ADN en puntos denominados dianas. Dependiendo de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN aparecerán distintas dianas y al tratarla con enzimas de restricción se originarán fragmentos de restricción de distinta longitud. Estos fragmentos pueden analizarse mediante técnicas de hibridación con sondas marcadas en membranas, permitiendo la detección de mezclas de especies.

Es un método rápido, con gran sensibilidad y no requiere un conocimiento previo de la secuencia de la muestra.

El inconveniente que presenta es que pueden existir variaciones intraes-

pecíficas y en ocasiones puede ser poco repetitivo, ya que pequeñas variaciones en los protocolos dan como resultado grandes diferencias en los patrones.

### Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción de satélites (SFLP)

Es una variación del RFLP en la que se analizan los polimorfismos de los fragmentos de restricción de satélites. El ADN satélite se encuentra en los centrómeros de los cromosomas y se caracteriza por contener un número repetido de secuencias de longitud variable. Se utilizan para la identificación de especies híbridas o con una gran homología.

### Análisis de conformación de polimorfismos de cadena sencilla (PCR-SSCP)

Esta técnica permite detectar diferencias puntuales en la secuencia de bases de una hebra de ADN. La técnica consiste en la amplificación mediante PCR de una secuencia concreta de una mezcla de ADN. Los productos de esta amplificación se desnaturalizan y se permite que vuelvan a renaturalizar rápidamente, favoreciendo la formación de apareamientos intracatenarios, que son dependientes de la secuencia de bases de la hebra de ADN y provocarán que ésta adquiera una conformación específica. Mediante una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida, se realiza la separación de estas moléculas en función de la forma, ya que todas tienen el mismo tamaño. De este modo se obtiene un patrón electroforético que puede compararse con patrones conocidos.

### Análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD)

Se utilizan cebadores de tamaño pequeño y secuencia arbitraria con una especificidad de unión menor, lo que permite una amplificación de secuen-

cias al azar. El resultado de la amplificación mediante estos cebadores es un conjunto de fragmentos de distinta longitud en función de en qué lugares se encuentren las secuencias complementarias de los cebadores empleados. Estos fragmentos pueden ser empleados para construir mapas genéticos de gran variedad de especies.

Es una técnica muy empleada cuando se dispone de alta variedad de muestras con el fin de diferenciar especies sin información previa de su secuencia.

Las ventajas que presentan es que los cebadores son universales y no es necesario disponer de grandes cantidades de ADN, no es necesario utilizar sondas ni hibridaciones y son métodos relativamente sencillos y rápidos. Como inconvenientes presentan problemas de reproductibilidad.

### Amplificación multiplexada

Permite la amplificación de más de una secuencia de una muestra de ADN. La detección e identificación de varias secuencias disminuye los tiempos de manipulación.

### **Análisis cuantitativo de ADN mediante PCR**

Este tipo de análisis permite cuantificar la cantidad total de una o varias secuencias de ADN presentes en una muestra. Es importante la utilización de este tipo de métodos, por ejemplo, para el etiquetado de los alimentos.

### PCR Anidada

Se trata de una modificación de la PCR en la que en lugar de dos cebadores se utilizan cuatro, dos externos y dos internos. La amplificación se realiza en dos tandas. En la primera se utilizan los cebadores externos y se amplifica una secuencia de ADN, a partir de la cual se realiza una segunda ronda de amplificación con los ceba-

dores interiores. Este método confiere una mayor especificidad y una mayor sensibilidad, por lo que es útil en los casos en los que se presupone que existe un bajo porcentaje de OMGs. Además, no requiere el aislamiento previo del ADN.

### PCR Competitiva

Se utiliza un ADN competidor que tiene la misma secuencia complementaria al cebador, de modo que se amplifica el ADN diana de la muestra y el ADN competidor. A partir de las cantidades obtenidas de ambos productos amplificados se estima estadísticamente la proporción real de ADN diana y de ADN competidor.

### PCR en tiempo real

Este sistema se basa en la medición de la fluorescencia emitida por una sonda específica del ADN diana marcada con un fluorocromo no radioactivo, que se añade a la reacción de PCR convencional y cuya emisión de fluorescencia depende directamente de la síntesis del nuevo ADN. La fluorescencia emitida es recogida a través de una fibra óptica y leída por un láser.

Mediante el registro del contenido de la emisión de fluorescencia en cada ciclo se puede monitorizar de manera continua el incremento de los productos amplificados durante la reacción de PCR.

### Dilución límite de PCR

Consiste en la dilución de la muestra de ADN a concentraciones conocidas hasta llegar al punto límite de la dilución, que se corresponde con el umbral de amplificación del ADN, permitiendo establecer una correlación con la cantidad de ADN presente en la muestra.

### **Secuenciación**

La secuenciación del ADN se utiliza habitualmente como técnica

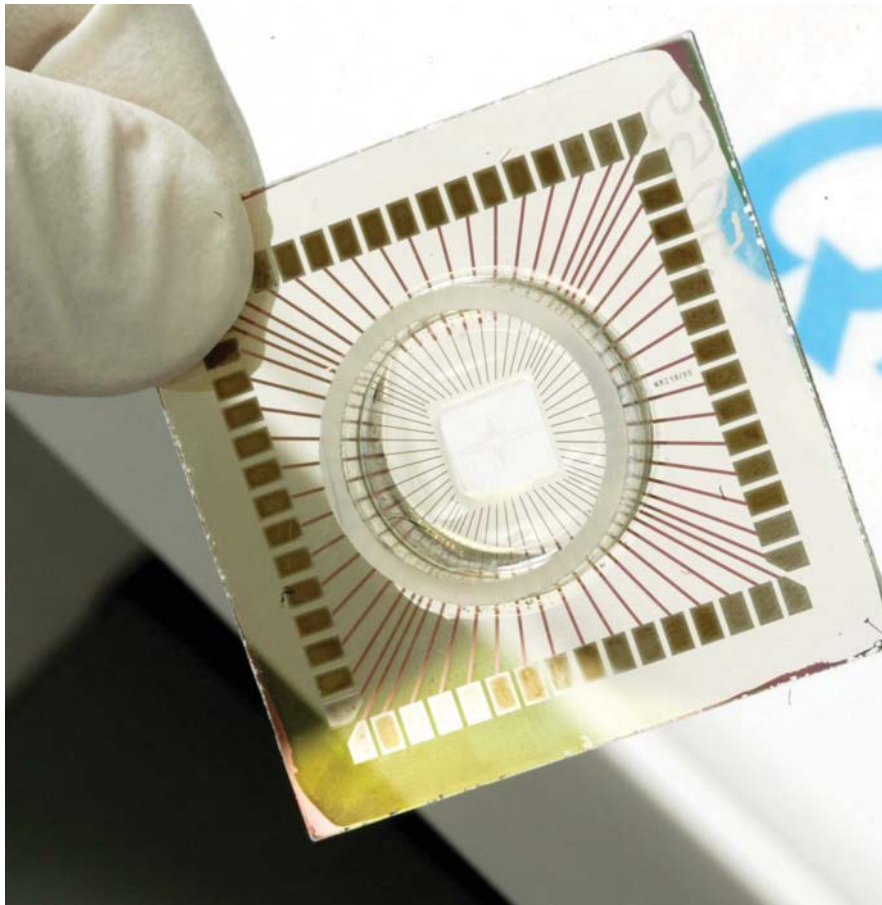


Foto: Qinetiq

de comprobación o confirmación positiva de la presencia de un ADN determinado, tras su detección por PCR. Por tanto, el material a detectar suele ser ADN amplificado producto de PCR. Habitualmente es utilizada en estudios de autenticación genética de alimentos, ya sea para autenticación de especies o detección de componentes de origen animal o vegetal no deseados.

Los diferentes tipos de secuenciación aplicados se basan en la técnica desarrollada por Sanger en 1974, basada en la utilización de análogos de base (dideoxy) marcados que provocan la finalización de cadena. La principal diferencia entre el método enzimático de terminación de cadena y el método automático de secuenciación radica, en primer lugar en el tipo de marcaje. En el método automático en vez de

radiactividad se utiliza fluorescencia y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los ADNs de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción.

La segunda diferencia radica en el sistema de detección de los fragmentos de ADN. La detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel. Este sistema permite aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y, por consiguiente, en cada secuenciación.

La secuenciación de cadena simple consiste en la secuenciación de un fragmento de ADN, mediante una sola reacción. La secuenciación de cadena simple proporciona una excelente calidad de lectura, que en la mayoría de los casos alcanza una fiabilidad superior al 98%. El tamaño medio de las lecturas que se obtiene oscila entre las 650- 700 pares de bases, y se realiza generalmente a partir de cebadores específicos utilizados durante la PCR. La secuenciación analítica consiste en la secuenciación completa de una de las cadenas del ADN de la muestra. Se recomienda esta modalidad de secuenciación cuando se desea obtener la secuencia completa de un producto de PCR o de un ADN clonado cuando el tamaño del amplificado o del inserto sea superior a 1 kilobase.

Existen diversas técnicas emergentes de secuenciación de ADN con diversas aplicaciones: secuenciación por hibridación (SBH), visualización directa por microscopía de fuerza atómica (AFM), secuenciación de molécula sencilla y secuenciación de nucleótido simple mediante suspensión en vacío. Dentro de ellas destacamos el FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing).

FINS es una técnica de secuenciación de ADN de muestras biológicas mediante la amplificación con marcadores fluorescentes de distinto color que permiten identificar la secuencia de nucleótidos. Se trata de un método indirecto por el que las secuencias obtenidas se comparan con secuencias pertenecientes a otras especies, lo que permite el análisis filogenético de las mismas. Se utiliza para la identificación de especies pesqueras de interés comercial, normalmente como método de confirmación tras la utilización de otras técnicas cualitativas de PCR.

## Biosensores

Los biosensores son dispositivos de análisis compactos, que incorporan un elemento de reconocimiento biológico o biomimético asociado a un sistema de transducción que permite amplificar, almacenar y registrar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito.

Como consecuencia de la interacción específica entre el elemento de reconocimiento y el analito se produce una variación en las propiedades físico-químicas que pueden ser variaciones de pH, transferencias de electrones, generación de calor, cambios de masa, cambios en las propiedades ópticas, etc. Estas variaciones dependen del tipo de elemento de reconocimiento que incorpora el biosensor.

De manera general los elementos de reconocimiento pueden clasificarse en función del tipo de interacción que se produce con el analito en biosensores de tipo biocatalítico y de bioafinidad. La elección de un tipo de elemento de reconocimiento u otro se hace en función del tipo de analito que se desee detectar.

Los elementos de tipo biocatalítico son los más utilizados y se basan en la utilización de biocatalizadores que pueden ser enzimas o sistemas enzimáticos aislados u orgánulos subcelulares, células o tejidos completos que contienen estos sistemas enzimáticos. Los biocatalizadores son elementos que favorecen que ocurra una reacción química en la cual a partir de uno o varios sustratos se forman uno o varios productos, sin que exista consumo del biocatalizador, que se regenera y puede ser utilizado de nuevo. Permiten detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción mediante la monitorización de la aparición de algún producto conocido

o la desaparición de algún cosustrato conocido distinto de aquel sustrato que se quiere detectar.

Los sistemas biocatalíticos son muy sensibles a determinadas sustancias tóxicas como insecticidas, herbicidas, detergentes o metales pesados cuya presencia puede inhibir su actividad de manera específica. Esta característica hace que puedan utilizarse para detectar la presencia de estos inhibidores, ya que si en presencia de los sustratos adecuados no se produce la aparición de los productos correspondientes significa que en la muestra existe una sustancia tóxica que inhibe la reacción.

Permiten detectar aditivos, plaguicidas, fertilizantes, metales pesados, antinutrientes, toxinas, aminas biógenas, etc.

Los elementos de reconocimiento de bioafinidad se basan en la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito de interés sin que exista consumo del analito o aparición de productos, sino que la interacción conduce a la formación de un complejo analito-elemento de reconocimiento. La formación de este complejo puede detectarse de manera directa monitorizando los cambios que se producen en la masa de la superficie en la que se encuentra inmovilizado el elemento de reconocimiento o por cambios en las propiedades de la luz que se producen como consecuencia de la unión del analito, o mediante el marcaje de uno de los elementos del complejo con enzimas, colorantes, etc.

Existen distintos tipos de receptores de bioafinidad entre los que se incluyen anticuerpos, lectinas, receptores celulares, ácidos nucleicos, polímeros de impresión molecular, aptámeros y PNAs. Algunos de estos elementos se utilizan aislados de su medio natural

e inmovilizados sobre la superficie del biosensor y otros se pueden utilizar en su medio natural (células completas que expresan receptores de membrana, etc). Mediante este tipo de biosensores se puede detectar fármacos, aditivos, contaminantes orgánicos, alérgenos, toxinas y microorganismos.

El segundo constituyente del biosensor es el sistema de transducción, que detecta la variación que se produce en las propiedades físico-químicas como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento y la transforma en una señal electrónica que puede ser amplificada, almacenada y registrada. En algunos casos la señal generada por el transductor no puede ser interpretada directamente y es necesario la utilización de herramientas informáticas que analicen esta señal y la traduzcan en la información requerida.

Existen distintos tipos de transductores y su elección se hace en función de cuál sea la variación en las propiedades físico-químicas que se produzca como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. Los principales tipos de transductores son:

- Electroquímicos. Detectan cambios en el potencial o el pH o la aparición de sustancias electroactivas.
- Ópticos. Detectan variaciones en las propiedades de la luz, como la absorción, fluorescencia, luminiscencia, dispersión o cambios en el índice de refracción. Incluyen transductores de resonancia de plasmones superficiales, resonancia de espejos, onda evanescente y optodos.
- Acústicos o piezoeléctricos. Detectan cambios directos de masa en la superficie del biosensor como consecuencia de la formación del complejo analito-elemento de reconocimiento.

- Termométricos. Detectan el calor generado en las reacciones enzimáticas exotérmicas.
- Nanomecánicos. Detectan la respuesta nanomecánica que se produce en la superficie del biosensor, que en este caso es una micropalanca, como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito.

### Otras técnicas

Existe una serie de técnicas analíticas no biotecnológicas de uso común en seguridad alimentaria a las que es conveniente hacer referencia ya que, en algunos casos, sirven como complemento a las técnicas biotecnológicas ya referidas y, en otros, suponen potentes herramientas de proteómica aplicada a la seguridad alimentaria. Así, por ejemplo, la identificación de proteínas mediante huella peptídica a través de la espectrometría de masas MALDI-TOF o mediante espectrometría de masas en tándem MS/MS, y sus aplicaciones a la secuenciación de péptidos han permitido la identificación y caracterización de determinadas proteínas de carácter tóxico y/o alergénico.

En la ionización MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) los analitos cocrystalizados con una matriz apropiada son convertidos en iones mediante la acción de un láser. Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-Of-Flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico. Al cocrystalizar con los analitos, la matriz, generalmente un ácido aromático sustituido, dificulta las interacciones analito-analito y actúa como intermediaria en el proceso de transferencia de energía del haz láser a los analitos. En el proceso de conversión de las moléculas neutras de analito a

especies cargadas o iones (generalmente protonados), la matriz juega un papel fundamental al ceder protones a los analitos. Suele emplearse un láser de nitrógeno pulsado, que emite a 337 nm, para irradiar una pequeña área del portamuestras (algunos mm<sup>2</sup>) sobre el que ha cocrystalizado la mezcla muestra-matriz. La matriz absorbe energía del pulso láser y la transfiere a los analitos, los cuales se desorben e ionizan. En la detección de iones suelen emplearse multiplicadores de electrones secundarios que, mediante un proceso de avalancha, transforman las partículas incidentes en señales eléctricas medibles. Los detectores empleados en las medidas con analizadores TOF se basan en placas de microcanales compuestas de millones de canales diminutos recubiertos internamente de un material semiconductor.

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es una técnica analítica cualitativa y cuantitativa. En muchas ocasiones se acopla un cromatógrafo de líquidos o de gases para separar las proteínas de interés, u otras macromoléculas para que, una vez separadas, se puedan identificar por métodos de espectrometría de masas en tándem mediante secuenciación de fragmentos concretos. Esta técnica permite secuenciar aminoácidos para después identificar la proteína que forman, estudiar polisacáridos, glicoproteínas, proteoglicanos, ácidos nucleicos, polímeros orgánicos de síntesis, etc. En general, estos sistemas se diseñan de tal forma que, en una primera etapa se selecciona el ión de interés según su masa y en una segunda etapa, este ión se hace chocar con gas helio o argón para inducir su fragmentación. Finalmente los fragmentos se analizan en un segundo espectrómetro. El software de que se dispone permite determinar homologías con proteínas ya conocidas, identificar variantes genéticas, etc. La técnica MS/MS es de

gran ayuda en la caracterización estructural de compuestos desconocidos y en el análisis específico de muestras en matrices biológicas, bioclínicas o de otra naturaleza, sin necesidad de una separación previa. Otras técnicas empleadas para la secuenciación de péptidos son HPLC-Trampa iónica o HPLC-MALDI-TOF.

La espectroscopia infrarroja cercana (NIR) y la no dispersiva (NDIR) permiten el análisis de biomoléculas de forma no destructiva y en un tiempo muy corto, generalmente inferior al minuto. Se utiliza para la identificación de moléculas orgánicas y organometálicas, así como para la identificación de pesticidas y biotoxinas. La alta selectividad del método hace posible la estimación de un analito en una matriz compleja. Este método implica el análisis de los movimientos de torsión, rotatorios y de vibración de los átomos en una molécula, de forma que mediante comparación con patrones establecidos permite la detección de determinados compuestos. Se ha utilizado recientemente con éxito en la detección de transgénicos en los que los contenidos de determinadas biomoléculas se ven alterados por efecto del ADN exógeno.

Por último la SNIF-NMR (Site-specific Natural Isotopic Fractionation) se basa igualmente en el análisis de la estructura molecular a escala atómica mediante resonancia magnética nuclear. Cada biomolécula o sustancia en general presenta un patrón atómico específico identificable a partir de su comparación con los patrones almacenados en bases de datos.

#### Fuente:

Aplicaciones de Biotecnología en Seguridad Alimentaria. AESA/Genoma España, 2005.