



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

SISTEMA DE DETECCIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS MEDIANTE BIOSENSADO GENÉTICO

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso académico: 2018-2019

Valencia, septiembre 2019

Marta Villamayor Belinchón

Tutor: Dr. Luis Antonio Tortajada Genaro

Directora experimental: Ana Lázaro Zaragoza

TITULO

Sistema de detección de gluten en alimentos mediante biosensado genético

RESUMEN

La protección del consumidor frente enfermedades de origen alimentario y prácticas fraudulentas exige métodos capaces de detectar la presencia de ciertos componentes críticos, tales como alérgenos o ingredientes ilícitos. Los métodos convencionales, basados en la espectrofotometría, cromatografía y técnicas bioanalíticas, necesitan un importante tratamiento de muestra y presentan limitaciones en cuanto a la duración de los ensayos, portabilidad y coste por análisis.

El objetivo de este TFG ha sido el desarrollo de un método alternativo basado en la detección de genes que codifican proteínas alergénicas y característicos de los ingredientes asociados a prácticas ilícitas. Las dianas han sido α -*gliadina* para el gluten, *soybean lectin S* para la soja, *trnL* para cereales, *tRNA-Leu* para vegetales y *16S ribosomal RNA* para animales. El método propuesto consiste en la extracción de ADN de las muestras alimentarias, amplificación de la región específica y detección óptica. Además, para favorecer su implementación en la industria, se ha estudiado una metodología de ensayo e interpretación sencilla y de bajo coste.

Los experimentos desarrollados incluyen la optimización de la reacción de amplificación y el modo de detección basado en nanopartículas de oro (15 nm diámetro, $\lambda_{\text{absorción, agregado}}=650$ nm, $\lambda_{\text{absorción, disgregado}}=520$ nm). Se estudió las prestaciones analíticas del sistema, obteniéndose excelente sensibilidad (ADN genómico 10 pmol), selectividad (ausencia de amplificación inespecífica) y reproducibilidad (desviación 2-11 %). También, se estableció la influencia del efecto matriz, mediante un estudio de distintas formulaciones de alimentos. El método se aplicó al análisis de alimentos actualmente comercializados.

Los resultados han indicado que es posible su integración en un sistema de biosensado competitivo según las necesidades de la industria alimentaria, facilitando un mejor control de la seguridad alimentaria y de los fraudes.

PALABRAS CLAVE: Alimentos, alergia, gluten, cereales, carne, PCR, biosensor óptico.

Autora: Marta Villamayor Belinchón

Tutor: Luis Antonio Tortajada Genaro

Directora experimental: Ana Lázaro Zaragoza

TFG realizado en los laboratorios del departamento de química y el Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM).

TITLE

Gluten detection system in food by genetic biosensing

ABSTRACT

Protect consumer against foodborne illnesses and fraudulent practices requires methods capable of detecting the presence of certain critical components, such as allergens and illicit ingredients. Conventional methods such as spectrometry and chromatography and bioanalytical techniques, require an important sample treatment and have limitations regarding to assay duration, portability and analysis cost.

The objective of this project was the development of an alternative method based on the detection of genes that encode proteins related to food allergies and ingredients associated with illegal practices. The targets were α -gliadin for gluten, *soybean lectin S* for soya beans, trnL for cereals, *tRNA-Leu* for vegetables and *16S ribosomal RNA* for animals. The proposed method consisted of the DNA extraction of food samples, the amplification of the specific region and its subsequent optical detection. Furthermore, easy interpretation and low-cost assay platform were studied in order to foster its implementation in the industry.

The experiments developed include amplification reaction optimization and its detection mode using gold nanoparticles (15 nm diameter, $\lambda_{\text{absorption, aggregated}}=650$ nm, $\lambda_{\text{absorption, disgregated}}=520$ nm). System analytic properties had been studied, obtaining excellent sensibility (genomic DNA 10 pmol), selectivity (absence of interspecific amplification) and reproducibility (standard deviation 2-11 %). Furthermore, the influence of matrix effect was established by studying different food formulations. The method was applied in already commercialized products.

The results show that it is feasible its integration as a competitive biosensing system according to food industry demands to facilitate a better control over food security and frauds.

KEYWORDS: Food, allergy, gluten, cereals, meat, PCR, optical biosensor.

Author: Marta Villamayor Belinchón

Tutor: Luis Antonio Tortajada Genaro

Experimental director: Ana Lázaro Zaragoza

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado a completar este trabajo fin de grado.

En primer lugar, a Luis A. Tortajada, por permitirme trabajar bajo su tutela, así como por su implicación y el tiempo dedicado a resolver todos los contratiempos que han aparecido.

En segundo lugar, a todos los investigadores del grupo, por estar dispuestos a resolver mis dudas y por todos los buenos momentos que he pasado en el laboratorio. Especialmente a Ana, por todo el tiempo que me ha dedicado y estar siempre dispuesta a ayudarme y aconsejarme.

Finalmente, a mi familia y amigos que han estado conmigo desde el principio ayudándome, soportándome y compartiendo buenos momentos.

Gracias a todos por estar a mi lado.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	SEGURIDAD ALIMENTARIA Y FRAUDE.....	1
1.2.	ALERGIA ALIMENTARIA.....	1
1.3.	PREVENCIÓN Y CONTROL.....	4
1.4.	MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ALERGIAS.....	5
1.5.	MÉTODOS ALTERNATIVOS DE DETECCIÓN.....	7
2.	OBJETIVOS.....	10
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1.	EXTRACCIÓN ADN.....	11
3.2.	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIONES DIANA.....	11
3.3.	BIOSENSADO MEDIADO POR NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1.	EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS ALIMENTARIAS.....	15
4.2.	AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR DE PUNTO FINAL.....	17
4.3.	AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR EN TIEMPO REAL.....	21
4.4.	BIOSENSADO MEDIADO CON NANOPARTICULAS DE ORO.....	22
4.5.	APLICACIÓN: ANÁLISIS DE MUESTRAS ALIMENTARIAS.....	25
4.6.	APLICACIÓN: DETECCIÓN DE INGREDIENTES FACULTATIVOS.....	29
5.	CONCLUSIONES.....	33
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapa de sensibilización de la respuesta medida por IgE.

Figura 2. Etapa de reacción de la respuesta medida por IgE. Fase inmediata.

Figura 3. Mecanismo de reacción inmunológica de la celiaquía. Fuente: Leffler, Green, & Fasano, 2015.

Figura 4. Esquema de las principales técnicas utilizadas.

Figura 5. Esquema de los componentes de un biosensor.

Figura 6. Variación de coloración de las disoluciones coloidales en función del diámetro de las Au-NPs.

Figura 7. Grado de presencia del gen trnL en cebada (*Hordeum vulgare*). Herramienta: BLAST.

Figura 8. A) Representación del contenido en ADN en función de la humedad de cada alimento. B) Diagrama de caja sobre la concentración neta en ADN extraído (ADN_n) en función del tipo de procesado que ha sufrido el alimento.

Figura 9. Señal registrada de la amplificación por PCR en harina de trigo y longaniza de pollo. A) Efecto de la temperatura de hibridación de los cebadores. B) Efecto de la concentración de los cebadores. C) Efecto del número de ciclos de la reacción. D) Equipo de termociclador utilizado en el laboratorio. Gen: trnL. Réplicas: 3.

Figura 10. Señal registrada en fluorescencia y fotografía electroforesis del producto de amplificación por PCR en harina de trigo (A) y longaniza de pollo (B). Gen: trnL. Réplicas: 3.

Figura 11. Señal registrada de la amplificación por PCR en diluciones de harina de trigo en agua. Gen: trnL. Réplicas: 3.

Figura 12. Señal registrada de la amplificación por qPCR en harina de trigo, longaniza de pollo y agua. A) Número de ciclos de la reacción. B) Curva temperatura de fusión. Gen: trnL.

Figura 13. Señal registrada de la amplificación por qPCR en diluciones de harina de trigo en agua, harina de trigo, longaniza de pollo y agua. A) Número de ciclos de la reacción. B) Número de ciclos necesarios para superar el límite de fondo (Ct) en función de la concentración de ADN genómico añadido. C) Curva temperatura de fusión. D) Equipo de termociclador utilizado para qPCR. Gen: trnL. Réplicas: 2.

Figura 14. Esquema ilustrativo de método de detección colorimétrico con partículas de oro. Adaptada de F. Li et al., 2018.

Figura 15. Fotografías de la evolución del cambio de coloración desde el momento de adición de NaCl hasta 30 min después.

Figura 16. Absorbancias registradas en la detección con Au-NPs en harina de trigo y mezcla de productos negativos. A) Efecto de la concentración de NaCl. B) Efecto tiempo transcurrido tras la adición de NaCl. C) Efecto relación Au-NPs:ADN. D) Espectro de absorbancia. Gen: trnL. Réplicas: 2.

Figura 17. Diagrama de caja sobre la fluorescencia obtenida en los grupos positivos y negativos de muestras de alimentos para cada gen. Test t; ***: p-valor <0,0001; **:p-valor<0,001.

Figura 18. Señal registrada de la amplificación por qPCR en harina de trigo, longaniza de pollo y agua. A) Número de ciclos de la reacción. B) Curva temperatura de fusión. Gen: α -gliadina.

Figura 19. Señal de fluorescencia registrada del producto de la mezcla de alimentos extraídos y previa extracción. Gen: trnL. Réplicas: 3.

Figura 20. Señal registrada de la amplificación por qPCR en mezclas de harina y longaniza, harina de trigo, longaniza de pollo y agua. A) Número de ciclos de la reacción. B) Curva temperatura de fusión. C) Número de ciclos en función del porcentaje de cereal. Gen: trnL. Réplicas: 2.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y caracterización de los tipos de alergias alimentarias. Fuente: Rodrigo, Salcedo & Urruzuno.

Tabla 2. Listado y características de los cebadores diseñados. Herramienta: OligoCalc.

Tabla 3. Caracterización de la pureza en función del procesado de las muestras extraídas mediante el método CTAB.

Tabla 4. Análisis ANOVA sobre la variación de la concentración de ADN extraído en función del tipo de procesado.

Tabla 5. Pruebas de múltiples rangos para la identificación de grupos homogéneos.

Tabla 6. Porcentaje de complementariedad entre los genes estudiados en distintas especies alimentarias. Herramienta: BLAST.

Tabla 7. Resultados de los alimentos analizadas mediante PCR y detección fluorescente para los distintos genes.

Tabla 8. Prueba-t student sobre las señales de fluorescencia de los productos de PCR generados en los grupos positivos y negativos de muestras de alimentos.

Tabla 9. Resultado visual e instrumental de las muestras alimentarias mediante el método basado en nanopartículas de oro.

Tabla 10. Comparación de los resultados obtenido en el análisis de alimentos para los distintos métodos desarrollados.

Tabla 11. Resultado instrumental y visual obtenidos a partir de las mezclas de harina de trigo con longaniza de pollo. Gen: trnL.

Tabla 12. Análisis ANOVA sobre la variación de la absorbancia a 650 nm en función del porcentaje de harina de trigo.

Tabla 13. Pruebas de múltiples rangos para la identificación de grupos homogéneos.

Tabla 14. Análisis del tiempo y coste por réplica del método mediado por nanopartículas de oro.

ABREVIATURAS

APC: Célula presentadora de anticuerpos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la varianza

Au-NPs: Nanopartículas de oro

HLA: Antígeno leucocitario humano

IgE: Inmunoglobulina E

NaCl: Cloruro de sodio

pb: Par de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RCF: Fuerza centrífuga relativa

rpm: Revoluciones por minuto

TG2: Transglutaminasa 2

Tm: Temperatura de fusión

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SEGURIDAD ALIMENTARIA Y FRAUDE

Las capacidades actuales de la industria alimentaria permiten la obtención de productos cada vez más adaptados a las necesidades y gustos del consumidor (Mariné Font, Vidal Carou, & Carou, 2001). Estos deben realizarse siguiendo una gestión adecuada de los recursos que permitan obtener productos alimentarios con las propiedades deseadas. No obstante, lograr alimentos con altos estándares de seguridad, no solo se consigue con la implicación de una empresa de forma aislada, sino que es necesario el compromiso de todas las empresas que forman parte de la cadena alimentaria. Asimismo, las autoridades deben velar no únicamente por que se garantice la seguridad de los alimentos comercializados, sino también para conseguir la ausencia de prácticas fraudulentas.

Afortunadamente, la población cada vez se encuentra más comprometida con la seguridad alimentaria y presenta un mayor rechazo a las actividades ilícitas, tal y como respaldan los datos proporcionados el 7 de junio del 2019 por el Eurobarómetro, publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), realizado sobre 27.655 europeos (AECOSAN, 2019)

En el estudio se indica que dos de cada cinco europeos se interesan personalmente en la seguridad alimentaria, y uno de cada cinco indica que es su mayor preocupación. Por otro lado, los factores que más influyen a los consumidores europeos en el momento de realizar la compra por orden de importancia son: el origen de los alimentos, el precio del producto, la seguridad alimentaria de los productos, el sabor y el contenido en nutrientes. También concluye que dos tercios de los europeos han modificado sus hábitos de consumo tras conocer la presencia de un riesgo en un alimento en concreto, siendo este cambio permanente para la mitad de esta población.

La realización de prácticas fraudulentas por parte de las industrias alimentarias reduce su imagen y confianza frente a los consumidores. Considerando que el fraude alimentario es el incumplimiento intencionado de la legislación alimentaria respecto a oferta de productos que presentan un etiquetado con una calidad o cantidad inferior o diferente a la que exhibe el envase. Algunos de los ejemplos más comunes de fraudes alimentarios son la utilización de sustancias para encubrir el uso de ingredientes de menor calidad, la sustitución de un alimento por otro sin mencionarlo en la etiqueta, la realización de declaraciones falsas del origen o procedencia de las materias primas y la formulación incorrecta de los alimentos.

1.2. ALERGIA ALIMENTARIA

1.2.1. CONCEPTO

La alergia alimentaria es una respuesta inmunológica dañina frente a ingredientes que se encuentran en los alimentos y que pese a ser agentes inocuos, en términos de toxicidad, pueden producir lesiones en los tejidos y causar enfermedades. El desarrollo de la alergia se encuentra influenciado por la predisposición genética y los factores ambientales (Sollid, 2000) y su origen se debe a la ingesta de pequeñas cantidades de un alérgeno alimentario en la dieta.

El término de alergia alimentaria engloba a todas las reacciones en las que intervienen mecanismos inmunológicos. Si por el contrario no se demuestran estos mecanismos, se debe de utilizar el término de hipersensibilidad no alérgica. A su vez, dependiendo del mediador

implicado en la reacción podemos dividir las alergias alimentarias en tres categorías: mediadas por inmunoglobulina E (IgE), no mediadas por IgE y mixtas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación y caracterización de los tipos de alergias alimentarias. Fuente: Rodrigo, Salcedo & Urruzuno.

TIPO	Presencia de IgE	Tipo de reacción	Sintomatología
Mediado por IgE	Sí	Inmediata (minutos-horas)	Aparecen reacciones cutáneas, respiratorias, digestivas y anafilaxia.
No mediado por IgE	No	Tardía (horas-días)	Predominan las reacciones gastrointestinales que dependen de la zona afectada.
Mixta	Sí	Similar a las no mediadas por IgE	Dermatitis atópica, trastornos gastrointestinales eosinofílicos y asma alérgica.

Por otro lado, las reacciones alérgicas no son específicas de un alimento, sino que pueden compartirse en los alimentos que pertenecen a especies de la misma familia o familias taxonómicamente cercanas; e incluso puede darse en familias filogenéticamente alejadas, siempre que compartan pequeños antígenos (Rodrigo, Salcedo & Urruzuno).

En las últimas décadas, la prevalencia de alergia alimentaria ha incrementado, llegando a ser en los países desarrollados, principalmente, un problema de salud pública (Besler, 2001). Se estima que afecta al 5% de los niños y entre el 3-4% de los adultos (Sicherer & Sampson, 2010). Sin embargo, tal y como afirma Sicherer, 2011, existen limitaciones en cuanto a la determinación. Algunas de las causas se deben a errores de clasificación, participación sesgada, falta de pruebas simples de diagnóstico, rápida evolución de la enfermedad, elevado número de posibles desencadenantes y fenotipos clínicos variados.

1.2.2. ALERGIA MEDIADA POR IgE

El desarrollo de alergia alimentaria mediada por IgE requiere la exposición repetida del individuo a un determinado antígeno inocuo (alérgeno) y se presenta en dos fases, correspondientes a la etapa de sensibilización y reacción.

Durante la primera exposición del alérgeno, el antígeno es presentado a través de las células presentadoras de antígeno (APC) a los linfocitos Th2 los cuales en respuesta producen una serie de citocinas como IL-4 o IL-13. Estas citocinas provocan que los linfocitos B sufran un cambio en su cadena pesada ϵ de las inmunoglobulinas y cambien de isotipo a secretoras de IgE. Este proceso permite su diferenciación hacia células plasmáticas, capaces de producir IgE específicas frente al antígeno al que se ha expuesto el sujeto. Las IgE se van a unir al receptor Fc ϵ RI, de alta afinidad específicos de IgE, en la superficie de los mastocitos y basófilos tisulares, provocando la sensibilización del individuo y la activación de los eosinófilos (**Figura 1**). En esta fase no se producen manifestaciones clínicas.

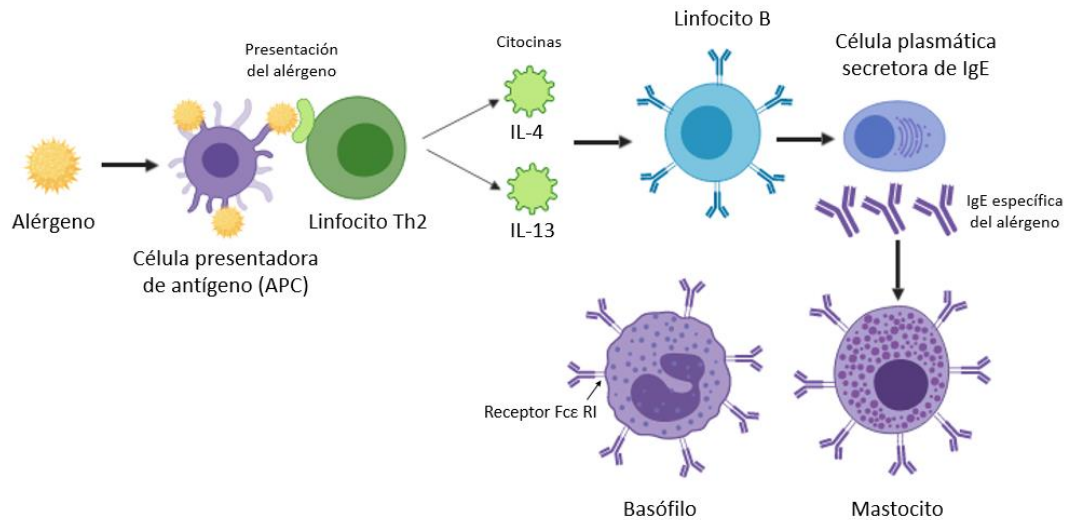


Figura 1. Etapa de sensibilización de la respuesta medida por IgE.

En una segunda exposición, el mastocito activado se desgranulará, liberando histamina y otros compuestos inflamatorios secretados (**Figura 2**), produciéndose la reacción alérgica que consta de dos fases:

1. Fase inmediata: Se produce a los pocos minutos y depende únicamente de la secreción de moléculas vasoactivas almacenadas en los mastocitos, como la histamina.
2. Fase tardía: Después de 4 horas de la liberación de los compuestos inflamatorios de la fase anterior, se induce a una liberación de citoquinas y el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos Th2, que producen más mediadores inflamatorios.

Los efectos clínicos de las alergias alimentarias varían dependiendo del lugar donde se han activado los mastocitos, produciendo efectos que pueden ser localizados o generales, y más o menos intensos, en función de la magnitud de mediadores liberados.

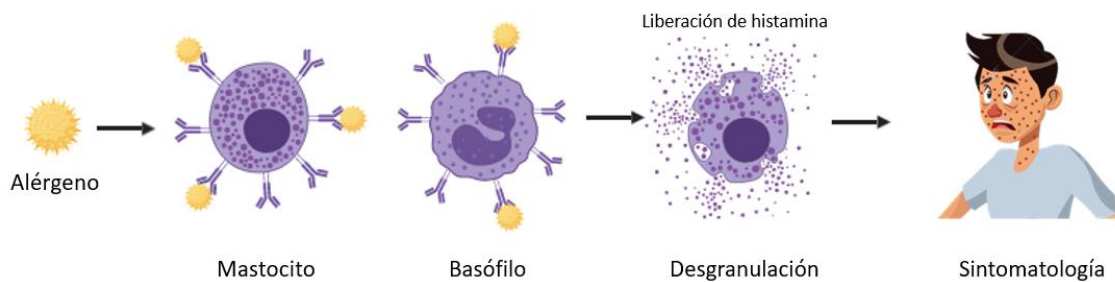


Figura 2. Etapa de reacción de la respuesta medida por IgE. Fase inmediata.

1.2.3. CELIAQUIA

La celiacía o enfermedad celiaca es un proceso autoinmune que consiste en la intolerancia permanente a las proteínas del gluten (gliadinas, secalinas, herdeínas y posiblemente aveninas) en individuos genéticamente predispuestos; siendo estos los que porten los antígenos leucocitarios humanos (HLA) DQ2 y DQ8. En estos sujetos, una exposición de gluten en el intestino delgado, provoca una respuesta inflamatoria, que conduce a lesiones en las vellosidades del intestino (Shan et al., 2002). Actualmente se estima que la prevalencia de esta

alergia a nivel mundial se encuentra en torno al 1% y continua aumentando (Gupta, Kaushal, Kumar, & Kumar, 2019).

Dicha patología pertenece al grupo de reacciones alérgicas alimentarias no mediadas por IgE. A diferencia de las mediadas por IgE, estas reacciones están mediatizadas por linfocitos Th1 efectores, que liberan citoquinas que activan macrófagos y linfocitos T citotóxicos, específicos del antígeno.

Esta enfermedad autoinmune está desencadenada por el consumo de gluten (antígeno no propio) en la dieta, que accede a la lámina propia y activa a las células inflamatorias responsables de liberar citoquinas, como la IL-15, ocasionando una inflamación inmune innata. Además, la enzima transglutaminasa 2 (TG2) liberada de las células dañadas, fragmenta el antígeno y facilita el reconocimiento de los fragmentos de gluten sobre los HLA DQ2/DQ8 situados en la superficie de las APC. Estas APC incorporan y presentan los antígenos no propios a las células Th1 que como consecuencia sintetizan citoquinas, las cuales ejercen su efecto a través de los linfocitos natural killers, que por expansión de los linfocitos citotóxicos TCD8+, producen la apoptosis de las células epiteliales intestinales (**Figura 3**)(Leffler, Green, & Fasano, 2015).

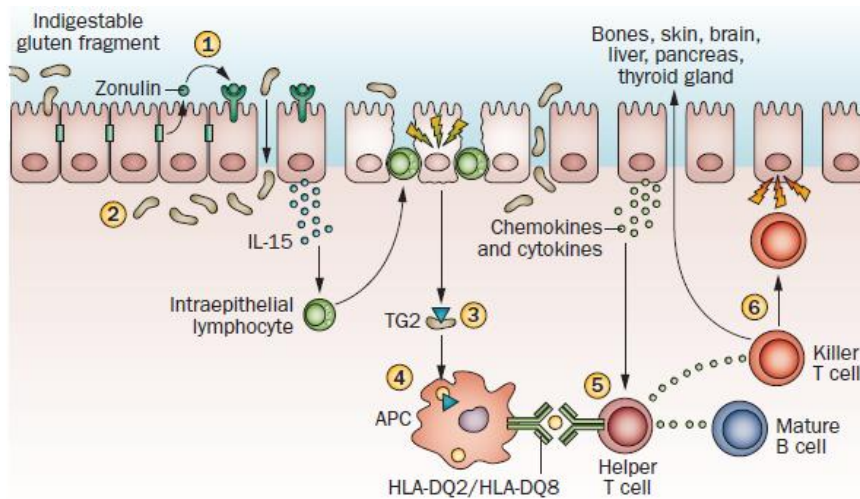


Figura 3. Mecanismo de reacción inmunológica de la celiaquía. Fuente: Leffler, Green, & Fasano, 2015.

1.3. PREVENCIÓN Y CONTROL

1.3.1. ETIQUETADO DEL PRODUCTO

Actualmente, el principal tratamiento para evitar las alergias alimentarias es la supresión en la dieta de aquellos alimentos causantes de la reacción inmunológica. Sin embargo, esta estrategia representa un gran desafío para los consumidores alérgicos, ya que necesitan poseer la información precisa de los ingredientes del producto para conocer si el alimento contiene alérgenos que pueden poner en peligro su salud (van Hengel, 2007).

Por este motivo, para garantizar la protección de los consumidores alérgicos, en el año 2011 la Unión Europea, publicó el Reglamento (UE) 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. En el anexo II de este, se indica que, en la etiqueta de los productos, es obligatoria la mención de los 14 alérgenos capaces de provocar alergias o intolerancias en el consumidor. Además, también se especifica que estos ingredientes deben de ser destacados con una tipografía distinta al resto de ingredientes, para ser fácilmente identificados por los consumidores.

A pesar de este avance en la protección del consumidor, todos los años se reportan un elevado número de incidencias por el consumo de alimentos etiquetados como libres de alérgenos (Hefle & Taylor, 2004). La causa es la ingesta de cantidades traza no detectadas o la contaminación involuntaria o voluntaria. Por ejemplo, la posibilidad de contaminación cruzada es muy elevada en aquellas industrias donde utilizan las mismas instalaciones para el almacenamiento de los ingredientes o la elaboración de los productos (van Hengel, 2007). Si la empresa no aplica los protocolos oportunos, tal y como establece el Reglamento (CE) Nº 852/2004 sobre la higiene de los productos alimenticios y el Reglamento (CE) Nº 178/2002 sobre la seguridad de los alimentos puestos a disposición de los consumidores, puede derivar en un problema de seguridad alimentaria.

Determinar la presencia estas posibles contaminaciones que ponen en riesgo la salud de los consumidores, es uno de los principales objetivos de las industrias. Para ello se necesitan métodos que permitan identificar la presencia de alérgenos traza en los equipos de producción, así como en los alimentos elaborados (van Hengel, 2007). Dentro de la industria alimentaria los métodos más empleados en una primera etapa de identificación son los de *screening*, debido a que son técnicas rápidas y poseen un bajo coste por análisis (Alocilja & Radke, 2003). Posteriormente todos aquellos productos con un primer resultado positivo deben ser confirmados siguiendo los métodos oficiales o validados dentro de la industria.

1.3.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN

Las industrias alimentarias realizan análisis rutinarios para determinar que la composición indicada en las etiquetas de los productos corresponde con el contenido real de los ingredientes. Comúnmente para la determinación de compuestos en los alimentos se emplean técnicas químicas que identifican y cuantifican estos analitos. Entre las técnicas más empleadas en el sector destacan la cromatografía (Lederer & Lederer, 1954) y la espectrofotometría (Sánchez Rojas & Bosch Ojeda, 2009). Estas técnicas son también utilizadas por las agencias gubernamentales de control de alimentos.

No obstante, en los últimos años están incrementándose la implementación de los métodos denominados de vanguardia y especialmente los métodos de *screening* debido a que estos ensayos indican de forma más rápida si el analito diana se encuentra presente, entre todos los componentes de la muestra, por encima o por debajo de un umbral (Alocilja & Radke, 2003). La ventaja de estos métodos para la industria radica en que su rapidez permite que se tomen decisiones inmediatas.

Sin embargo, las tendencias de futuro en el uso de sistemas de detección, estos deben estar adaptados a las necesidades particulares de cada industria alimentaria.

1.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ALERGIAS

En los últimos años, la detección de compuestos alergénicos en los alimentos ha recibido una mayor vigilancia por parte de la industria alimentaria y las agencias legislativas (Van Hengel, 2007). Sin embargo, existe todavía una demanda de nuevos métodos puesto que parte de la población que sufre alergia alimentaria también es sensible a la presencia de trazas del alérgeno en el alimento, que son más difíciles de detectar con los métodos actuales. Por esto la producción de alimentos seguros dependen de la disponibilidad de tecnologías y metodologías

capaces de detectar la presencia de ingredientes alergénicos en un amplio rango de concentraciones (Van Hengel, 2007).

Hasta el momento, entre algunas de las técnicas empleadas para la detección de alérgenos se encuentran: el inmunoensayo, la detección de ADN por PCR y la espectrometría de masas.

1.4.1. INMUNOENSAYO

La industria alimentaria y las agencias de control de alimentos utilizan comúnmente los kits ELISA para identificar la posible contaminación con alérgenos en los productos (Monaci & Visconti, 2010). Este tipo de inmunoensayo normalmente utiliza anticuerpos que sirven como marcadores para detectar una proteína alergénica específica.

Los kits ELISA ofrecen varias ventajas como una buena sensibilidad, que son fáciles de realizar, por lo que no es necesario un personal especializado que lo realice y que permiten realizar varios análisis simultáneamente. Sin embargo, esta técnica requiere largos tiempos de extracción y puede originar falsos negativos o reducciones en la cuantificación debido a que la unión del analito a los anticuerpos del ELISA puede verse afectado por la desnaturalización de la proteína diana durante el tratamiento térmico u otro tipo de tratamiento sufrido durante el procesado (New, Schreiber, Stahl-Zeng, & Liu, 2018).

1.4.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN

En este caso el ensayo no consiste en la detección de proteínas sino en la amplificación de la secuencia de ADN del alérgeno. Estos ensayos se basan en la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para conseguir la amplificación de una secuencia del genoma del producto que permita su posterior detección. Para ello se utiliza la Taq polimerasa, enzima termoestable, que sintetiza una cadena de ADN complementaria a una cadena de ADN simple/molde.

Esta técnica permite amplificar simultáneamente múltiples secuencias, disminuyendo el tiempo y coste del ensayo, además, se reduce la probabilidad de contaminación cruzada (Monaci & Visconti, 2010). Sin embargo, presentan una serie de desventajas como que las detecciones muestran resultados cualitativos y que poseen la necesidad de identificar y secuenciar apropiadamente los genes diana y de diseñar los cebadores adecuados, lo que explica porque estos tests han entrado más lentamente en el mercado (Monaci & Visconti, 2010).

No obstante, en este campo se han producido otros progresos como el desarrollo de una variante de la PCR de punto final denominada PCR a tiempo real o qPCR, la cual sirve para amplificar y cuantificar simultáneamente y de forma absoluta el producto de la amplificación (**Figura 4**).

Esta técnica requiere los mismos reactivos que la PCR, adicionando una sustancia marcada con un fluoróforo que permite cuantificar la generación del producto. Dicho fluoróforo puede ser específico (también denominado sonda) o no específico. En ambos casos la detección se basa en que el fluorocromo se intercala en la doble hebra del ADN, y posteriormente tras ser excitado con un haz de luz a una longitud de onda determinada emite fluorescencia, la cual puede ser detectada con un termociclador provisto de sensores de fluorescencia. En cada ciclo el termociclador registra la fluorescencia (ΔRn), permitiendo conocer en cada momento el progreso de la formación de producto.

En la determinación del producto de amplificación, en cuanto a los parámetros que se usan, destaca el valor Ct. Este indica el ciclo a partir del cual la fluorescencia de la muestra es superior al nivel de fluorescencia proveniente del fondo. El Ct determina el primer ciclo en el cual la señal detectada por el equipo corresponde a la amplificación real de la muestra. Conjuntamente, esta técnica también proporciona la temperatura de fusión (T_m), que permite de identificar con una elevada probabilidad, la presencia de amplicones de ADN específicos.

Mediante la qPCR se obtienen resultados semicuantitativos/cuantitativos de la presencia de alérgenos en los alimentos, lo que supone una interesante aplicación para los análisis rutinarios (Monaci & Visconti, 2010).



Figura 4. Esquema de las principales técnicas utilizadas para la amplificación del ADN.

1.4.3. OTROS

En los últimos años, una de las nuevas tecnologías empleadas para la detección de alérgenos es la espectrometría de masas. En concreto, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, que analiza directamente los fragmentos de los péptidos digeridos de las proteínas alergénicas en función de sus distintas masas moleculares (New et al., 2018). Dicha técnica presenta un mayor potencial frente a los métodos convencionales con relación a sensibilidad y especificidad. Otra ventaja es la posibilidad de detección de varios alérgenos alimentarios no relacionados entre ellos en un único análisis (Monaci & Visconti, 2010).

1.5. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE DETECCIÓN

1.5.1. BIOSENSORES

Una tecnología emergente en el análisis de compuestos alergénicos son los sistemas de biosensado. Un biosensor es un dispositivo compacto de análisis que mide interacciones moleculares específicas en tiempo real (Poms, Klein, & Anklam, 2004). Este instrumento consta de tres componentes (**Figura 5**):

1. Bioreceptor, que aprovechando la especificidad de las interacciones biomoleculares reconoce a un analito concreto. Este puede ser un tejido, anticuerpo, cadena de ácidos nucleicos, enzima, etc.
2. Transductor, que es el encargado de interpretar la reacción del bioreceptor y traducirla en una señal cuantificable.
3. Detector, que amplifica, condiciona y procesa la señal para presentarse en forma de dato.

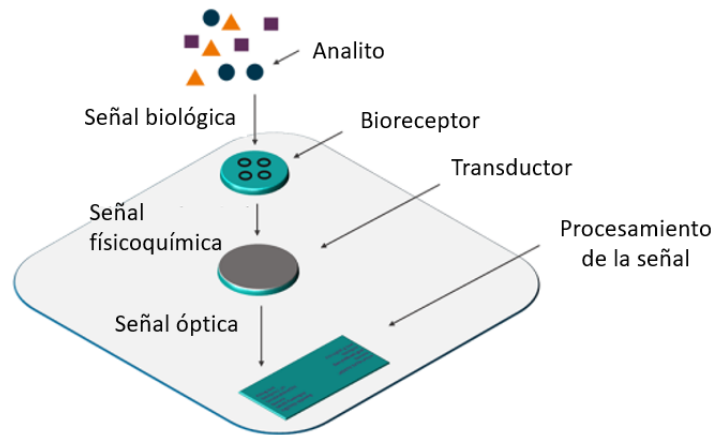


Figura 5. Esquema de los componentes de un biosensor.

Los biosensores presentan varias ventajas frente a los métodos convencionales. En primer lugar, su pequeño tamaño posibilita que sean fácilmente portables. Así mismo, permiten trabajar con una menor cantidad de reactivos y muestra, lo que reduce considerablemente los costes del análisis, y generalmente requieren a un menor tiempo de ensayo.

Aunque existen varias aplicaciones en el campo del análisis alimentario, hoy en día se disponen de pocos métodos para la detección de alérgenos alimentarios implementados en la industria. No obstante, dichos sistemas han demostrado ser excelentes métodos de *screening* para controlar las posibles contaminaciones de alérgenos en los alimentos (Monaci & Visconti, 2010).

1.5.2. BIOSENSADO MEDIADO POR NANOPARTÍCULAS DE ORO

Los métodos convencionales de detección normalmente requieren el uso de instrumentos costosos que necesitan un profesional capacitado. En comparación, los ensayos colorimétricos directos son más atractivos en términos de simplicidad, conveniencia y rentabilidad (Chang et al., 2019). Es más, la respuesta colorimétrica obtenida, tras la adición del reactivo específico, es fácil de observar a simple vista sin necesidad de un equipo especializado, siendo una técnica adecuada para su aplicación en la industria.

Recientemente, se ha desarrollado un tipo de biosensor colorimétrico sin marcaje basado en el aprovechamiento de las características que poseen algunos metales nobles, como el oro y la plata, para modificar el color de la disolución en función del tamaño de la nanopartícula (Guo, 2012). El principio se basa en que, tras incidir un haz de luz a una determinada frecuencia de energía sobre los electrones libres de la banda de conducción de las nanopartículas metálicas, surge la oscilación colectiva de los electrones de conducción, produciéndose el fenómeno conocido como resonancia del plasmón de superficie. Este, tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de luz incidente y transmitir las frecuencias no absorbidas. En el caso de las nanopartículas de oro (Au-NPs), la resonancia del plasmón de superficie se da en frecuencias dentro del campo visible del espectro electromagnético, con lo que las frecuencias no absorbidas por el RPS se asocian al color observado.

Aquellas partículas con un diámetro inferior a 20 nm, muestran una banda de absorción de la luz de 520 nm del de la zona visible del espectro electromagnético (Chang et al., 2019), que corresponde a la coloración azul-verde y reflejan el color complementario siendo este el rojo, color que toma la disolución coloidal. Sin embargo, los picos del espectro absorbido se pueden

desplazar cuando varía el tamaño, forma y estado de agregación de la nanopartícula. Si las Au-NPs aumentan su tamaño, como consecuencia de la agregación, la longitud de onda de la luz absorbida de la resonancia del plasmón de superficie se desplaza a valores superiores (650 nm), correspondientes a menores energías. De este modo, se absorberá la luz correspondiente a la coloración roja, y la disolución coloidal de partículas evolucionará una coloración azul pálido o púrpura (**Figura 6**). Estos cambios de coloración se pueden medir mediante espectroscopia ultravioleta-visible (Guo, 2012).

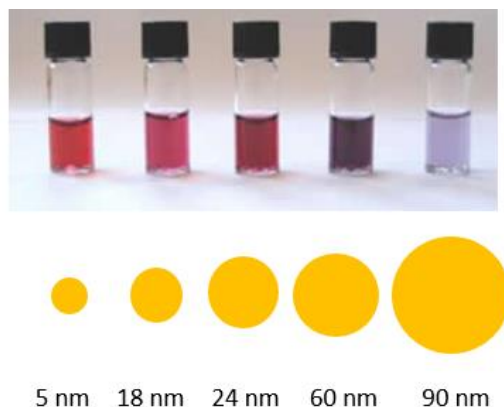


Figura 6. Variación de coloración de las disoluciones coloidales en función del diámetro de las Au-NPs.

Sin duda se ha realizado una gran tarea en este campo, sin embargo, a pesar de estos avances todavía existe el reto científico de investigar en mayor profundidad el uso de este fenómeno para la detección de moléculas de interés en seguridad alimentaria. En este sentido, se puede aprovechar que las nanopartículas de oro actúan al mismo tiempo como elemento de reconocimiento y transductor. No obstante, existen pocos materiales donde las interacciones con el analito provoquen un cambio en el tamaño de estos, con su consecuente diferenciación óptica.

Por otro lado, si se quiere emplear para la detección de dianas genéticas, se debe investigar aquellos factores que afecten a este fenómeno de biosensado, tales como método de extracción del ADN genómico, método de amplificación y condiciones de reacción entre la nanopartícula de oro y el producto generado. Los avances en este campo apoyarían directamente al desarrollo de una metodología adecuada para su aplicación como método de *screening* en la industria alimentaria.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es el estudio de métodos para la detección de genes relacionados con las alergias alimentarias o fraudes que permitan apoyar el desarrollo de un biosensor sensible, selectivo, multiplexado, rápido, económico y portable; para finalmente poder integrarlo en los sistemas de control de calidad de la industria alimentaria y poder así proteger al consumidor.

Para ello, las dianas génicas seleccionadas para el estudio de alergias alimentarias son *α-gliadina* para el gluten, *soybean lectin S* para la soja, *trnL* para cereales, *tRNA-Leu* para vegetales y *16S ribosomal RNA* para animales. El método se basa en la extracción del ADN de un alimento, su amplificación selectiva de las regiones diana y su posterior detección visual o instrumental.

Para lograr este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluación de un método de extracción de ADN y la influencia del procesado del alimento.
2. Obtención de las condiciones óptimas para la amplificación basada en PCR de punto final y en tiempo real.
3. Detección de la presencia de los genes asociados a la alergia mediante un sistema basado en nanopartículas de oro.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EXTRACCIÓN ADN

Para la extracción por el método CTAB se aplicó el protocolo basado en Doyle & Doyle (1990). En un tubo de 1,5 mL se pesaron 100 mg de muestra triturada a la que se le añadieron 700 µL de tampón de extracción previamente esterilizado en autoclave y precalentado a 65°C (CTAB 20 g/L, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 0,1 M, Na₂EDTA 20mM a pH 8), 1,4 µL de β-mercaptoetanol al 0,2 %, 1 µL de Ribonucleasa A y 2,5 µL de proteinasa K. La mezcla se incubó 10 min a 65°C. Pasado ese tiempo se añadieron 100 µL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y una vez agitado se incubó durante 30 min a 65°C. Tras centrifugar a 12000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se añadieron 700 µL de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se agitó y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min, recuperando la fase acuosa (fase superior) y desechándose adecuadamente los residuos de disolvente halogenado. A continuación, se añadieron 700 µL de isopropanol previamente enfriado a -20°C y se agitó suavemente para facilitar la precipitación del ADN. La muestra se mantuvo 10 min a -20°C y pasado ese tiempo se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Tras eliminar el sobrenadante, se lavó el precipitado de ADN con 500 µL etanol al 70%, agitando bruscamente para eliminar la compactación. Tras centrifugar a 12000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 100 µL de tampón TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8).

Los extractos de las muestras se mantuvieron a 4°C para su uso inmediato o a -20°C para su almacenamiento a largo plazo. Finalmente se determinó la calidad y concentración de los extractos de ADN con el NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La pureza del DNA se evaluó mediante la relación de absorbancias a A260/280.

3.2. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIONES DIANA

3.2.1. DIANAS SELECCIONADAS

Con el objetivo de aumentar la seguridad alimentaria se decidió seleccionar una batería de genes que pudieran proporcionar información respecto a un posible fraude de sustitución de un alimento por otro sin mencionarlo en la etiqueta y presencia alérgenos en el alimento. Para el presente trabajo se seleccionaron:

1. *α-gliadina*: gen característico del trigo. Informa de la presencia de gluten, sustancia causante de intolerancia o alergia.
2. *trnL*: gen conservado en la familia *Poaceae* de los cereales. Determinaría el contenido de algún cereal que podría contener gluten.
3. *Soybean lectin S*: gen propio de la soja, siendo este alimento uno de los 14 alérgenos de obligada mención en el etiquetado del producto.
4. *tRNA-Leu*: gen común en todas las especies vegetales. Revela la presencia de cualquier especie vegetal en el producto final, resultando útil para la detección de posibles fraudes dentro de la industria cárnica.
5. *16S ribosomal RNA*: gen particular de las especies animales. Sirve para la detección de cárnicos en alimentos, lo que permite desvelar posibles fraudes en alimentos etiquetados como veganos.

3.2.2. DISEÑO DE LOS CEBADORES

Las secuencias de los nucleótidos de los genes escogidos se obtuvieron de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para determinar las características de los cebadores diseñados se empleó la plataforma OligoCalc, el cual estima entre otros parámetros, el tamaño, la temperatura de fusión y la temperatura de anillamiento recomendada bajo condiciones de termociclado (condiciones de PCR *in silico*). Del resultado del diseño se obtuvieron las secuencias de cebadores indicados en la **Tabla 2**.

Los cebadores utilizados en este trabajo fueron suministrados por Eurofins Genomics (Alemania). Algunos de los oligonucleótidos se modificaron añadiendo al extremo 5' un grupo digoxigenina (DIG) en los cebadores directos. Se purificaron los funcionalizados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), y los no modificados por purificación de alta pureza libre de sales (HPSF).

Tabla 2. Listado y características de los cebadores diseñados. Herramienta: OligoCalc. CD: Cebador directo; CR: Cebador reverso; L: Longitud; TM: Temperatura de fusión; %CG: Porcentaje de citosina y guanina.

Gen		Secuencia 5'-3'	Modificación	L (pb)	TM (°C)	%CG
trnL	CD	CAAATTCAGAGAAACCCTGGA	DIG	21	57,5	43
	CR	CGATTCGTTAGAACAGCTCC	-	21	59,5	48
α -gliadina	CD	AACCATTTCCGCAGCCGCAA	-	20	60,5	55
	CR	GTTGCGAATACTGTGGTTGCG	-	21	61,2	52
Soybean lectin S	CD	TCCACCCCATCCACATTT	DIG	19	57,5	53
	CR	GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA	-	24	63,6	46
tRNA-Leu	CD	GAAATCGGTAGACGCTACGGA	DIG	21	61,2	52
	CR	ATTTGGCTCAGGATTGCC	-	19	57,5	53
16S ribosomal RNA	CD	CCYAGGGATAACAGCGCAATC	DIG	21	61,2-62,2	52-57
	CR	TCCGGTCTGAACTCAGATCAC	-	21	61,2	52

La selectividad de los cebadores se comprobó empleando el *software* BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local) (**Figura 7**).

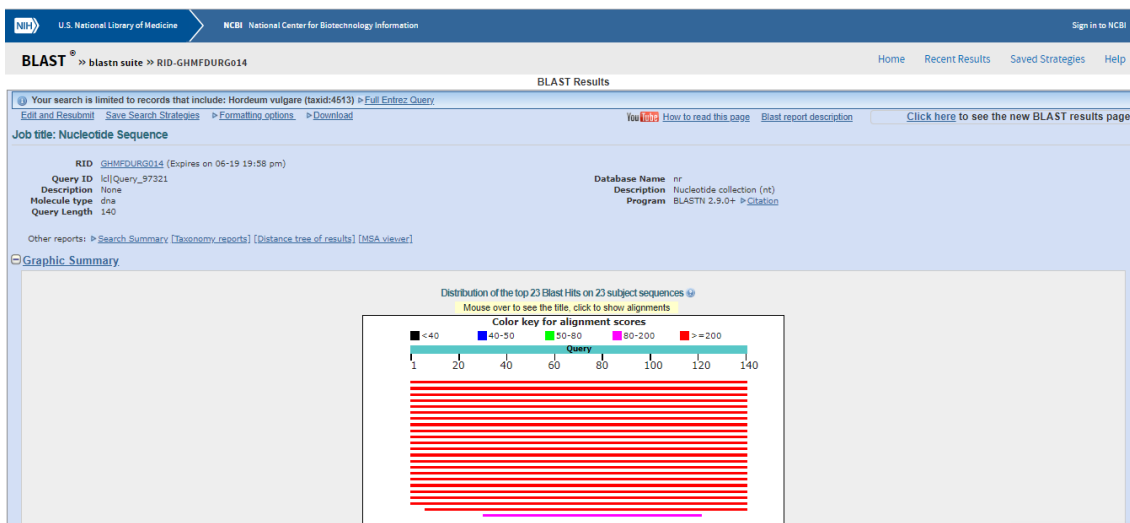


Figura 7. Grado de presencia del gen trnL en cebada (*Hordeum vulgare*). Herramienta: BLAST.

3.2.3. AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR DE PUNTO FINAL

La amplificación de la región diana se llevó a cabo por PCR en un volumen de reacción de 12,5 μL a 1X de tampón libre de MgCl_2 (Biotools, España), 3 mM de MgCl_2 (Biotools, España), 200 nM de dNTPs (ThermoScientific, Estados Unidos), 300 nM de cebador directo, 300 nM de cebador reverso, 4 ng/ μL de ADN genómico y 0,04 U/Taq polimerasa (Biotools, España). Añadiéndose agua Milli-Q hasta alcanzar el volumen final de la reacción. Las reacciones se realizaron en un termociclador UNO (VWR). El programa del termociclador comienza con un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, 35 ciclos de: desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación de los cebadores a 60°C durante 30 s y elongación a 72°C durante 30 s, seguido de una extensión final de 5 min a 72°C. Para el experimento de optimización de la temperatura de hibridación del gen *trnL*, se utilizó el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania) que permite un ensayo del gradiente de temperaturas.

El rendimiento de la amplificación se determinó mediante fluorescencia, utilizando el flúoróforo SYBR Green (Invitrogen, Estados Unidos). Mezclándose 1 μL del producto de amplificación con 99 μL de Sybr Green 0,5 X en una placa de ensayo de 96 pocillos (Costar®, Corning Incorporated, Estados Unidos). Este agente intercalante, altamente empleado por su bajo coste, presenta afinidad por las dobles cadenas de ADN, y al oxidarse genera una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto de doble cadena generado. Sin embargo, puede dar resultados inespecíficos porque se puede intercalar a cualquier molécula de doble cadena que se encuentre en la reacción, como puede ser el caso de la formación de dímeros de cebadores. La lectura se realizó en un lector de placas multipocillo Victor 1420 multilabel counter (PerkinElmer, Estados Unidos) a 485 nm (excitación) y 585 nm (emisión). Se comprobó el tamaño del producto generado mediante gel de agarosa al 3% (Fischer Scientific, Estados Unidos). La electroforesis se realizó en tampón TAE 0,5 X, y los productos de amplificación se diluyeron (1:2) en tampón de carga. Después de 30 min a 110 V, el gel se reveló mediante REAL SAFE Nucleic Acid Gel Stain Solution 20,000 X (Durviz S.L., España). El marcador de pesos moleculares fue de 25-650 pb (EXACTGene 50 pb, Mini DNA Ladder, Fischer Scientific, Estados Unidos).

3.2.4. AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR A TIEMPO REAL

La amplificación de la región de interés se llevó a cabo en un volumen de reacción de 10 μL a 1X de mix Takara que contiene: polimerasa Takara Ex taq HS, mezcla de dNTPs, Mg^{2+} y RNasa HTI, TB Green y Rox Reference Dye (Takara Bio Inc, Japón), 300 nM de cebador directo, 300 nM de cebador reverso, 4 ng/ μL de ADN genómico. Completándose el volumen de reacción con la adición de agua Mili-Q. Los reactivos se colocaron en microplacas PCR Axygen 96 pocillos (Fischer Scientific, Estados Unidos), tapándose con ultra pressure sealing film (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Las reacciones se realizaron en un termociclador ViiA 7 system (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). El programa del termociclador consta de un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, 35 ciclos de: desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación de los cebadores a 60°C durante 30 s y elongación a 72°C durante 30 s, seguido de una extensión final de 5 min a 72°C.

3.3. BIOSENSADO MEDIADO POR NANOPARTÍCULAS DE ORO

3.3.1. PURIFICACIÓN DEL ADN AMPLIFICADO

La purificación del ADN amplificado se realizó mediante el kit comercial: PCR Purification Kit (Jena Bioscience, Alemania). En primer lugar, se depositaron 50 μL del producto de PCR previamente amplificado, al que se le añadieron 150 μL de tampón de unión y 100 μL de isopropanol. Por otro lado, se introdujo una columna de centrifugado en un tubo recolección, al cual se adicionaron 100 μL de tampón de activación y se centrifugó en una ultracentrífuga Mendifriger BL-S (J.P Selecta S.A., España) 30 s a 10.000 RCF. Tras la centrifugación se añadió sobre la columna de centrifugado la mezcla realizada anteriormente, y se volvió a centrifugar 30 segundos a 10.000 RCF, descartándose el sobrenadante obtenido. A continuación, se lavó la columna de centrifugación cargada de ADN con 700 μL de tampón de lavado, seguido de una centrifugación durante 30 segundos a 10.000 RCF y el posterior descarte del sobrenadante. Finalmente, se introdujo la columna de centrifugación en tubo estéril de 1,5 mL, al cual se le añadió 50 μL de agua destilada y desionizada en el centro de la columna y se dejó incubando durante 1 min a temperatura ambiente, tras la incubación se centrifugó 30 segundos a 10.000 RCF para obtener el ADN purificado en el tubo estéril.

3.3.2. DETECCIÓN

La detección mediante Au-NPs se realizó en un volumen final de 20 μL en los que se añadieron 2 nM de Au-NPs de 15 nm de diámetro (Merck, Alemania), 10 pmol del producto de PCR, 130 mM de NaCl y agua Mili-Q hasta completar el volumen final. En el protocolo de elaboración en primer lugar se añaden las partículas y el agua Mili-Q. A continuación, el ADN amplificado y se deja incubar la muestra 10 min a temperatura ambiente. Tras el periodo de incubación se añade la sal (NaCl) y se registra el color resultante tras un periodo de 20 min.

Con fines de optimización del ensayo, también se realizaron medidas con el NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) a $\lambda = 650$ nm, para cuantificar el color azul.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS ALIMENTARIAS

Uno de los factores que influyen en la capacidad de detección de un método basado en ADN es el proceso de extracción. Esta etapa tiene como objetivo obtener, a partir de la muestra del alimento, un ADN genómico con cantidad y pureza adecuadas evitando contaminaciones de proteínas, ARN y otros compuestos. Para evitar que estas especies inhiban el proceso de amplificación y originen falsos negativos.

4.1.1. ESTIMACIÓN DE LA CALIDAD

Se seleccionó el método de CTAB para obtener ADN genómico de los alimentos dadas sus excelentes prestaciones (Tortajada-Genaro et al., 2012). No obstante, dado que puede conducir a un efecto matriz, en este TFG se han estudiado alimentos de diferente naturaleza, composición, procesado, etc. En primer lugar, se determinó las concentraciones obtenidas mediante medida espectrofotométrica a $\lambda=260$ nm (Anexo 1).

La calidad de los extractos se estimó a través de la relación de absorbancias A260/280 (**Tabla 3**). Se consideró muestras de pureza excelente cuando poseían un valor entre 1,7-2,0. Cuando la relación es superior a 2,1 indica una contaminación con ARN. Mientras que un valor inferior a 1,6, revela la presencia de proteínas o compuestos aromáticos.

Tabla 3. Caracterización de la pureza en función del procesado de las muestras extraídas mediante el método CTAB. Leyenda: ■ Pureza óptima; ■ Contaminación con ARN; ■ Contaminación con proteínas o compuestos aromáticos.

MUESTRAS	Pureza ADN	Tipo de procesado
Tomate		Ninguno
Harina de maíz		Molienda o trituración
Sopa		Cocción
Papilla multifrutas		Triturado + tratamiento térmico
Galleta de soja		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Longaniza pollo		Extrusión en frío
Soja texturizada		Extrusión en caliente
Cereales rellenos		Coextrusión en caliente

Se puede observar en la tabla del anexo que el método de extracción usado es válido para cualquier muestra alimentaria independientemente de su procedencia o composición. Además, se obtiene un ADN con una pureza adecuada para su posterior utilización en técnicas moleculares.

4.1.2. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL PROCESADO

A pesar de que el ADN, en comparación con las proteínas y el ARN, es una molécula más estable frente al procesado del alimento, muchos de los tratamientos industriales, pueden destruir el ADN y conducir a resultados erróneos (New et al., 2018). Por tanto, se decidió realizar un estudio estadístico para obtener relaciones entre el grado de procesado y la cantidad de ADN extraído.

Dado que el método del CTAB permite utilizar las muestras directamente, para estimar la cantidad extraída neta, los alimentos se clasificaron en función de su humedad. La **Figura 8A** muestra que los alimentos ricos en agua, como los vegetales, originaron extractos con baja concentración de ADN. Por tanto, se calcularon las concentraciones corregidas con el porcentaje de humedades (en base 1) y se clasificaron en función de los tipos de procesados (**Figura 8B**).

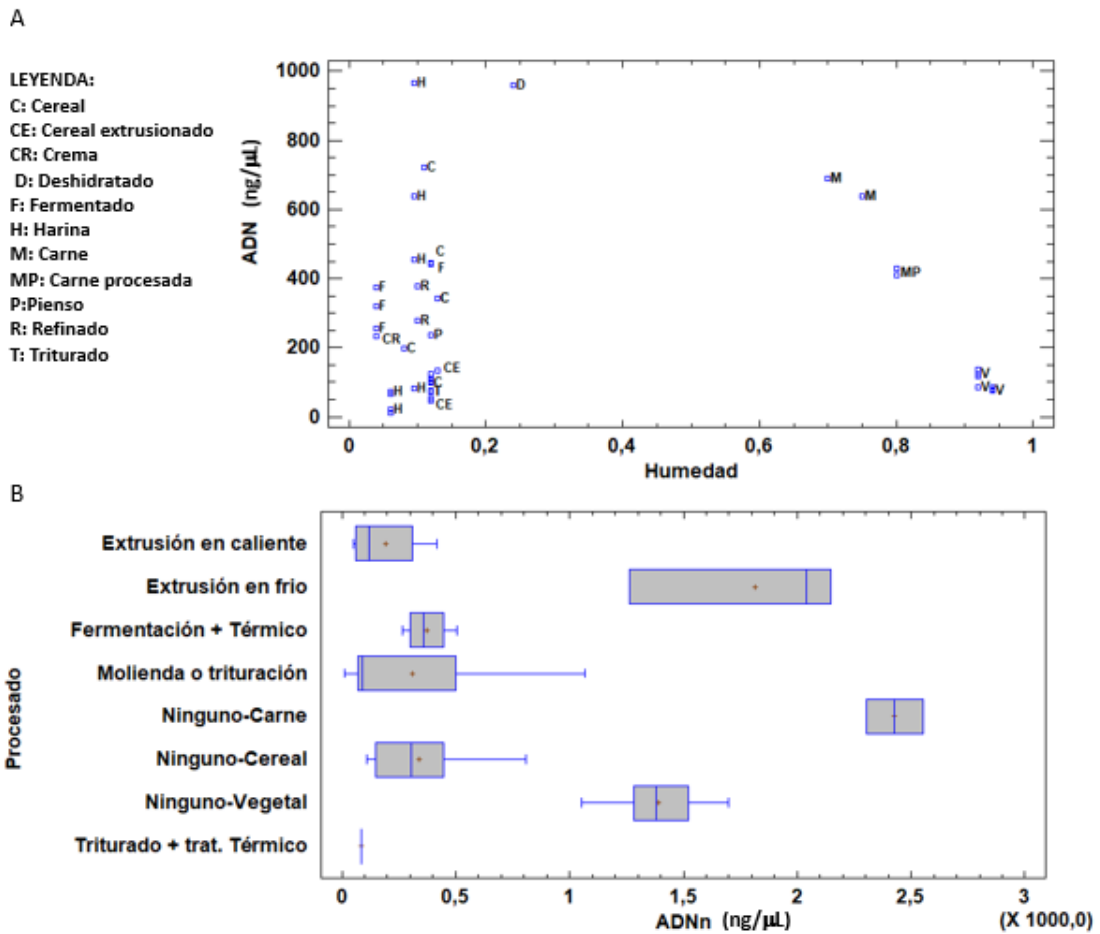


Figura 8. A) Representación del contenido en ADN en función de la humedad de cada alimento.
 B) Diagrama de caja sobre la concentración neta en ADN extraído (ADNn) en función del tipo de procesado que ha sufrido el alimento.

Para estimar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas, se empleó el análisis ANOVA. La **Tabla 4** muestra que el valor del estadístico F a partir de las variaciones inter-grupo e intra-grupos. Puesto que el valor-P, fue menor que 0,05, se concluyó que existía una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades de ADN extraídas en función del procesado, con un nivel del 5% de significación.

Tabla 4. Análisis ANOVA sobre la variación de la concentración de ADN extraído en función del tipo de procesado. Gl: Grado de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F	Valor-P
Entre grupos	1,9E7	7	2,7E6	39,13	0,0000
Intra grupos	2,4E6	35	69014		
Total (Corr.)	2,13E7	42			

Para establecer que los tipos de procesado eran significativamente diferentes, se realizaron las pruebas de múltiples rangos. Consistió en aplicar un procedimiento de comparación múltiple de las medias, diferencia mínima significativa de Fisher, con un nivel del 95 % de confianza (**Tabla 5**). Se identificaron 4 categorías que presentaron diferencias estadísticamente significativas en las cantidades de ADN extraído. Entre las categorías que contienen un mayor contenido en ADN genómico se encuentra en primer lugar la carne sin procesar, seguida de la extrusión en frío (que sufre un bajo grado de procesado) y los vegetales sin tratamiento. El siguiente grupo, que contiene la menor concentración de ADN, se compone por el resto de los alimentos que han sufrido un procesado y los cereales sin procesar. En conclusión, tal y como afirmaba Monaci & Visconti, 2010, un elevado grado de procesado sobre los alimentos se puede relacionar con un aumento de la degradación del ADN de estos productos

Tabla 5. Pruebas de múltiples rangos para la identificación de grupos homogéneos.

Procesado	Casos	Media	Grupo
Triturado + tratamiento térmico	2	85	1
Extrusión en caliente	7	192	1
Molienda o trituración	9	310	1
Ninguno-Cereal	8	339	1
Fermentación + Térmico	4	373	1
Ninguno-Vegetal	8	1389	2
Extrusión en frío	3	1816	3
Ninguno-Carne	2	2427	4

4.2. AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR DE PUNTO FINAL

La detección de los genes diana es complicada puesto que se encuentran en concentraciones muy bajas. Además, puede verse dificultada por la presencia de otros componentes, que enmascaran la molécula, o influyen en la medida (van Hengel, 2007). Para alcanzar el número de copias de los genes de interés suficiente para su detección, se empleó la amplificación por PCR.

4.2.1. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES

Los cebadores son importantes en la amplificación, ya que se unen a la cadena molde dada la complementariedad en su secuencia de pares de bases y sirven como punto de inicio a la polimerasa para la adición de nucleótidos.

La longitud de los cebadores influye en los resultados de la PCR, ya que cebadores con mayor longitud disminuyen la probabilidad de uniones inespecíficas a otras regiones no deseadas del genoma de los distintos alimentos. No obstante, al aumentar el tamaño del cebador, también se produce un incremento de la T_m , haciendo que la reacción sea termodinámicamente inestable. Por lo que el tamaño de los cebadores diseñados fue de 19-24 pb.

Para determinar la especificidad de los cebadores en la replicación de la hebra diana, se realizó un estudio de alineamiento de los cebadores diseñados con el *software* BLAST. Siendo este un programa informático de alineamiento de secuencias locales de ADN, que es capaz de comparar una secuencia determinada con una gran cantidad de secuencias que se encuentran dentro de una base de datos. Con dicho programa se consiguió determinar si el producto de amplificación definido por los cebadores se encontraba en el genoma de distintas especies alimentarias (**Tabla 6**). Se confirmó que los cebadores diseñados presentan un elevado grado de especificidad con las especies relacionadas.

En valores elevados, como es el caso del gen *trnL* con el trigo (*Triticum aestivium*), existe una complementariedad del 100% entre la secuencia del gen y el genoma de la especie, indicando de la probabilidad de amplificación sea también del 100%. Sin embargo, la probabilidad de amplificación disminuye cuando la relación varía entre 80-90%, como es el caso del *trnL* con la soja (*Glycine max*), donde la complementariedad de los cebadores no es significativa en para las condiciones de la PCR. Al mismo tiempo, cuando el porcentaje de complementariedad es muy bajo, como entre el *trnL* y el cerdo (*Sus scrofa domestica*), siendo este de 0%, imposibilita la amplificación. Esto es debido a que la secuencia de nucleótidos del gen diana no coincide con los de la secuencia del genoma de la especie, impidiendo que se formen los puentes de hidrogeno entre las secuencias de los cebadores y la diana.

Tabla 6. Porcentaje de complementariedad entre los genes estudiados en distintas especies alimentarias. Herramienta: BLAST. Leyenda: 0%; 80-90%; 90-100%.

ESPECIE		<i>trnL</i>	α -gliadina	Soybean lectin S	tRNA-Leu	16S ribosomal RNA
Trigo	<i>Triticum aestivium</i>	90-100%	90-100%	0%	90-100%	0%
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	90-100%	0%	0%	90-100%	0%
Centeno	<i>Secale cereale</i>	90-100%	90-100%	0%	90-100%	0%
Soja	<i>Glycine max</i>	80-90%	0%	90-100%	90-100%	0%
Quinoa	<i>Chenopodium quinoa</i>	0%	0%	0%	90-100%	0%
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	80-90%	0%	0%	90-100%	0%
Cerdo	<i>Sus scrofa domestica</i>	0%	0%	0%	0%	90-100%

4.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

Partiendo de las condiciones de trabajo establecidas en el grupo de investigación para otros genes (Tortajada-Genaro et al., 2012), se estudiaron tres variables críticas de la PCR: temperatura de hibridación, concentración de los cebadores y número de ciclos, con objetivo de aumentar el rendimiento de la amplificación de los genes de interés. Para llevar a cabo este estudio, se escogió el gen *trnL*, gen conservado en los cereales, como sistema modelo. Utilizando el fluoróforo SYBR Green se midió la intensidad de fluorescencia que genera el producto amplificado, sabiendo que una intensidad de 1000 u.a. corresponde a 0,49 ng/ μ L.

En primer lugar, se estudió la respuesta en función de la temperatura de hibridación cebador-molde en la PCR en el rango 55 a 74,5°C (**Figura 9A**). Se observó que a temperaturas superiores a 65°C no se producía amplificación, debido a que, como son tan elevadas, la hibridación de los cebadores a la región de interés es termodinámicamente inestable. Se seleccionó 60°C como temperatura de trabajo, debido a que proporciona un rendimiento adecuado, y los cebadores se emparejan con un mayor grado de especificidad a la región diana, minimizando la formación de productos inespecíficos.

En segundo lugar, se estudió la concentración de los cebadores en la reacción, manteniendo una relación estequiométrica 1:1 entre el cebador directo y reverso (**Figura 9B**). La fluorescencia del producto de amplificación aumentó conforme se incrementaba la concentración de los cebadores hasta 300 nM, alcanzando la saturación. Por lo tanto, se estableció dicha concentración para los siguientes de los experimentos.

Finalmente, se estudió el número de ciclos que constituye la reacción de PCR, examinándose entre 5 y 55 ciclos (**Figura 9C**). Los resultados mostraron que a partir del ciclo 30 se detectaba el producto de amplificación y se producía un aumento exponencial del número de copias del ADN diana (fase exponencial de la PCR). A partir del ciclo 35, detectamos la fase tardía (meseta), producida por el “efecto *plateau*”. En este punto, por más ciclos que ocurran, la cantidad de producto no aumentará, por el agotamiento de uno o varios componentes de la reacción de PCR, como puede ser la disminución de la actividad de la DNA polimerasa, disponibilidad de dNTPs y cebadores, etc. Otra causa puede corresponder a la competencia del producto de amplificación, que se encuentra en alta concentración, por los sitios de hibridación de los cebadores. Por tanto, se estableció 35 ciclos, como el número de repeticiones que se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en los siguientes experimentos.

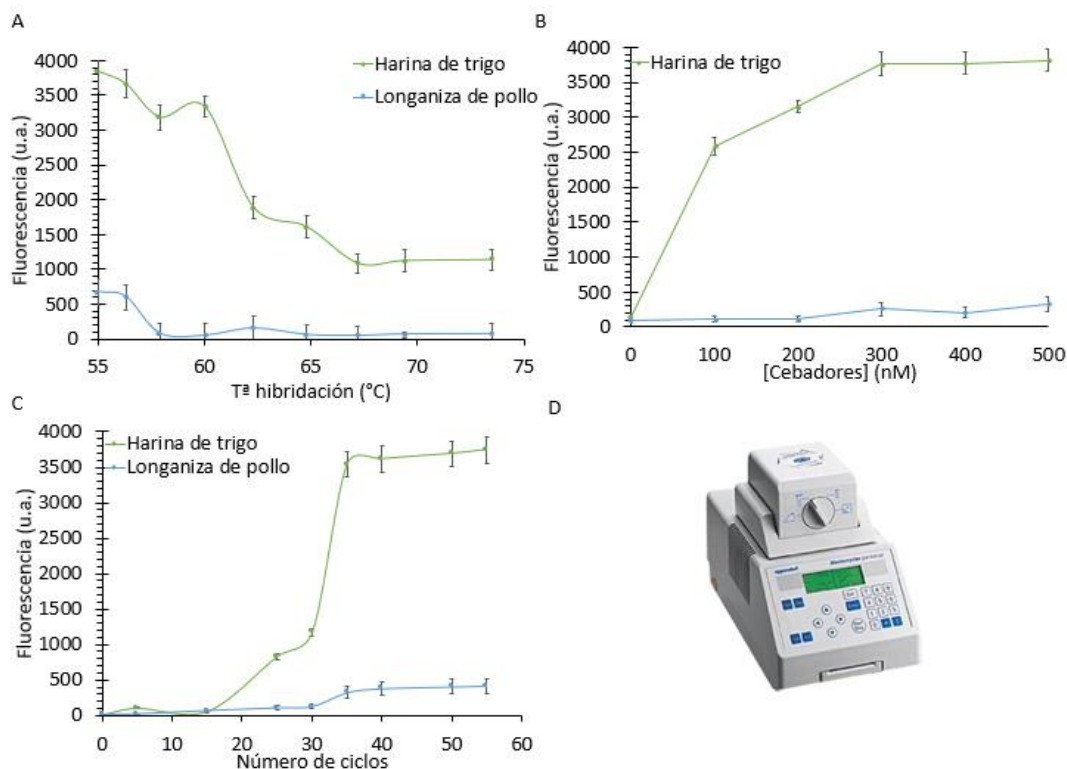


Figura 9. Señal registrada de la amplificación por PCR en harina de trigo y longaniza de pollo. A) Efecto de la temperatura de hibridación de los cebadores. B) Efecto de la concentración de los cebadores. C) Efecto del número de ciclos de la reacción. D) Equipo de termociclador utilizado en el laboratorio.

Gen: *trnL*. Réplicas: 3.

4.2.3. CARACTERIZACIÓN POR FLUORESCENCIA Y ELECTROFORESIS

Para confirmar la formación del producto de amplificación, se emplearon las técnicas de fluorescencia y electroforesis en gel de agarosa (**Figura 10**). La aplicación de la prueba-t de student (valor-P = 0,00004) corroboró que la fluorescencia media era superior para la muestra de harina de trigo respecto a la longaniza de pollo, con un 95 % de confianza. Además, la banda asociada al producto de la PCR únicamente se detectó para la muestra con cereales. Por lo tanto, se pudo afirmar que los cebadores diseñados eran específicos para el gen *trnL*.

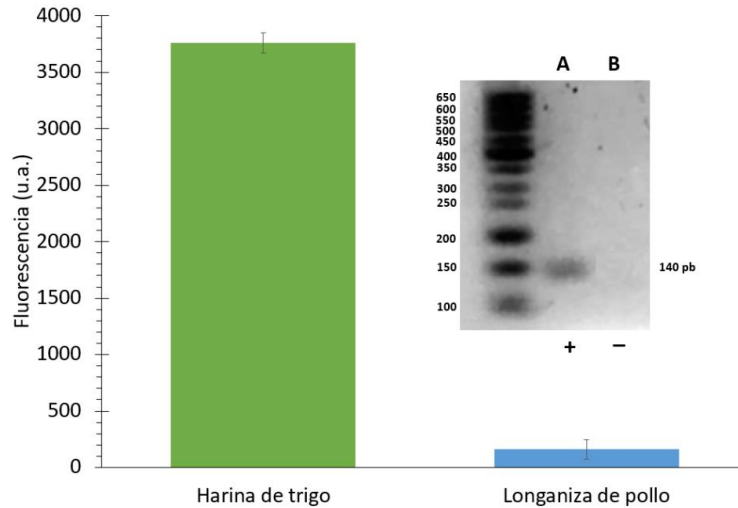


Figura 10. Señal registrada en fluorescencia y fotografía electroforesis del producto de amplificación por PCR en harina de trigo (A) y longaniza de pollo (B). Gen: *trnL*. Réplicas: 3.

4.2.4. SENSIBILIDAD

El límite de detección la PCR se determinó mediante 5 diluciones seriadas de harina de trigo en agua siguiendo una relación 1:10 (harina de trigo:agua). Estas disoluciones contenían entre 4 ng/ μ L (1333 copias) y 0,04 pg/ μ L (0,013 copias) de ADN genómico. Con los resultados obtenidos, mostrados en la **Figura 11**, se estableció el límite de detección en 0,04 pg/ μ L (0,013 copias).

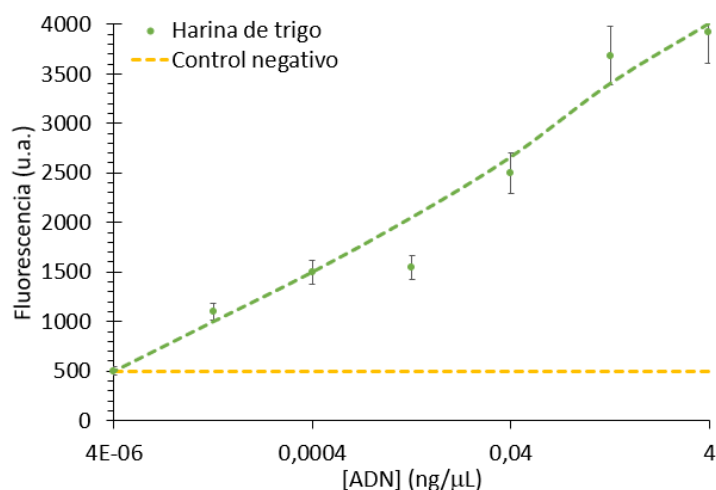


Figura 11. Señal registrada de la amplificación por PCR en diluciones de harina de trigo en agua. Gen: *trnL*. Réplicas: 3.

4.3. AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR EN TIEMPO REAL

Con el objetivo de corroborar la amplificación específica de los cebadores y la ausencia de falsos positivos o negativos, se realizaron experimentos en qPCR con el gen *trnL*. En la **Figura 12A**, se detecta la amplificación del gen diana en la muestra que contiene cereales a partir del ciclo 18. Las muestras negativas son detectadas 8 ciclos después, indicando la especificidad de la amplificación. Además, se confirmó mediante el estudio de la temperatura de fusión de los productos generados (**Figura 12B**), ya que la ausencia de superposición reflejó que la señal registrada en las muestras negativas se asociaba a subproductos de la reacción.

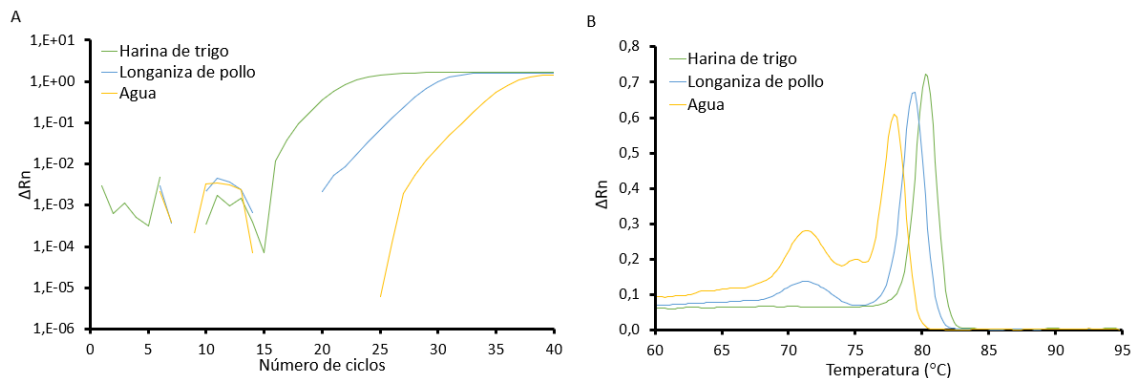


Figura 12. Señal registrada de la amplificación por qPCR en harina de trigo, longaniza de pollo y agua. A) Número de ciclos de la reacción. B) Curva temperatura de fusión. Gen: *trnL*.

Con el objetivo de determinar el límite de detección la qPCR, se realizó el mismo experimento de diluciones seriadas de harina de trigo en agua siguiendo una relación 1:10 (harina de trigo:agua). Cuanto menor es la concentración de la harina, la amplificación se inició a ciclos posteriores. A partir de la **Figura 13A**, se determinaron los Ct correspondientes a cada disolución y se elaboró la **Figura 13B**, determinándose que el límite de detección de 0,04 pg/μL (0,013 copias) de ADN genómico de cereal. El estudio termodinámico de los productos formados originó curvas de temperatura de fusión solapadas, independientemente de la dilución de la harina (**Figura 13C**). Estos experimentos concluyeron que la amplificación del gen *trnL* se ha logrado con un alto rendimiento y de forma sensible y selectiva.

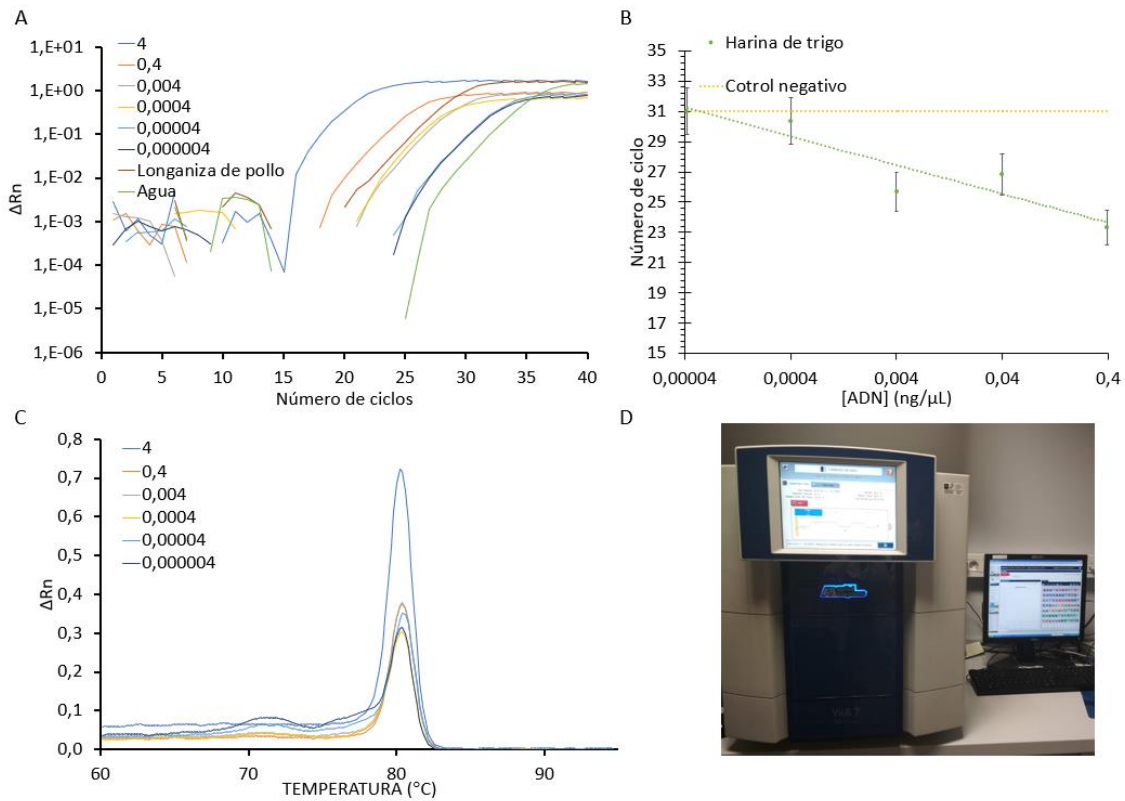


Figura 13. Señal registrada de la amplificación por qPCR en diluciones de harina de trigo en agua, harina de trigo, longaniza de pollo y agua. A) Número de ciclos de la reacción. B) Número de ciclos necesarios para superar el límite de fondo (Ct) en función de la concentración de ADN genómico añadido. C) Curva temperatura de fusión. D) Equipo de termociclador utilizado para qPCR. Gen: *trnL*. Réplicas: 2.

4.4. BIOSENSADO MEDIADO CON NANOPARTICULAS DE ORO

4.4.1. PRINCIPIO DEL BIOSENSADO

La detección de los productos de amplificación se basó en el cambio de la capacidad de interacción con la luz en función del estado de agregación de las nanopartículas de oro sin funcionalizar (H. Li & Rothberg, 2004). Inicialmente, las Au-NPs (diámetro 15 nm) se encuentran estabilizadas de forma libre en la disolución de tampón citrato de color rojo (Chang et al., 2019). En estas condiciones, su carga negativa superficial favorece la repulsión entre ellas, evitando la agregación causada por la fuerte atracción de las fuerzas de van der Waals.

Al añadir el producto de amplificación a las Au-NPs, si el producto contiene ADN la adición de NaCl no origina ningún cambio de color, manteniéndose en todo momento la coloración roja inicial. La explicación es que el ADN cargado negativamente se adsorbe sobre la superficie de las Au-NPs a través de las bases nitrogenadas. Esta nueva configuración permite que las partículas se encuentren estabilizadas incluso en medios con una fuerza iónica elevada.

Por otro lado, cuando el producto de amplificación es negativo, no contiene ADN, la adición de NaCl neutraliza las cargas superficiales y se produce la agregación de las partículas. A nivel macroscópico, se produce un cambio de color en la disolución del rojo al azul-púrpura, visible por el ojo humano.

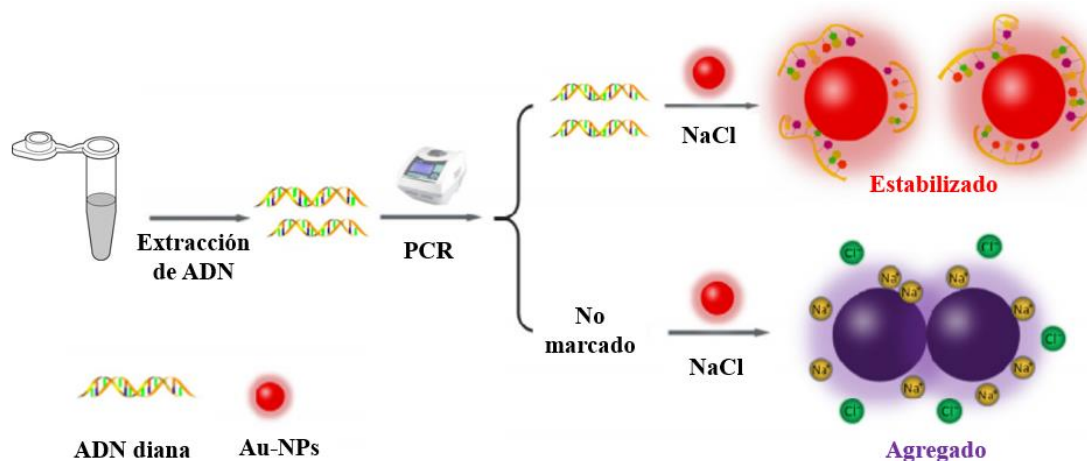


Figura 14. Esquema ilustrativo de método de detección colorimétrica con partículas de oro. Adaptada de F. Li et al., 2018.

Por lo tanto, se dispone de un sistema de detección óptico que responde a la presencia/ausencia del producto de PCR. No obstante, el producto de amplificación obtenido debe purificarse previamente, para evitar que el exceso de cebadores ocasione falsos positivos.

4.4.2. ESTUDIO DE LA TRANSDUCCIÓN

En una primera aproximación, se establecieron las condiciones de reacción descritas por F. Li et al., 2018. Sin embargo, los resultados fueron insatisfactorios, por lo que se decidió optimizar la transducción.

Se examinó la concentración de NaCl mínima necesaria para provocar la agregación de las Au-NPs en la muestra correspondiente al control negativo y la estabilización de las partículas en la muestra positiva (producto de amplificación del gen *trnL*). El control negativo se preparó mediante la mezcla de productos de PCR procedente de muestras alimentarias que no contenían cereales (5 alimentos). Las concentraciones de sal estudiadas variaron entre 40 y 140 mM, observando una correcta discriminación a partir de 130 mM de NaCl (**Figura 16A**), por lo que se estableció esta concentración para los posteriores análisis.

Posteriormente, se estudió el tiempo necesario para originar el cambio de coloración específico de las muestras negativas. Aunque el objetivo de este sistema de sensor es una detección visual, también se realizó la detección instrumental (espectrofotometría visible) que permitiera una mejor precisión de los resultados. Tal y como se observa en **Figura 16B**, a partir de los 15 min ya hay diferencias relevantes entre la absorbancia a 650 nm entre la muestra positiva, que casi no varía y negativa, que aumenta significativamente. Esta variación también observable visualmente, tal y como se aprecia en la **Figura 15**. Se seleccionó 20 min como el tiempo de reacción porque presenta una mayor diferencia de absorbancia entre la muestra con cereales y el control negativo (**Figura 16B**).

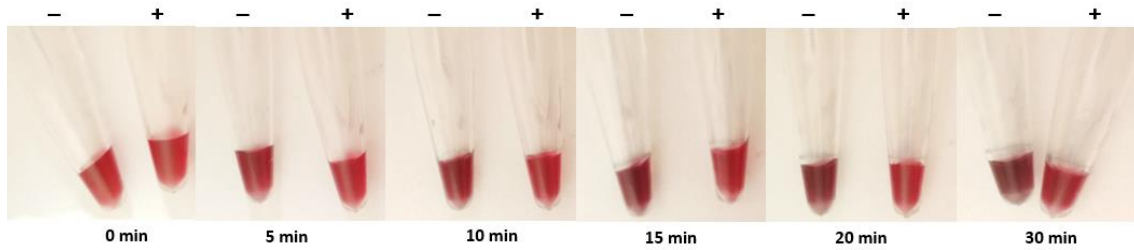


Figura 15. Fotografías de la evolución del cambio de coloración desde el momento de adición de NaCl hasta 30 min después.

Por último, se optimizó la relación entre Au-NPs y cantidad de ADN, manteniendo la concentración de partículas de oro en 2 nM y variando el factor de dilución del producto de PCR entre 1 y 30. La **Figura 16C** muestra que esta relación es muy crítica, puesto que tanto la falta como el exceso de ADN provocan la agregación de las partículas y su consecuente cambio de coloración (aumento señal a $\lambda = 650$ nm). Además, también se puede observar que la relación óptima se obtiene con factor de dilución = 3. En definitiva, con 2 nM de Au-NPs y un producto de amplificación diluido 3 veces (que corresponde con una concentración de ADN = 10 pmol), se consigue la estabilización de la muestra positiva, sin un aumento cuando $\lambda = 650$ nm.

Con estas condiciones, los espectros de absorción en la región visible fueron diferenciables (**Figura 16D**). Además de la banda a una longitud de onda de 520 nm (coloración roja), las muestras negativas originan una mayor absorción en una banda centrada a 650 nm (característica de la coloración azul).

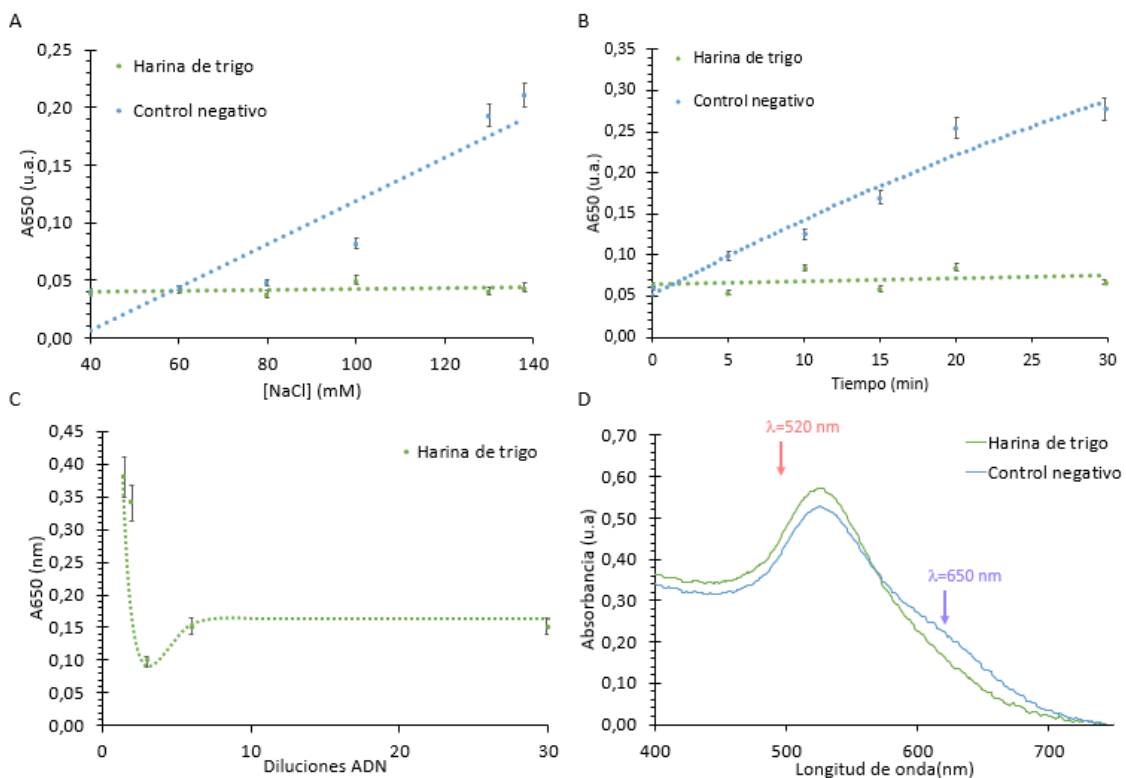


Figura 16. Absorbancias registradas en la detección con Au-NPs en harina de trigo y mezcla de productos negativos. A) Efecto de la concentración de NaCl. B) Efecto tiempo transcurrido tras la adición de NaCl. C) Efecto relación Au-NPs:ADN. D) Espectro de absorción. Gen: *trnL*. Réplicas: 2.

4.5. APLICACIÓN: ANÁLISIS DE MUESTRAS ALIMENTARIAS

4.5.1. TÉCNICAS CONVENCIONALES

Se aplicó el método de PCR convencional para el análisis de diversas muestras alimentarias para los distintos genes estudiados. Los productos amplificados se verificaron mediante fluorescencia (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de los alimentos analizadas mediante PCR y detección fluorescente para los distintos genes.

MUESTRA	<i>trnL</i>	α -gliadina	Soybean lectin S	tRNA-Leu	16S ribosomal RNA
Harina de trigo	+	+	-	+	-
Tomate	-	+	-	+	-
Harina de maíz	+	+	-	+	-
Cerdo	-	+	-	-	+
Soja texturizada	-	+	+	+	-
Longaniza de pollo	-	+	-	-	+
Sopa	+	+	-	+	+
Cereales rellenos de leche	+	+	-	+	+
Papilla multifrutas	-	+	-	+	-
Galleta de soja	+	+	+	+	-

Las señales de fluorescencia obtenidas sobre cada uno de los genes se agruparon en función de la naturaleza del alimento (grupo positivo y grupo negativo) (Figura 17). Para comprobar si la diferencia era estadísticamente significativa entre los grupos, se realizó la prueba-t student para cada gen (Tabla 8).

Todos los genes, excepto el α -gliadina, presentan una diferencia, con un 95% de confianza, entre el grupo de muestras positivo y negativo. Por lo tanto, se confirmó la capacidad del método para la correcta discriminación de los alimentos en función de su composición.

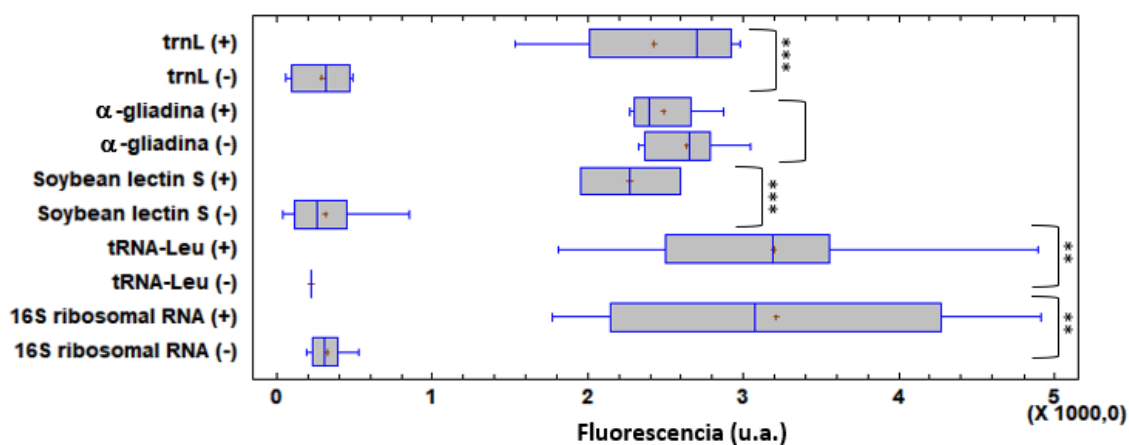


Figura 17. Diagrama de caja sobre la fluorescencia obtenida en los grupos positivos y negativos de muestras de alimentos para cada gen. Test t; ***: p-valor <0,0001; **:p-valor<0,001.

Tabla 8. Prueba-t student sobre las señales de fluorescencia de los productos de PCR generados en los grupos positivos y negativos de muestras de alimentos.

Gen	Valor-P	Estadísticamente distintos
<i>trnL</i>	0,00002	+
<i>α-gliadina</i>	0,403	-
<i>Soybean lectin S</i>	0,00003	+
<i>tRNA-Leu</i>	0,0006	+
<i>16S ribosomal RNA</i>	0,0007	+

La falta de discriminación para el gen *α-gliadina* podía ser debida a una inespecificidad de los cebadores hacia el gen diana o por la formación de dímeros de cebadores. Para identificar la causa, se recurrió a la qPCR, ya que proporciona más información de los productos generados. En la **Figura 18A**, se puede observar que en el ciclo 22 comienza la amplificación del gen diana en la muestra positiva. Sin embargo, el Ct para los negativos es solamente 6 ciclos posterior. Además, a diferencia con lo anteriormente observado para el gen *trnL*, no existen diferencias en la temperatura de fusión entre muestras (**Figura 18B**). Estos resultados se interpretaron como la formación de un producto de amplificación inespecífico y, por tanto, proporcionaban falsos positivos para todas las muestras analizadas, independientemente del método de detección utilizado. En conclusión, los datos obtenidos mediante PCR y qPCR, apuntan a falta de la selectividad de los cebadores a la región de interés, requiriendo un rediseño de estos para el gen *α-gliadina*.

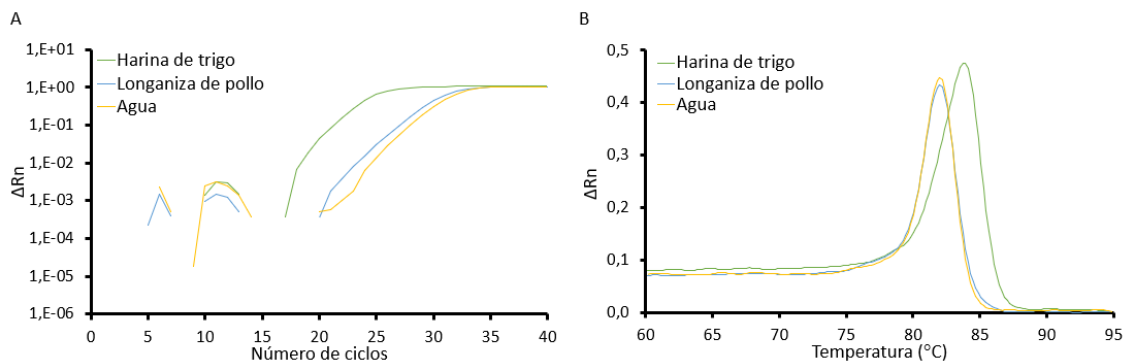


Figura 18. Señal registrada de la amplificación por qPCR en harina de trigo, longaniza de pollo y agua. A) Número de ciclos de la reacción. B) Curva temperatura de fusión. Gen: *α-gliadina*.

4.5.2. DETECCIÓN CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Se analizaron una serie de muestras previamente amplificadas y purificadas mediante el método mediado por Au-NPs. Estando compuesto por 7 muestras positivas de los diferentes genes y 1 control negativo, siendo este una mezcla de varias muestras negativas confirmadas por fluorescencia y electroforesis (**Tabla 9**).

Este ensayo tuvo una excelente selectividad (86%), tanto visual como instrumental, diferenciándose perfectamente aquellos alimentos que contenía el ingrediente diana. El único falso negativo fue el tomate, ya que se produjo un cambio de coloración, no tan evidente como el proporcionado por la mezcla de negativos, pero si diferenciable del resto de positivos.

Tabla 9. Resultado visual e instrumental de las muestras alimentarias mediante el método basado en nanopartículas de oro.

MUESTRAS	Gen	Resultado visual	Resultado instrumental (A650 nm)	Presencia del gen
<i>Harina de maíz</i>	<i>trnL</i>		0,120 ± 0,018	+
<i>Harina de trigo</i>	<i>trnL</i>		0,082 ± 0,009	+
<i>Galleta de soja</i>	<i>trnL</i>		0,102 ± 0,012	+
<i>Sopa</i>	<i>trnL</i>		0,127 ± 0,015	+
<i>Soja texturizada</i>	Soybean lectin S		0,073 ± 0,009	+
<i>Tomate</i>	tRNA-Leu		0,174 ± 0,019	+/-
<i>Longaniza de pollo</i>	16S ribosomal RNA		0,116 ± 0,014	+
Mezcla negativos	-		0,28 ± 0,02	-









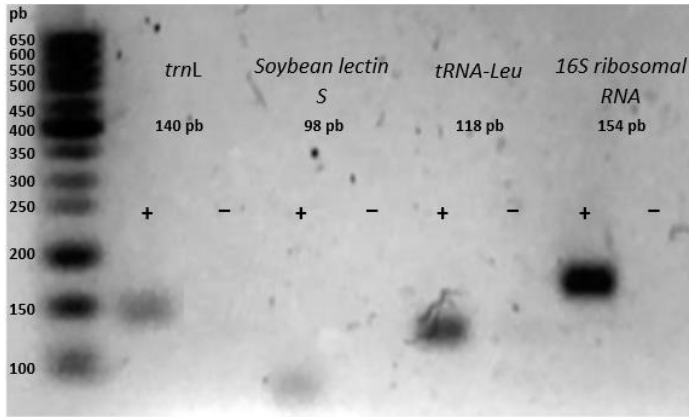
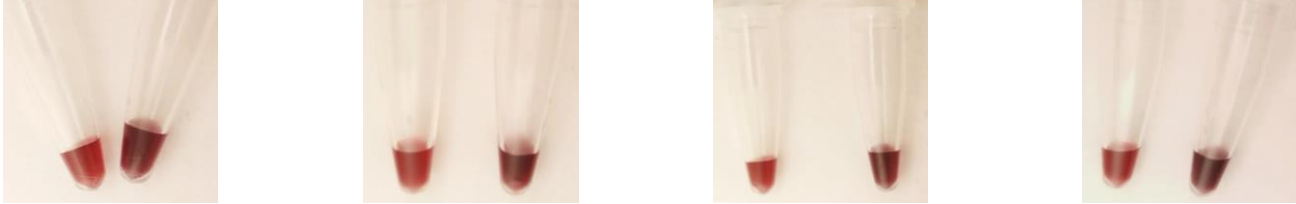
4.5.3. COMPARACIÓN DE RESULTADOS

En la **Tabla 10**, se recopilan algunos de los resultados obtenidos mediante los diferentes métodos de detección desarrollados en el presente TFG: fluorescencia, electroforesis en gel de agarosa y sensado colorimétrico mediado por Au-NPs (visual e instrumental). Destacándose el elevado grado de concordancia de los resultados y la sencillez de los métodos.

No obstante, destaca el sensado colorimétrico mediado por Au-NPs por su potencial para el control de la calidad y seguridad alimentaria basado en una aproximación de *screening*. Es un método de detección que posee una gran variedad de aplicaciones dentro de este sector industrial. Dado que se han estudiado genes diana representativos de diferentes amenazas alimentarias, las posibles aplicaciones incluyen:

- Detección de la presencia o ausencia de ingredientes facultativos, como la adición de cereales en productos cárnicos.
- Detección de prácticas fraudulentas como la sustitución de un alimento por otro, como es el caso de la venta de un producto vegano con ingredientes de origen animal.
- Identificación de alérgenos presentes en un alimento, como la presencia de soja. En el caso del gluten, dado la falta de selectividad con los cebadores, no se ha podido demostrar experimentalmente.

Tabla 10. Comparación de los resultados obtenido en el análisis de alimentos para los distintos métodos desarrollados.

TÉCNICA	<i>trnL</i>		<i>Soybean lectin S</i>		<i>tRNA-Leu</i>		<i>16S ribosomal RNA</i>		
									
	Harina de trigo	Longaniza de pollo	Galletas de soja	Tomate	Harina de maíz	Cerdo	Longaniza de pollo	Papilla multifrutas	
Fluorescencia	Señal (u.a.)	3698	166	3554	548	4506	220	4614	824
	Resultado	+	-	+	-	+	-	+	-
Electroforesis en gel de agarosa	Observación								
	Resultado	+	-	+	-	+	-	+	-
Au-NPs	Observación								
	Señal A650 (nm)	$0,082 \pm 0,009$	$0,224 \pm 0,018$	$0,073 \pm 0,009$	$0,206 \pm 0,016$	$0,112 \pm 0,013$	$0,199 \pm 0,016$	$0,916 \pm 0,011$	$0,245 \pm 0,019$
	Resultado	+	-	+	-	+	-	+	-

4.6. APLICACIÓN: DETECCIÓN DE INGREDIENTES FACULTATIVOS

En este TFG, se pretendió avanzar en la evaluación del método, estudiando una de sus posibles aplicaciones.

Actualmente la mayoría de los alimentos producidos por la industria alimentaria contienen ingredientes facultativos que deben ser controlados para proteger y/o informar a los consumidores o posteriores clientes. Como es el caso de la industria de los derivados cárnicos, puesto que Según el Real Decreto 474/2014, es lícito la inclusión de ingredientes facultativos, como las harinas de cereales que contengan gluten. La adición de estos ingredientes podría desencadenar una respuesta alérgica en ciertos consumidores. Para aumentar la seguridad alimentaria y proteger a los consumidores, se examinó si el método obtenido es capaz de identificar esta situación de forma indirecta, detectando la presencia de los cereales en las cantidades legalmente admitidas en estos productos.

4.6.1. TÉCNICAS CONVENCIONALES

Para determinar el porcentaje mínimo de cereales en un producto cárnico detectable tras la amplificación por PCR convencional, se prepararon una serie de mezclas que contenían harina de trigo y longaniza de pollo. Los porcentajes de harina de trigo fueron entre 0 y 10 %. Paralelamente, se prepararon mezclas de ADN genómico de los alimentos puros, para aislar el efecto de la extracción.

Las diferentes disoluciones fueron amplificadas utilizando cebadores específicos al gen conservado en cereales (gen *trnL*) y se midió la fluorescencia de los productos. La **Figura 19** muestra un comportamiento similar entre los dos tipos de mezclas, observándose un menor rendimiento en aquellas mezcladas antes de la extracción. Los límites de detección fueron de 1 % para la mezcla de ADN genómico y del 3 % para la mezcla de alimentos, indicando la influencia de la extracción en los resultados (por ejemplo, presencia de inhibidores).

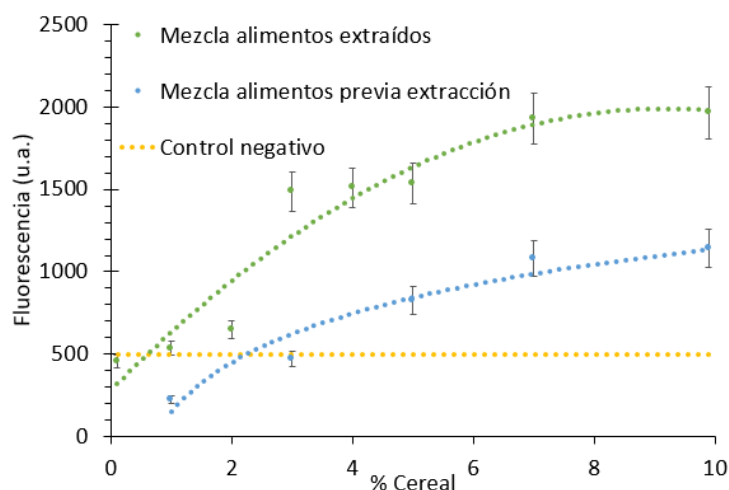


Figura 19. Señal de fluorescencia registrada del producto de la mezcla de alimentos extraídos y previa extracción. Gen: *trnL*. Réplicas: 3.

Las mezclas de alimentos que contenían de harina de trigo y longaniza de pollo también se analizaron mediante PCR en tiempo real. En la **Figura 20A**, se representan las curvas de respuesta en función del número de ciclos, observándose desplazadas a ciclos superiores cuanto menor es el contenido en cereal. El estudio termodinámico de los productos formados originó curvas de temperatura de fusión solapadas, independientemente del porcentaje de mezcla,

(Figura 20B). Por lo que se concluyó que el producto formado correspondía a la amplificación específica de los cereales. Con los Ct medidos, se elaboró la Figura 20C, determinándose que la técnica es capaz de detectar hasta un 1% de cereales en el producto cárnico.

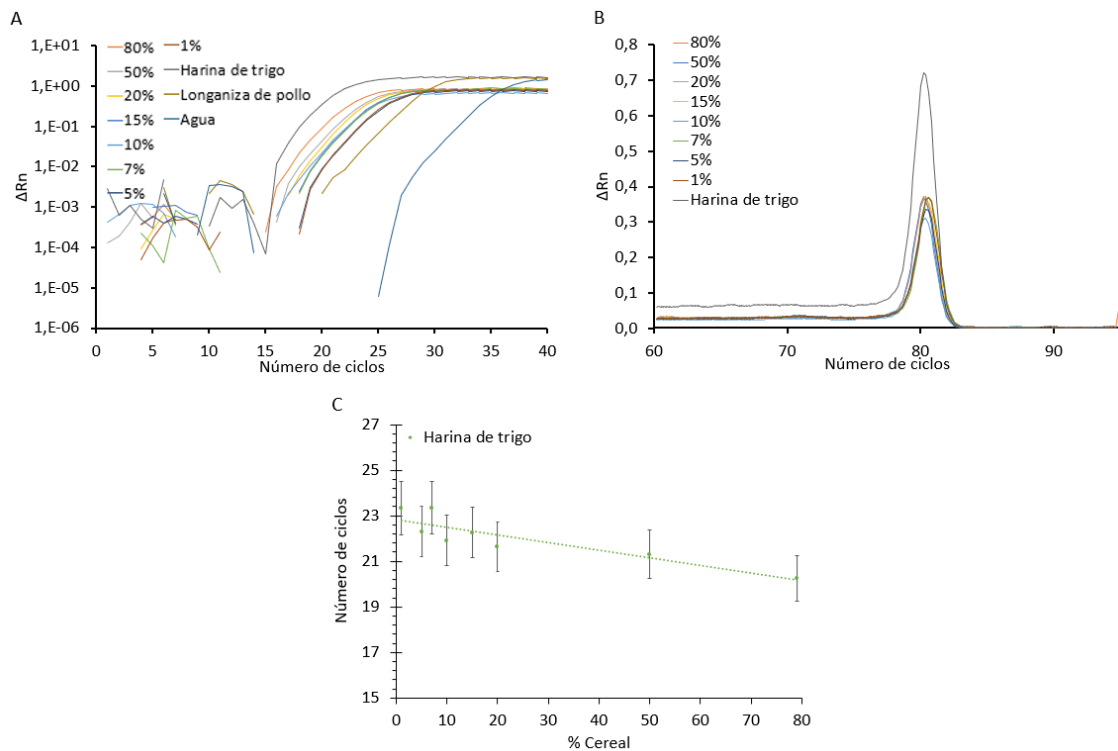


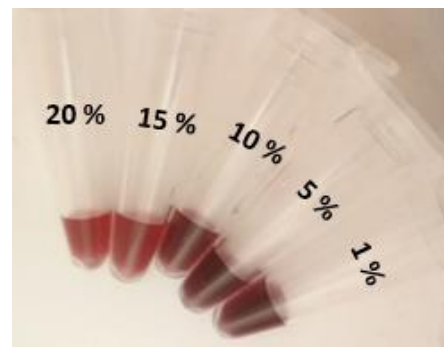
Figura 20. Señal registrada de la amplificación por qPCR en mezclas de harina y longaniza, harina de trigo, longaniza de pollo y agua. A) Número de ciclos de la reacción. B) Curva temperatura de fusión. C) Número de ciclos en función del porcentaje de cereal. Gen: *trnL*. Réplicas: 2.

4.6.2. DETECCIÓN CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Para establecer el porcentaje de cereales detectable mediante nanopartículas de oro, se estudiaron diversas mezclas compuestas por harina de trigo y longaniza de pollo. Las disoluciones resultantes fueron examinadas de forma visual y medidas con un espectrofotómetro a 650 nm, 20 min después de la adición de NaCl (Tabla 11).

Tabla 11. Resultado instrumental y visual obtenidos a partir de las mezclas de harina de trigo con longaniza de pollo. Gen: *trnL*.

MUESTRAS (% cereal)	RESULTADO INSTRUMENTAL (A650 nm)
100	0,080 ± 0,006
20	0,078 ± 0,006
15	0,082 ± 0,007
10	0,170 ± 0,014
5	0,188 ± 0,015
1	0,201 ± 0,016
0	0,203 ± 0,017



Para estimar si las diferencias eran estadísticamente significativas, se empleó el análisis ANOVA. La **Tabla 12** muestra que el valor del estadístico F, y puesto que el valor-P, fue menor que 0,05, se concluyó que existía una diferencia estadísticamente significativa (con un 5% de significación) entre las mezclas.

Tabla 12. Análisis ANOVA sobre la variación de la absorbancia a 650 nm en función del porcentaje de harina de trigo. Gl: Grado de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F	Valor-P
Entre grupos	0,06	6	0,011	3010	0,0000
Intra grupos	0,00005	14	0,000		
Total (Corr.)	0,06	20			

Para establecer que porcentajes de cereal eran significativamente diferentes, se realizaron las pruebas de múltiples rangos con un 95 % de confianza (**Tabla 13**). Se identificaron 4 categorías que presentaron diferencias estadísticamente significativas en las absorbancias a 650 nm. La primera corresponde con las mezclas entre 100 y 15 %, los cuales no modifican la absorbancia a $\lambda = 650$ nm durante toda la reacción. A continuación, se encuentra el grupo 2 y 3 siendo un 10 y 5 % de harina de trigo respectivamente, ambos grupos aumentan su absorbancia en $\lambda_{650\text{ nm}}$, pero sin alcanzar el grupo negativo. En el último grupo se encuentra las mezclas que proporcionan un resultado negativo, estas son las que contienen un 1 y 0 % de cereal. Obteniéndose un límite de detección del 5 % de cereales.

Tabla 13. Pruebas de múltiples rangos para la identificación de grupos homogéneos.

Porcentaje de cereal	Casos	Media	Grupos
20	3	0,08	1
100	3	0,08	1
15	3	0,08	1
10	3	0,17	2
5	3	0,19	3
1	3	0,2	4
0	3	0,2	4

4.7. ESTUDIO DE IMPLEMENTACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El método satisface las expectativas debido a que es capaz de discriminar alimentos que contengan más de un 5 % de cereales, permitiendo detectar ingredientes facultativos que se encuentran en un porcentaje inferior al límite legal (10 % de cereales).

Además, se evaluaron prestaciones operacionales, realizando un análisis del tiempo y coste que implicaría la ejecución del ensayo por muestra alimentaria (**Tabla 14**). Se comprueba que es un método rápido (285 min) y de bajo coste (1,7 €), evidenciando que es competitivo con el resto de los métodos presentes en el mercado.

No obstante, el sistema puede mejorarse mediante el empleo de un kit de amplificación que no requiere una extracción previa (Phire Plant Direct PCR Master Mix). Si se aplica esta variante, el coste del análisis aumenta únicamente 0,2€, mientras que el tiempo se reduce a 135 min.

Respecto al equipamiento inventariable necesario, únicamente se requiere un termociclador, disponible a partir de 3000 € y una ultracentrífuga para la extracción de ADN y la purificación del producto de PCR, disponible desde 500 €

Tabla 14. Análisis del tiempo y coste por réplica del método mediado por nanopartículas de oro.

TÉCNICA	TIEMPO (min)	COSTE POR ANÁLISIS(€)
<i>Extracción método CTAB</i>	150	0,4
<i>PCR de punto final</i>	95	0,3
<i>Purificación ADN</i>	10	0,8
<i>Au-NPs</i>	30	0,2
Total	285	1,7

5. CONCLUSIONES

Este TFG ha contribuido en el desarrollo de un sistema de biosensado dirigido a aumentar la seguridad alimentaria de los consumidores y poseer unas características adecuadas para ser implementado de forma masiva en la industria alimentaria. Los resultados más relevantes obtenidos durante este proceso son:

1. Las prestaciones del método de extracción se han evaluado en función del procesado y se ha comprobado que es válido para cualquier tipo de alimento, debido a que no se produce efecto matriz que influye en los posteriores ensayos.
2. A pesar de no lograrse para el gen α -gliadina del gluten, se han amplificado selectivamente los otros cuatro genes diana, alcanzándose niveles de amplificación y pureza adecuados de acuerdo con los resultados obtenidos mediante las técnicas PCR-fluorescencia, PCR-electroforesis y PCR en tiempo real.
3. Se ha desarrollado un método de *screening* basado en la detección mediada por nanopartículas de oro muy prometedor y novedoso que permite determinar la presencia o ausencia de un gen determinado de forma sencilla, barata y rápida.
4. El método se ha aplicado de forma exitosa a la detección de cereales cuando actúan como ingrediente facultativo en productos cárnicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (2019). Visto el 21 de julio, 2019.
http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2019/eurobarometro.htm?_ga=2.232930712.729369822.1562595528-750921952.1562595528
- Alcilia, E. C., & Radke, S. M. (2003). Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, *18*(5–6), 841–846.
- Besler, M. (2001). Determination of allergens in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *20*(11), 662–672.
- Chang, C.-C., Chen, C.-P., Wu, T.-H., Yang, C.-H., Lin, C.-W., Chen, C.-Y., ... Chen, C.-Y. (2019). Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Strategies for Chemical and Biological Sensing Applications. *Nanomaterials*, *9*(6), 861.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*(13), 39–40.
- Guo, X. (2012). Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *Journal of Biophotonics*, *5*(7), 483–501.
- Gupta, S., Kaushal, A., Kumar, A., & Kumar, D. (2019). Recent advances in biosensors for diagnosis of celiac disease: A review. *Biotechnology and Bioengineering*, *116*(2), 444–451.
- Hefle, S. L., & Taylor, S. L. (2004). Food allergy and the food industry. *Current Allergy and Asthma Reports*, *4*(1), 55–59.
- Lederer, E., & Lederer, M. (1954). Chromatography. A review of principles and applications. *Chromatography. A Review of Principles and Applications*.
- Leffler, D. A., Green, P. H. R., & Fasano, A. (2015). Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *12*(10), 561–571.
- Li, F., Li, F., Yang, G., Aguilar, Z. P., Lai, W., & Xu, H. (2018). Asymmetric polymerase chain assay combined with propidium monoazide treatment and unmodified gold nanoparticles for colorimetric detection of viable emetic *Bacillus cereus* in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *255*, 1455–1461.
- Li, H., & Rothberg, L. (2004). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(39), 14036–14039.
- Mariné Font, A., Vidal Carou, M. C., & Carou, M. C. V. (2001). Seguridad y riesgo de toxicidad de los alimentos: un debate actual. *Arbor*, *168*(661), 43–63.
- Monaci, L., & Visconti, A. (2010). Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(6),
- New, L. S., Schreiber, A., Stahl-Zeng, J., & Liu, H.-F. (2018). Simultaneous Analysis of Multiple Allergens in Food Products by LC-MS/MS. *Journal of AOAC International*, *101*(1), 132–145.
- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, *21*(1), 1–31.
- Rodrigo, G., Salcedo, E., & Urruzuno, P. Alergia alimentaria.

- Sánchez Rojas, F., & Bosch Ojeda, C. (2009). Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008. *Analytica Chimica Acta*, 635(1), 22–44.
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., ... Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5590), 2275–2279.
- Sicherer, S. H. (2011). Epidemiology of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 594–602.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S116–S125.
- Sollid, L. M. (2000). Molecular Basis of Celiac Disease. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 53–81.
- Tortajada-Genaro, L. A., Santiago-Felipe, S., Morais, S., Gabaldón, J. A., Puchades, R., & Maquieira, Á. (2012). Multiplex DNA Detection of Food Allergens on a Digital Versatile Disk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 36–43.
- van Hengel, A. J. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 111–118.

ANEXO

Tabla Suplementaria. Caracterización de las muestras simples extraídas mediante el método CTAB.
 Leyenda: ■ Pureza óptima; ■ Contaminación con ARN. ■ Contaminación con proteínas o compuestos aromáticos.

MUESTRAS SIMPLES	[ng/μL]	A260/A280	Pureza ADN	Tipo de procesado
Tomate	80 ± 2	2,090 ± 0,014		Ninguno
Harina de maíz	961 ± 106	2,014 ± 0,010		Molienda o trituración
Harina de trigo	70 ± 20	2,47 ± 0,06		Molienda o trituración
Cereales rellenos de leche	106 ± 20	2,030 ± 0,014		Extrusión en caliente
Rosquilletas	404 ± 258	1,47 ± 0,06		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Albóndiga vacuno / cerdo	690,8 ± 321	0,94 ± 0,04		Triturado
Galleta de soja	1511 ± 6	1,98 ± 0,04		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Maíz	132 ± 3	1,83 ± 0,08		Ninguno
Papilla multifrutas	76 ± 1	1,410 ± 0,014		Triturado + tratamiento térmico
Galletas de muesli	366 ± 106	1,78 ± 0,06		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Pez	638 ± 2	2,08 ± 0,03		Ninguno
Maíz Bt	341 ± 7	2,09 ± 0,02		Ninguno
Nocilla	231 ± 4	1,155 ± 0,007		Trituración
Galleta de chocolate	320 ± 6	1,856 ± 0,007		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Avena	720 ± 324	1,53 ± 0,04		Ninguno
Trigo	342 ± 18	1,98 ± 0,02		Ninguno
Sopa	959 ± 2	1,885 ± 0,007		Cocción
Pienso	237 ± 1	1,770 ± 0,014		Extrusión en caliente
Papilla de cereales	73 ± 1	1,58 ± 0,02		Triturado + tratamiento térmico
Galleta de mantequilla	256 ± 1	1,915 ± 0,007		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Quinoa	327 ± 425	1,72 ± 0,13		Ninguno
Arroz	122 ± 39	2,18 ± 0,09		Ninguno
Longaniza pollo	425 ± 87	2,080 ± 0,014		Extrusión en frío
Soja texturizada	351 ± 196	1,72 ± 0,04		Extrusión en caliente
Cebolla	119 ± 10	2,220 ± 0,014		Ninguno
Cerdo	379 ± 103	1,94 ± 0,05		Ninguno
Tenera	134 ± 34	1,865 ± 0,007		Ninguno

Marta Villamayor^a, Ana Lázaro^b, Luis A. Tortajada-Genaro^{a,b,c}, Ángel Maquieira^{a,b,c}

^a Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, E46022, Valencia, Spain

^b Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IOM), Universitat Politècnica de València-Universitat de València, Camino de Vera s/n, E46022 Valencia, Spain

^c Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, E46022 Valencia, Spain.

E-mail: marville@etsiann.upv.es

INTRODUCCIÓN

Según el Real Decreto 474/2014, es lícito incluir en los derivados cárnicos ingredientes facultativos, como harinas de cereales que contengan potencialmente gluten. Dado que en ciertos individuos desencadenaría en una enfermedad celíaca o una respuesta alérgica, es recomendable identificar este componente, para proteger a los consumidores. El objetivo del trabajo es el estudio de un método competitivo y adaptado a las necesidades de la industria alimentaria.



EXTRACCIÓN DEL ADN

Muestras alimentarias de distinta composición y procesado.

Tabla 1. Pureza ADN muestras extraídas mediante el método CTAB. Leyenda: ■ A260/280 entre 1,7-2,0 → Pureza óptima; ■ A260/280 superior a 2,1 → Contaminación con ARN; ■ A260/280 inferior a 1,6 → Contaminación con proteínas o compuestos aromáticos

MUESTRAS	PUREZA ADN	TIPO DE PROCESADO
Tomate		Ninguno
Harina de maíz		Molienda o trituración
Harina de trigo		Molienda o trituración
Cereales millemos		Extrusión en caliente
Rosquilletas		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Galleta de soja		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Maíz		Ninguno
Papilla multicereales		Triturado + tratamiento térmico
Galletas de muesli		Fermentación alcohólica + tratamiento térmico
Pez		Ninguno
Champiñón		Ninguno
Trigo		Ninguno
Sopa		Cocción
Plenno		Extrusión en caliente
Cerdo		Ninguno
Quinoa		Ninguno
Longaniza pollo		Extrusión en frío
Soja texturizada		Extrusión en caliente

AMPLIFICACIÓN REGIÓN DE INTERÉS

Análito: gen trnL

Técnica de amplificación: PCR

Confirmación: Fluorescencia (agente intercalante SYBR Green) y electroforesis en gel (fluoróforo Realsafe).

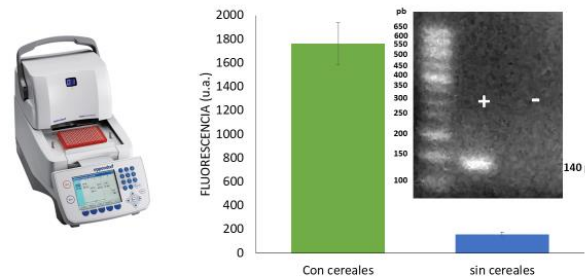


Figura 1. Señal registrada en fluorescencia e imagen del gel del producto de amplificación para muestras de cereales y alimentos sin cereales.

DETECCIÓN COLORIMÉTRICA MEDIANTE Au-NPs

Sensado: En ausencia del gen diana, se produce la agregación de las nanopartículas de oro (10 nm), provocando un cambio de color de rojo a azul-púrpura en la disolución coloidal.

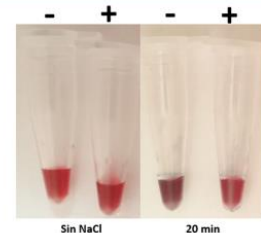
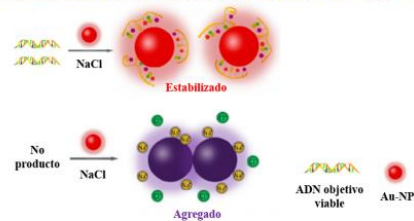


Figura 4. Fotografías de muestras iniciales y tras la adición de NaCl. Izquierda: Sin cereales. Derecha: Con cereales.

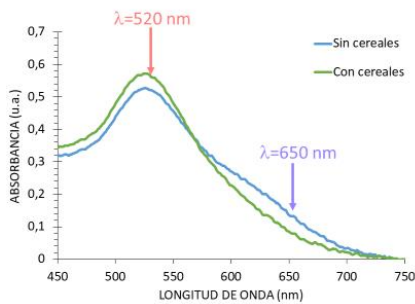


Figura 2. Espectro absorción 20 min después adición NaCl.

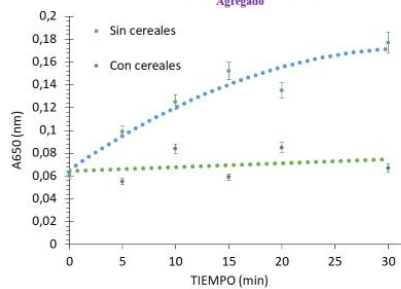


Figura 3. Efecto del tiempo de incubación de las nanopartículas en la absorción a $\lambda=650$ nm.

Tabla 2. Resultados obtenidos para los alimentos estudiados.

MUESTRAS	Color observado	Presencia cereales
Tomate		-
Harina de trigo		+
Galleta de soja		+
Cerdo		-
Sopa		+
Longaniza pollo		-
Soja texturizada		-

CONCLUSIONES

- Amplificación específica del gen trnL en las muestras que contienen cereales.
- Clasificación de las muestras basada en el biosensado colorimétrico directo.
- Obtención de una alternativa a los métodos convencionales, con mejores prestaciones con respecto a la duración del ensayo, la portabilidad y el costo del análisis.



ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from E.U. FEDER, BIOHOLOG (MINECO CTQ2016-75749-R) and MINECO. CDTI, programa estratégico CIEN., 2017. Proyecto Tolera.

Póster semifinalista en el XIII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition (IWOSMOR).