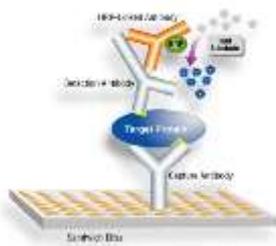
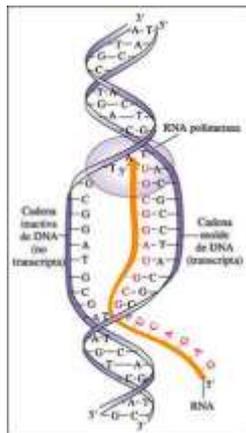


**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA – LA
MOLINA, 2010**

Patricia Glorio Paulet, Ph.D

Técnicas Modernas de Investigación en Ciencia de Alimentos

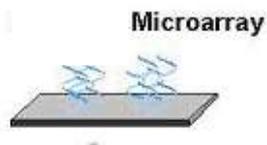


**(Aplicaciones de Biología Molecular y
uso de Lector de Micropozos)**

**Obra de año
Sabático.**



PCR



ACERCA DE ESTE LIBRO

En este volumen de Técnicas Modernas de Investigación revisa publicaciones científicas recientes en revistas especializadas del área alimentaria, el estado del arte de la aplicación, de técnicas basadas en conceptos de biología y bioquímica molecular y en técnicas de tipo espectrofotométrico adaptadas a un formato de micropozos. Se presentan primero, los conceptos básicos necesarios y terminología, para la adecuada comprensión del funcionamiento de los equipos necesarios y discusión de protocolos moleculares que son utilizados en investigación para el área alimentaria.

Constatamos, que los conocimientos científicos de tipo básico que normaron los inicios de la biología molecular, ahora tienen una connotación de ciencia aplicada al ser de uso muy frecuente por los científicos de alimentos e incluso por algunos sectores de la industria alimentaria. En ésta última la disponibilidad de “kits” basados en tecnología de hibridación con interface a sistemas de cómputo e inteligencia para análisis de imágenes complejas, permiten la obtención de respuestas rápidas y definitivas sobre la calidad de los productos.

Esta revisión encuentra una evolución favorable hacia los formatos de micropozos en equipos que permiten un análisis espectroscópico, (como la tradicional medida de los valores de absorbancia UV-VIS) u otros menos comunes tales como los de Fluorescencia y FRET; con lo que se abre a los investigadores la posibilidad para realizar estimaciones exploratorias en un número grande de muestras y a costo reducido, como ocurre en las estimaciones de la presencia de micotoxinas en alimentos. Por otro lado, de las diversas publicaciones, que abordan el tema de estimación de

componentes fenólicos por espectrofotometría y estudios de ORAC, los investigadores han obtenido protocolos prácticos en formato de micropozos con posibilidades de estandarización que permiten encontrar información sobre diferentes componentes alimentarios con potencial para elevar el nivel de vida de la población.

La inspección de las diferentes técnicas moleculares, que hacen ahora posible, la identificación inequívoca de las cepas microbianas, favorecerá la comprensión de artículos científicos del área de microbiología de alimentos en donde será posible identificar y el porqué de la selección de una determinada metodología como de sus limitaciones en las aplicaciones de análisis de alimentos. Asimismo si nos encontramos en el área industrial podremos comprender el significado de los resultados de laboratorios especializados acerca de la identificación final de patógenos, de la identificación de alimentos genéticamente modificados y/o de alimentos alergénicos, y también comprender las ventajas y limitaciones de estos resultados usando estas técnicas.

Una comprensión clara de estas técnicas motivará al tecnólogo de alimentos seguir actualizándose con la lectura de los más recientes artículos científicos publicados en su área, sin reparos en su capacidad de comprenderlos apropiadamente. Esta capacidad de auto actualizarse nunca se debe perder en el Ingeniero Alimentario ya que le proporcionará la confianza necesaria para la toma de decisiones adecuada que le permitan desarrollar una industria próspera.

Después de leer este libro, la recomendación más obvia será la de seguir leyendo artículos científicos en el área de alimentos. En los tiempos actuales la Internet permite acceder a información actualizada, en algunos casos previo pago, pero en otros es libre. Recomiendo el acceso a bibliotecas actualizadas de las universidades y centros de investigación

local y también a algunas páginas como las de “Google scholar”, “ift.org”. “acs.org” “AACC” entre otras. Los Tecnólogos con vocación científica, encontrarán muy de su agrado una mejor comprensión de las técnicas modernas de investigación y podrán orientar mejor sus objetivos de acuerdo a la problemática de su entorno.

PATRICIA GLORIO PAULET

AGRADECIMIENTO

A mis padres y familiares por su apoyo, a mis amigos por su confianza y a Dios por todo.

A las siguientes universidades: Universidad Agraria La Molina (Lima – Perú); Cornell University y otros; por haber sido fuente de conocimiento para mi persona a través de diversos programas educativos y de intercambio en los que participé, tales como al programa de Becas de Maestría del “Concytec” y al programa Fulbright para estudios de Post-Grado.

A las organizaciones profesionales tanto locales como internacionales relacionadas con los alimentos, quienes publican información actualizada, organizan congresos y cursos para la constante actualización de sus miembros.

A mis colegas especializados a los que hice muchas preguntas pero los cuales no tienen ninguna responsabilidad de los errores y omisiones encontradas en este libro.

A la Dra Carmen Velezmoro; a la Dra Laura Franzetti y al IILA quienes me permitieron visitar y entrenarme durante dos meses en el laboratorio de Microbiología de alimentos de la Università degli studi di Milano (Milan,

Italia) con procedimientos prácticos para la identificación de microbios ácido-lácticos por técnicas moleculares.

A la Dra Flor Rodríguez y a su profesor Dr David M. Spooner quienes me permitieron visitar el laboratorio de Taxonomía Genética en Madison Wisconsin University (USA) durante una semana de mi año sabático. (Observación de protocolo de PCR) Al Kobe Institute of Health y al programa JICA, por el curso de determinación de micotoxinas en el que participé en 1998. A la Dra Sussanze Talcot de la Universidad de Texas AM por permitir entrenarme en su laboratorio en el análisis de fenólicos y propiedades bioactivos usando “microplatereader”. Al programa Norman Bourlaugh de Agricultura Internacional en Texas por pasantía.

ADVERTENCIA

Las ilustraciones o figuras son adaptaciones de otras publicaciones (obtenidas de la web y de artículos científicos) y por lo tanto no son originales. Me encuentro en búsqueda de fuentes de financiamiento para cambiarlas por dibujos originales o en su defecto hacer tramites para conseguir el permiso de los dueños de las mismas para poderlas publicar dentro de este libro sin infringir los derechos de copyright.

TABLA DE CONTENIDO

ACERCA DE ESTE LIBRO	2
AGRADECIMIENTO	4
ADVERTENCIA	5
CAPÍTULO I	11
INTRODUCCIÓN: GENERALIDADES SOBRE TECNICAS MODERNAS EMPLEADAS EN LA INVESTIGACION DE ALIMENTOS.	11
1.1 Marco Actual de la Investigación en el Área de Alimentos. Dimensión compleja de los alimentos.	13
1.2 Métodos Analíticos usados en Investigación en Alimentos.	19
1.2.1. <i>Cromatografía líquida (CL).</i>	19
1.2.3. <i>Cromatografía gaseosa (GC).</i>	21
1.2.4 <i>Cromatografía líquida (CL) o gaseosa (CG) acoplada a un Espectrómetro de Masas (MS)</i>	23
1.2.5. <i>Ionización de electrospray (ESI-MS).</i>	25
1.2.6. <i>El sistema de Cromatografía líquida de "Ultra Performance".</i>	25
1.2.7. <i>Espectrometría de masas por plasma inductivamente acoplado (ICPMS).</i>	26
1.2.8 <i>Espectroscopia Infrarroja con transformación de Fourier (EITF ó FTIR)</i>	26
BIBLIOGRAFÍA DEL CAPITULO 1	29
CAPÍTULO II	32
CONCEPTOS BÁSICOS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y ALGUNAS TÉCNICAS BÁSICAS DE IDENTIFICACIÓN EN MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS.	32
2.1 Técnicas Aplicadas a la identificación de Microbios en Alimentos.	32
<i>Pruebas morfológicas.</i>	34
<i>Respuestas bioquímicas directas.</i>	35
<i>Respuestas bioquímicas ante habilidades metabólicas complejas.</i>	36
<i>Diferencias respecto a factores extrínsecos.</i>	37
<i>Pruebas moleculares de identificación.</i>	38
2.2 Algunos Conceptos de Biología y Bioquímica Molecular	39
2.2.1 <i>La Bioquímica y Biología molecular.</i>	39
2.2.2 <i>El ADN o DNA (en Inglés).</i>	40
2.2.3 <i>Algunas Técnicas básicas de biología Molecular.</i>	41

a)	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
b)	Gel electroforesis	43
c)	ITS (del inglés: “internal transcribed spacer”).	43
d)	La fracción 16S rDNA.	43
a)	RAPD	45
2.2.4	Introducción a algunas aplicaciones prácticas para la Identificación de microorganismos con técnicas moleculares.	45
BIBLIOGRAFÍA DEL CAPITULO 2		49
CAPÍTULO III		51
CARACTERÍSTICAS INSTRUMENTALES DE LOS LECTORES DE MICROPOZOS DE UBICACIÓN ACTUAL EN EL MERCADO.		51
3.1	Luz, absorción, emisión y Lectores: Conceptos básicos.	51
3.2	Luz: Conceptos Básicos.	52
3.2.1	Transmitancia.	52
3.2.2	Absorbancia.	53
3.2.3	Dispersión.	57
3.2.4	Fotoluminiscencia: Fluorescencia y Fosforescencia.	58
3.2.5	Quimioluminiscencia, Bioluminiscencia.	59
3.3	Lectores. Comparación entre lector de absorbancia en cubetas tipo celdas vs lector de absorbancia en micropozos.	61
3.4	Origen de los lectores en formato de micropozos.	62
3.4.1	Aplicaciones de Absorción Ultravioleta, Visible y Emisión en Fluorescencia en la Investigación con Alimentos.	64
3.4.2	Algunas de las ventajas y desventajas de los formatos de micropozos.	65
3.5	Ubicación Actual de los Lectores de Micropozos en el Mercado.	66
3.5.1.	Equipos con sistema de detección uni-modal “Single-mode detection”	67
3.5.1.1.	Detectores de Absorbancia.	67
3.5.1.2.	Detectores de Fluorescencia.	67
3.5.1.3.	Detectores de Luminiscencia.	69
3.5.2.	Equipos con múltiples sistemas de detección.	69
3.5.3	Accesorios comunes en laboratorios para lectores de micropozos.	71
BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 3		72
CAPÍTULO IV		74
EL LECTOR DE MICROPOZON EN ANALISIS FISICO-QUIMICO DE ALIMENTOS Y ALGUNAS APLICACIONES PRÁCTICAS		74
4.1	Cuantificación de proteínas mediante lecturas en el rango ultravioleta.	74
4.2	Cuantificación de Carbohidratos.	76
4.3	Oxidación de β-caroteno.	78
4.4	Aminoácidos libres en Quesos.	79

4.5 Medición de los aminoácidos libres	80
4.6 Aplicaciones Prácticas	82
4.6.1 <i>Ensayo total de Proteína “Método Bradford”</i>	82
4.6.1.1 Reactivos y materiales:	84
4.6.1.2 Preparación de la curva estándar.	84
4.6.1.3 Leer la Absorbancia.	86
4.6.1.4 Cálculo de la concentración proteica.	86
4.6.2. <i>Ensayo de Fenólicos Totales en formato de micropozos</i>	89
4.6.2.1. Posibles interferencias.	89
4.6.2.2. Reactivos Químicos:	90
4.6.2.3. Preparación de la curva estándar y análisis de las muestras.	91
4.6.2.4. Leer la Absorbancia	92
4.6.2.5 Cálculo de la concentración de Fenólicos.	92
4.6.3 Determinación de la capacidad de absorción de especies radicales libres de oxígeno (ORAC) en formato de micropozos.	93
4.6.3.1. Procedimiento.	96
4.6.3.2. Reactivos.	96
4.6.3.3. Posibles interferencias.	98
4.6.3.4. Preparación de la curva estándar y análisis de las muestras.	98
4.6.3.5 Cálculo de la concentración de los valores ORAC.	100
BIBLIOGRAFÍA DEL CAPITULO 4	104
CAPÍTULO V	108
TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A ALIMENTOS, INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y ALGUNAS APLICACIONES.	108
5.1. Técnicas moleculares aplicadas a Alimentos.	108
5.1.1 Algunas definiciones:	110
5.1.1.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).	110
5.1.1.3 Multiplex PCR.	114
5.1.1.4 “Nested” PCR (PCR anidada).	116
5.1.1.5 PCR- RFLP.	118
5.1.1.6 PCR en tiempo real.	120
5.1.1.7. Amplificación de RNA. Se utilizan técnicas como las de amplificación de transcripción reversa (RT-PCR)	123
5.1.1.8 Secuenciación del ADN.	127
5.1.1.9 Un Microarray de DNA “Microarray Technology”.	134
5.1.1.10 Aplicaciones recientes de la tecnología de los microarreglos o “microarrays” en la Industria de los Alimentos.	135
A. <i>Identificación de un origen transgénico en los alimentos:</i>	135
B. <i>Aplicaciones en la detección de Adulteraciones:</i>	139
C. <i>Aplicaciones en la investigación de los efectos moleculares de los ingredientes bioactivos de los alimentos.</i>	141
D. <i>Aplicaciones en el estudio de los genes de resistencia bacterianos.</i>	142
E. <i>Aplicaciones en la industria cárnica.</i>	144
F. <i>Aplicaciones en la industria vitivinícola.</i>	146
5.2 Instrumentación Utilizada para las Técnicas Moleculares:	147
5.2.1. Para la extracción de ADN:	147
5.2.2 Los Termocicladores.	150
5.2.3. Equipo de PCR en tiempo real.	153

Partes de un PCR en tiempo real.	155
5.2.4. Equipos utilizados para evaluar la calidad del ADN amplificado.	159
5.2.4.1 El equipo del Nanodrop™.	159
5.2.4.2 Técnicas de electroforesis y “blotting”.	159
5.2.4.2.1 Electroforesis en gel.	161
5.2.4.2.2. Técnicas de Blotting.	169
5.2.4.2.3. Lectores de Microarray “scanners”.	169
BIBLIOGRAFÍA DEL CAPITULO 5	172
CAPÍTULO VI	177
VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA INVESTIGACIÓN DE INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS. (APLICACIONES PRÁCTICAS)	177
6.1 Principales métodos de identificación de agentes causantes de ETAS.	177
6.2. Métodos moleculares utilizados en la identificación de agentes de ETAS.	179
6.2.1 Ventajas y desventajas del análisis de microorganismos mediante técnicas de PCR.	181
6.2.2 Alternativas adoptadas, para vencer las desventajas mencionadas anteriormente.	186
6.3 Descripción de los métodos moleculares usados en la identificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas.	187
6.3.1 Electroforesis en campo pulsado o pulsante (PFGE).	187
6.3.2 Análisis del número variable de tándems repetidos en locus múltiples (MLVA).	189
6.3.3 Técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) y PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR).	193
6.3.4 Ribotipado.	193
6.3.5 Polimorfismo singular de nucleótidos (SNP) “snip”.	194
6.3.6 Secuenciamiento de ácidos nucleicos en uno o varios loci.	195
6.3.7 Técnicas de AFLP.	196
6.3.8 Técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).	197
6.3.9 Método de PCR en tiempo real con sistema de detección de tipo sonda fluorescente no dependiente de una secuencia específica.	200
6.3.10 Combinación de hibridación con PCR.	200
6.3.11 Sistema BAX para E. coli O157:H7.	201
6.4. Ejemplo de algunas aplicaciones de técnicas moleculares en el estudio de la inocuidad de alimentos.	203
6.5 Identificación de especies animales.	207
BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 6	216
CAPÍTULO VII	219
VENTAJAS Y DESVENTAJAS TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN CON LECTOR DE MICROPOZOS, EN LA INVESTIGACIÓN ENZIMÁTICA Y DE INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS. (APLICACIONES PRÁCTICAS)	219
7.1 Aplicaciones en estudios en actividad enzimática.	220
7.2 Estudios de viabilidad celular.	225

7.3 Determinación de cianógenos totales de cassava. (<i>Manihot esculenta Crantz</i>) (Yuca).	228
7.4 Aplicaciones prácticas del lector de micropozos al campo de los inmunoensayos.	230
7.4.1 ELISA Competitivo.	231
7.4.2 Detección de Bisphenol A en formato de ELISA.	233
7.4.3 Detección de Melanina en Formato de ELISA competitivo.	236
7.4.4 Monitoreo de Crecimiento Microbiano.	237
BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 7	242
GLOSARIO	246
INDICE	253

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN: GENERALIDADES SOBRE TECNICAS MODERNAS EMPLEADAS EN LA INVESTIGACION DE ALIMENTOS.

Para la industria nacional y organismos nacionales de regulación y control, el uso de técnicas de análisis de última generación es infrecuente. Los posibles adulteradores de alimentos, al adquirir conocimiento de la técnica que es usada para el control de calidad los productos, diseñan estrategias de adulteración indetectables bajo esas condiciones. Para el monitoreo de la calidad de alimentos son importantes las metodologías rápidas y exactas. Los métodos espectroscópicos de aplicación reciente a alimentos (como los que usan espectrofotometría, fluorescencia o radiación en el infrarrojo) están mostrando eficacia y eficiencia, constituyendo una alternativa razonable a los “métodos rápidos” tradicionales, los que frecuentemente se comercializan en el formato de “kits de detección”.

AOAC (1994), define un “kit de detección” como un sistema conformado por los elementos más necesarios para una determinación analítica de un componente en una matriz dada. Estos elementos son comercializados juntos en un empaque. Esto constituye un kit. El kit incluye directivas de uso. Los kits actualmente están basados en formatos muy variados que van desde enzimas, electrodos, inmuno-ensayos y últimamente en nano-partículas. Algunos kits ofrecen ventajas de portabilidad, simplicidad y rapidez, facilitando su uso en condiciones de campo. Los kits son frecuentemente considerados robustos debido a que sus resultados son poco afectados por pequeños cambios en las condiciones del entorno, favoreciendo los trabajos de sondeo exploratorio en el área

agropecuaria e industria alimentaria (Alldrick, *et al.*, 2009; Connolly, *et al.*, 2007; Creeke, *et al.*, 1996; Ellis Richard, 1996). Tal es así que AOAC International, (nombre legal establecido en 1992 y que frecuentemente se le ve acompañado de la etiqueta: “Association of Analytical Communities”) reporta varios métodos, los cuales en forma de kits, se encuentran validados en términos a su funcionamiento acorde a lo especificado por el fabricante (Schubert-Ullrich, *et al.*, 2009). Dentro de ellos, los orientados a detectar peligros biológicos y químicos en los alimentos se encuentran entre los más usados. Algunos de los kits microbiológicos son desarrollados (Ver: <http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>), para una cepa específica de microorganismos (Chiueh, *et al.*, 2001); y otros, para un determinado tipo de matriz alimentaria. Se recomienda el uso de kits validados para el tipo de alimento en los que se hará la determinación del microorganismo patógeno, a fin de evitar problemas de interferencias por componentes de la matriz del alimento. Por ejemplo: Sharma, *et al.*,(2005) recomienda en las estimaciones exploratorias en alimentos el uso de kits para detectar la neurotoxina de *Clostridium botulinum*. Las determinaciones futuras vía internet serán posibles.

En el ámbito alimentario, son importantes las metodologías que hacen uso de la “absorbancia”, tanto en la región de luz visible como en la de ultravioleta, al ser métodos que permiten analizar un número grande de muestras; especialmente cuando se hace uso de equipos tales como, los lectores de absorbancia en micropozos. Estos equipos existen en algunos laboratorios nacionales y son poco utilizados por los investigadores de alimentos a pesar de existir numerosas metodologías de aplicación a componentes alimentarios y kits de detección microbiológica y toxicológica que requieren de este equipo.

Por otro lado, las técnicas que hacen uso de Biología y Bioquímica Molecular son usadas cada vez más en el Perú, sobre todo en el área clínica,

observando sin embargo que su aplicación en la investigación de alimentos es cada día más necesaria. Una aplicación importante para verificar la inocuidad, es la identificación final de microorganismos procedentes de alimentos; tanto, microbios patógenos como microbios benéficos.

En los próximos capítulos de éste libro, se revisará información actualizada, concentrada en dos áreas: la espectrofotometría UV-VIS y fluorescencia, usando lector de Micropozos; y el área de técnicas basadas en biología y bioquímica molecular, aplicadas a la identificación de microorganismos de ocurrencia alimentaria. Con la finalidad de poner estas técnicas en un adecuado contexto, dentro entorno global mundial, de las técnicas modernas de investigación del área de alimentos, se revisa muy brevemente en el capítulo I, técnicas modernas de investigación diferentes a las del tópico de este libro y que vienen siendo usadas, debido a la dimensión compleja a manejar en la investigación de alimentos.

1.1 Marco Actual de la Investigación en el Área de Alimentos. Dimensión compleja de los alimentos.

Los alimentos son vistos con mayor frecuencia como una fuente de vida y no sólo como una fuente de nutrientes. Los seres humanos de hace 18 000 años dependían de la caza y la recolección (Tames, 1994). Ellos evolucionaron consumiendo grandes cantidades de frutos silvestres, moluscos, caracoles, insectos, hongos, raíces y semillas. Para estas antiguas poblaciones el ejercicio físico era frecuente, ya que para cazar animales y recolectar vegetales tenían que desplazarse caminando en pequeños grupos por grandes extensiones de terreno. Después del 3000 AC, con el desarrollo de la agricultura y la domesticación de animales, predominaron en los grupos humanos las formas de vida sedentarias. Las dietas empezaron a ser menos variadas pero más abundantes y el no tener que movilizarse de un lugar a otro, permitió al ser humano, organizarse mejor y aprovechar sus excedentes de tiempo en el desarrollo de las diferentes

manifestaciones culturales e intelectuales, ocasionando la evolución en su estilo de vida, donde siempre la reducción del esfuerzo y tiempo para realizar una actividad productiva dada fue considerada como un indicador de éxito. De esta manera los procesos productivos de la industria de los alimentos se fueron especializando en la producción masiva de ciertos alimentos preferidos por aportar nutrientes eficientes en mitigar la sensación de hambre. Años más tarde con los primeros descubrimientos de la ciencia de la nutrición se identificaron que ciertos componentes de los alimentos eran necesarios para evitar los “*síndromes de carencia*” o enfermedades que aparecían por la ausencia de algún nutriente en la dieta. Para la nutrición clásica, son considerados nutrientes “macro” o requeridos en cantidades importantes los siguientes componentes de los alimentos: carbohidratos, grasas, proteínas, y agua; y nutrientes “micro” cuyos síndromes de carencia aparecen frente a la ausencia de cantidades mucho más pequeñas: las vitaminas y los minerales. Para investigar sobre la calidad de los alimentos bajo esta óptica nutricional clásica, sólo se requiere examinar sus componentes en términos cuantitativos, que nos permitan determinar su adecuación a un nivel establecido de ingesta recomendable. También es importante cuantificarlos para evitar el consumo exagerado, cuando se generan efectos tóxicos debido a ello.

En el primer caso, los resultados cuantitativos de estas investigaciones en alimentos, son organizados en variadas tablas de composición de alimentos, las cuales permiten el acceso vía versiones impresas o por links de internet a los usuarios consumidores, nutricionistas, entidades reguladores y de control (Fogg-Johnson y Kaput, 2007). Tablas de Composición de alimentos locales, como las de:

<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Tabla%20de%20Alimentos.pdf>, entre las fuentes internacionales, son consideradas entre las más completas las siguientes: “*Food Composition Database*” de “United States Department of agricultura” (USDA)

<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>,

“European food composition databases” en el link:
http://www.eurofir.net/eurofir_knowledge/european_databases, Asimismo,
son de mucha utilidad los esfuerzos de “International Life Science Institute”
(ILSI) quien publica la “Crop composition database” en el link:
http://www.cropcomposition.org/cgi-perl/search_ora.cgi y los del
“International Network of Food Data Systems” en el link:
http://www.fao.org/infoods/directory_en.stm.

En el segundo caso, para que un determinado componente de los alimentos genere un efecto tóxico; éste, debe presentarse en cantidades excedentes a los niveles máximos previamente establecidos por las agencias reguladoras. Para este grupo de compuestos existen importantes esfuerzos analíticos de organizaciones tales como *AOAC International* y otros, en el desarrollo de protocolos para las determinaciones de pesticidas, micotoxinas y antibióticos en alimentos.

Para establecer posibles efectos tóxicos (aunque también efectos farmacológicos o benéficos) que ameriten mayor investigación, se examinan las evidencias epidemiológicas (llamadas así porque se encuentran mediante la búsqueda, evaluación y análisis de investigaciones ya existentes), que asocian la aparición de ciertas enfermedades con el consumo excesivo de ciertos nutrientes; sea el caso por ejemplo, de que la ingesta en la dieta de un componente “X”, en una determinada zona geográfica sea menor en concentración con la correspondiente ingesta del nutriente en las zonas endémicas (zona con alta incidencia de la enfermedad); esto conduciría a la necesidad de evaluar la inocuidad del componente “X”. También son examinados los hechos contradictorios a estas evidencias epidemiológicas llamados paradojas. Una paradoja frecuentemente mencionada, es el caso de la dieta mediterránea, cuya población es muy saludable a pesar de ingerir cantidades de grasa saturada similares a las de otras zonas geográficas donde son endémicas las enfermedades cardiovasculares. Estos hechos paradójicos, iniciaron el desarrollo de los conceptos modernos de la nutrición del siglo XXI donde

se examinan los componentes “bioactivos” de los alimentos, aquellos, que son ingredientes con funciones específicas a nivel genómico (ADN), bioquímico, fisiológico o psicológico necesarias para el mantenimiento del equilibrio o bienestar de una persona saludable. Estos componentes no son los nutrientes clásicamente conocidos como “macronutrientes” o “micronutrientes”, capaces de causar enfermedades de carencia, cuando no son consumidos en la dieta: ejemplo el escorbuto o capaces de generar cuadros tóxicos agudos cuando consumidos en exceso. Un alimento funcional (por concepto) contiene estos ingredientes bioactivos en su composición, en cantidades suficientes para generar “un efecto”. La nutrición clásica de los siglos XIX y XX no había prestado atención al estudio de mecanismos funcionales en los alimentos, pero con el desarrollo de nuevas herramientas de investigación, es capaz al momento actual, de centrar mucho de su esfuerzo en el entendimiento de las diferentes rutas bioquímicas y metabólicas a nivel enzimático y molecular y en la determinación y demostración en ellas del efecto beneficioso atribuidos al consumo de estos ingredientes (Roberfroid, 2002).

Las técnicas moleculares están siendo empleadas para investigación en Nutrigenómica (Ciencia que estudia cómo afecta la dieta a la expresión de los genes y al desarrollo de enfermedades asociadas a ello). Existe mucha expectativa por los efectos prometedores de la Nutrigenómica en el bienestar de los consumidores; en una visión futurista, se personalizaría la ingesta de nutrientes de acuerdo con las necesidades establecidas para cada individuo en función a su propio mapa genético. El reto de la nutrigenómica es el de vincular el conocimiento (establecido gracias al esfuerzo de las tablas de composición de alimentos) de los componentes de cada alimento con la interacción que estaría ocurriendo entre ellos y genes específicos que codificarían la información necesaria para el mantenimiento del buen estado de salud o en su defecto, genes con información para el desarrollo de una determinada enfermedad que no interesarían que se exprese (Fogg-Johnson y Kaput, 2007). Aquí son importantes las diferentes técnicas moleculares de

amplificación de material genético y diferentes técnicas instrumentales para el secuenciamiento del ADN.

Anónimo (2010) Reporta que el desarrollo de *ensayos nutrigenómicos* comerciales se encuentra en continuo crecimiento a una tasa de 20% anual constituyendo un mercado estimado en 730 millones. Los kits de este tipo son diseñados para detectar polimorfismo genético asociado al metabolismo de componentes alimentarios; por lo general las compañías que los comercializan ofrecen el kit y su interpretación y con los datos obtenidos se ofrecen evaluaciones de susceptibilidades a ciertas enfermedades con la finalidad de formular recomendaciones en las dietas. Surge la necesidad de regular los kits nutrigenómicos comercializados y de capacitar mejor a los profesionales de la salud en su uso (Castle y Ries, 2007).

Según las ciencias médicas, el estilo de vida es tan importante como la dieta para el buen estado de salud del individuo, debido a que las situaciones de estrés y ansiedad generados en los tiempos actuales, podrían afectar una serie de equilibrios hormonales necesarios para un adecuado metabolismo de los nutrientes. Tal es así que aparecen reportes de investigaciones asociando a los consumidores con la búsqueda de alimentos que les brinden placer, más aún, si son de fácil preparación dentro del hogar (Sloan, 2009). Esta dimensión a investigar en alimentos, requiere de adecuadas técnicas analíticas que evalúan color, aroma y textura donde la textura es asimismo importante por razones de ingeniería del proceso durante la elaboración del alimento. En general los consumidores de los diferentes grupos generacionales están dispuestos a buscar nuevos sabores y sensaciones gratificantes provenientes de los alimentos, pero al mismo tiempo están cada vez más conscientes de que deben prestar atención a los ingredientes, aumentando el número de personas que leen las etiquetas de

los alimentos procesados (Sloan, 2010) en busca de componentes que consideren saludables.

El crecimiento en los niveles de producción de la industria de los alimentos requiere de metodologías para la determinación de diferentes componentes y elementos biológicos en forma rápida y en tiempo real para evitar la adulteración y defender la salud de los consumidores. Debido a ello, se tornan cada vez más complejos los sistemas de control de almacenamiento y distribución de las mercancías alimenticias y se hace necesario que los resultados de las determinaciones analíticas de calidad sean ingresadas de manera automática a los sistemas de control del proceso productivo, facilitando la trazabilidad para la inmediata toma de decisiones cuando sean detectadas anomalías que pongan en riesgo la vida del consumidor y el valor comercial del producto. La automatización del muestreo y del análisis es también una tendencia, para lo cual son ofrecidos “software” (programas de cómputo) especializados usados como herramientas de investigación en esta área. Los datos analíticos son enviados por medio de una interface a un ordenador donde se realizan las evaluaciones obteniéndose la información necesaria para la toma de decisiones. El uso de sistemas de radiofrecuencia (sensores inalámbricos) son utilizados, para el monitoreo de la temperatura, actividad crucial en el control de calidad de ingredientes que requieren de una cadena de frío; en estos casos la transmisión de datos puede darse de manera inalámbrica y en tiempo real. En las grandes fábricas de alimentos, donde algunos ingredientes podrían ser importados, se debe mantener transparencia con respecto a los proveedores manteniendo un contacto cercano con ellos; evaluando y validando constantemente sus productos de acuerdo a la información proporcionada y asegurando que los insumos cumplan con estándares mínimos de inocuidad.

Las empresas deben contar siempre con un plan ya validado y establecido frente a una crisis generada por riesgos en la inocuidad, el cual debería incluir un equipo que colecte toda la información disponible; la gerencia que por su parte elabore un plan de acción y la ejecución del mismo que estaría a cargo de sub equipos de trabajo encargados también de la comunicación de las acciones correctivas dentro de la compañía y a los consumidores. Después de la ejecución del plan de crisis este debe ser revisado para su mejora en la implementación de planes futuros similares (Jhaveri, 2010).

1.2 Métodos Analíticos usados en Investigación en Alimentos.

A continuación se definen brevemente algunos métodos analíticos de uso frecuente, cuya revisión no está contemplada en los capítulos posteriores:

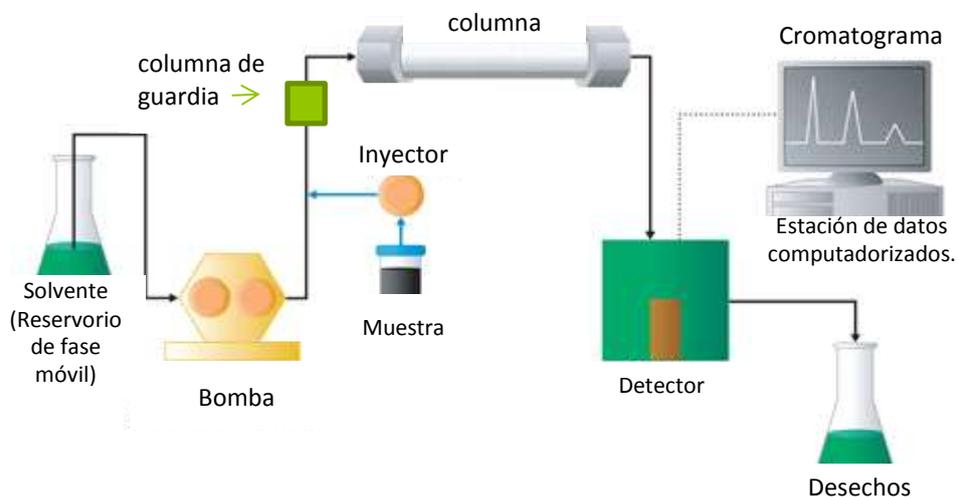
1.2.1. Cromatografía líquida (CL).

Es una técnica que permite la distribución de la molécula de interés o “analito” entre dos fases, una móvil y una estacionaria. Generalmente los sistemas son diseñados de manera que exista una afinidad diferencial por la fase estacionaria, entre el analito y los componentes de la muestra que lo acompañan (componentes de *la matriz*) (Barquero-Qiroz, 2004). Un sistema de cromatografía líquida (CL), es aquel en el que tanto la fase estacionaria como la móvil son líquidas; una técnica instrumental con esta característica, es la conocida como HPLC (Cromatografía líquida de alta performance).

Figura 1. Principales partes de un sistema de Cromatografía Líquida de tipo HPLC.

Adaptado de:

http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es_ES&cid=10049055



En la Figura 1, se presenta el esquema de un HPLC, donde se puede observar entre sus principales partes, un sistema de inyección, que permite ingresar al sistema volúmenes pequeños de muestra. Reuhs y Rounds (2010) indican que usualmente se inyectan entre los 10 –100 μl de muestra, los que son bombeados, junto con la fase móvil, a una alta presión, por las cañerías, pasando por una columna de guardia, para una purificación, previa al ingreso por la columna analítica, con la finalidad de protegerla. La columna de un HPLC, es el lugar donde ocurre la separación del analito, entre dos fases líquidas inmiscibles, la fase líquida estacionaria es retenida en el sistema ya sea por formar una película superficial líquida adherida a una partícula sólida o por quedar embebida en los canales de una partícula porosa. Los diámetros de las partículas se encuentran entre los 3 y 10 μm . Pueden recubrir las partículas grupos silanoles, sobre los que se pueden estar presentes otros compuestos que modifican la polaridad de la fase estacionaria (Barquero-Qiroz, 2004). Dependiendo de la naturaleza química del líquido fijado dentro de la columna analítica, se podrán separar diferentes tipos de analitos tales como azúcares, aminoácidos, vitaminas, alcaloides, etc.

Los detectores en un sistema de cromatografía líquida pueden ser de diferentes tipos, según Barquero-Quirós, (2004), los más frecuentes comercialmente son los detectores de absorbancia, fluorescencia, electroquímico, índice de refracción, conductividad, FT-IR, dispersión de luz y espectrometría de masas (MS). Sobre la cromatografía líquida acoplada a este particular detector, espectrómetro de masas, MS, se discute más adelante.

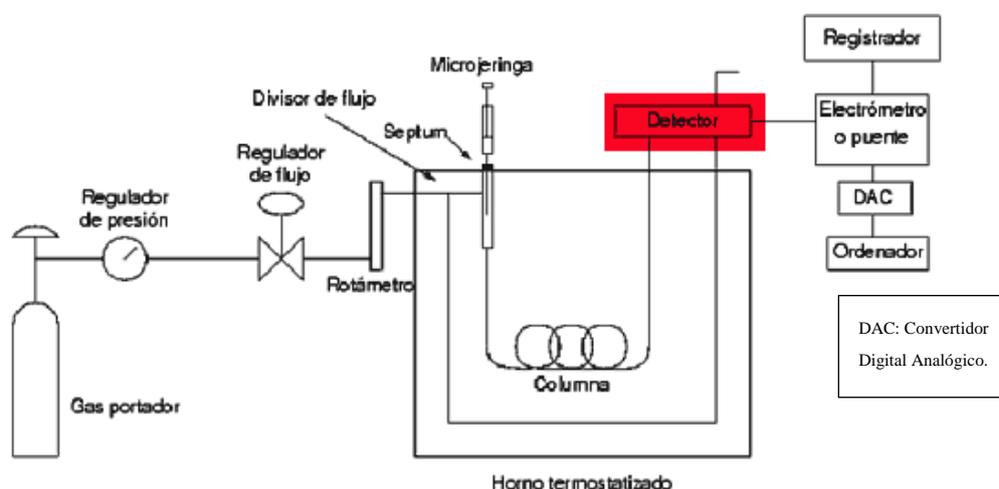
1.2.3. Cromatografía gaseosa (GC).

Es un sistema de separación donde la fase móvil es un gas, generalmente una sustancia inerte como el nitrógeno, helio u otros y la fase estacionaria un líquido o sólido. Lo más frecuente, como fase estacionaria es una fase líquida inmovilizada sobre un soporte sólido inerte. La muestra debe estar en forma gaseosa, ya sea de manera natural, por calentamiento o por derivatización; el analito de la muestra se distribuirá entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria.

La muestra en un sistema de GC se inyecta con micro jeringa, donde es arrastrada por el gas portador hacia la columna analítica que en este caso mide varios metros (Figura 3 D). El esquema de un sistema de cromatografía de gases se presenta en la Figura 2. Se observa que la columna analítica se encuentra en un horno, entre los 150 y 325°C; a esta alta temperatura, ocurre la separación de los analitos de la muestra, los que en estas condiciones se encuentran en estado gaseoso. Durante la separación la temperatura es controlada (Barquero-Qiroz, 2006). Conforme los analitos salen de la columna analítica ya separados, pasan por los detectores. Los detectores comunes en estos sistemas son los de ionización de llama (FID), nitrógeno fósforo (NPD), fotométrico de llama (FPD), conductividad térmica (TCD), captura electrónica (ECD),

fotoionización (PID), conductividad electrotérmica (ELCD) y espectrofotometría de masas (MS). Las señales de los detectores se registran en un cromatograma de donde se pueden identificar y cuantificar los diferentes componentes del analito a través de la intensidad de estas señales y de los tiempos en las que éstas aparecieron, tomando como punto de referencia, el momento en el que se inyectó la muestra al sistema. Entre las aplicaciones de este tipo de cromatografía a alimentos se tienen las determinaciones de ácidos grasos, triglicéridos, colesterol, alcoholes, bifenilos policlorados, vitaminas, pesticidas y otros (Qian, *et al.*, 2010).

Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de gases.



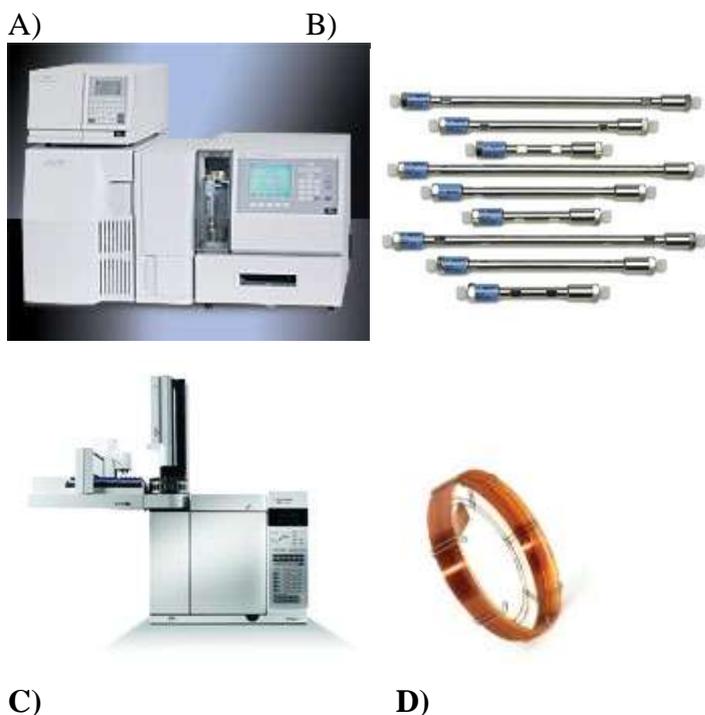
Adoptado de:

http://www.infra.com.mx/servicio_atencion/conozcamas/cromatografia/cromatografia.html

Los sistemas de GC usando columna de capilares constituyen uno de los métodos aprobados por AOAC y AOC (American Oil Chemists) para la detección de ácido graso trans en grasas. Este método reporta como contenido de ácido graso trans a la suma de todos los ácidos grasos con dobles enlaces “trans” no conjugados. En este método la grasa de la muestra previamente extraída es hidrolizada y sus ácidos grasos convertidos a ácidos grasos volátiles metil-esteres, los que son separados en la columna

fluyendo a diferentes tiempos. Uno de los principales problemas de esta técnica es la sobre posición de picos (Mermelstein, 2009).

Figura 3. Equipo de A) HPLC; B) Columnas HPLC; C) GC; D) Columnas GC



Tomado de: a) www.Waters.com; b) , c) y d) www.agilent.com

1.2.4 Cromatografía líquida (CL) o gaseosa (CG) acoplada a un Espectrómetro de Masas (MS)

Mediante esta técnica, las sustancias, previamente separadas por la cromatografía, son expuestas a un campo eléctrico ionizante, dentro de un detector de espectrómetro de masas. Para ello el analito de la muestra pasa por una parte del equipo (Cámara de ionización) que genera campos eléctricos capaces de fragmentar sus moléculas en iones. Este sistema funciona generando colisión, entre los electrones generados por el campo eléctrico del equipo, y los componentes de la muestra, fragmentándola en iones de diferentes tamaños, los que son atrapados para luego ser separados

en función a la tasa Masa/carga (M/z) por un detector de masas de tipo *cuadrupolo*. Los datos (M/z) son utilizados en la identificación de los diferentes componentes. Los detectores MS son todavía bastante caros.

La cromatografía acoplada a MS es ahora un método estándar para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos, permite la detección de cientos de pesticidas diferentes por muestra. Entre las desventajas se tienen que requiere de protocolos de limpieza y purificación de muestra complicados, los que dependen del tipo y origen de alimento que se analiza. Se han reportado que los pesticidas modernos requieren para ser detectados de sistemas acoplados a detectores de Masas en *Tandem* como los de LC-MS-MS o GC-MS-MS pues no se pueden lograr separaciones visibles en los sistemas GC-MS (Leake, 2007a). Este último es un sistema en el que la muestra atraviesa sólo una vez por el proceso descrito arriba que ocurre dentro de un MS. En los sistemas en Tandem, los iones fragmentados y separados en función a su masa son introducidos una segunda vez a un segundo detector MS para una fragmentación sucesiva; esto último es necesario cuando en la primera fragmentación se observa una superposición para un determinado valor de masa de fragmentos provenientes de dos compuestos diferentes. De esta manera, en la fragmentación introducidos una segunda vez a un segundo detector MS para una fragmentación sucesiva (segunda o tercera si la hubiera), estos compuestos son al fin separados y la identificación es más exacta. Con espectrómetro de masas (MS) se puede dilucidar la estructura de los componentes en alimentos al observar su comportamiento durante la fragmentación (Leake, 2007b). Finalmente, la cromatografía líquida (CL) acoplada a espectrómetro de masas (MS) es un método recomendado para determinar e identificar fotoquímicos en mezclas complejas como las encontradas en las matrices alimentarias.

1.2.5. Ionización de electrospray (ESI-MS).

Es una técnica que usa la espectrometría de masas en la que los iones son producidos por técnicas de electrospray. Por medio de la cual el analito en solución líquida, es dispersado en un aerosol muy fino. Una muestra de este aerosol puede pasar por un capilar hacia un dispositivo bajo vacío donde el solvente se evapora y separa de las gotas cargadas, las que empiezan a deformarse hasta que se produce una fisión Coulombica en la que pierde una parte pequeña de su masa y bastante carga. Esta técnica es preferida para formar iones a partir de macromoléculas pues reduce la tendencia que tienen estas a la fragmentación. Los iones formados son observados por espectrometría de masas.

1.2.6. El sistema de Cromatografía líquida de “Ultra Performance”.

Llamado también de alto desempeño (UPLC) de Waters®, es un cromatógrafo líquido con presión, el que se diferencia del HPLC anteriormente descrito, en que usa columnas donde el líquido estacionario es fijado en partículas muy pequeñas de alrededor 1.7 μm lo que permite el uso de presiones más altas a las de un HPLC, permitiendo una mayor resolución en las separaciones. Esto acoplado a un detector TQ (“tándem quadrupole” MS selectivity), permite el análisis por MS/MS (detector con dos espectrómetro de masas acoplados) de las micotoxinas en un gran número de muestras (Swientek, 2008) con una muy buena selectividad que permite la separación de 5 toxinas en tan sólo 3.2 minutos (Ventura, *et al.*, 2006).

1.2.7. Espectrometría de masas por plasma inductivamente acoplado (ICPMS).

Es una técnica que se aplica para investigar la presencia de contaminantes metálicos en los alimentos tales como arsénico, cadmio, plomo y mercurio, pueden detectarse muchos más elementos. Por medio de esta técnica la muestra, después de ser digerida por medio de ácidos, es nebulizada hasta aerosol y transportada hasta un plasma de argón donde alcanza altas temperaturas transformándose en iones los que son conducidos al espectrómetro de masas donde son identificados. Se reporta que una ventaja de esta técnica con respecto a la espectroscopia de absorción atómica clásica es que analiza más de 70 elementos diferentes al mismo tiempo. En el caso del Mercurio se reporta que este método puede llegar a determinar concentraciones excedentes al límite de detección de 0.01 µg/L (Jian, *et al.*, 2000).

1.2.8 Espectroscopia Infrarroja con transformación de Fourier (EITF ó FTIR)

Es una técnica que permite la obtención de un espectro típico de absorción del infrarrojo para una determinada sustancia, utilizando para ello el modelo de transformación de Fourier en el análisis de los datos obtenidos cuando la muestra es colocada entre un detector y un haz de luz del infrarrojo cuya distribución es alterada por un espejo movable. La muestra absorbe selectivamente la energía infrarroja produciéndose cambios en la intensidad de la luz que llega al detector. La intensidad de la luz utilizada está en función de la posición del espejo movable, por lo que se tienen diferentes espectros de absorción para cada posición, pero mediante la transformación de Fourier, se convierte toda esta información en un solo espectro típico de la muestra, el cual solo está en función de la longitud de

onda (usándose aquí el valor recíproco, o sea inverso expresado en cm^{-1} el cual es una unidad de energía en espectroscopia, valor proporcional a la frecuencia del fotón de luz).

Una aplicación importante es la determinación de ácidos grasos “trans” en una grasa, por comparación de los espectros con grasas libres de trans. Los trans absorben radiación infrarroja a longitudes de onda de 966 cm^{-1} . Se ha reportado un problema en estos tipos de mediciones cuando las concentraciones de trans son muy pequeñas y cuando hay interferencias ocasionadas por la presencia de interferencias causadas por la presencia de formas cis/trans y trans/trans conjugadas con picos a 985 y 945 cm^{-1} . A fin de evitar estas interferencias los métodos modernos usan los datos de la segunda derivada de la banda IR a 966 cm^{-1} que es más angosta (Mermelstein, 2009).

FTIR ha sido investigada por Yousef y Rodriguez-Saona en Ohio State University como una técnica para la identificación del serotipo y subtipos de Salmonella en muestras de alimentos presentes en números grandes (Mermelstein, 2008). El patrón de bandas de absorción producido por las bacterias previamente aislada y en números de al menos 10^4 a 10^5 células, producen un espectro que es único para el serotipo o subtipo, debido a las diferencias en composición observadas en los polisacáridos de sus cubiertas celulares; De Lamo-Castellvi, *et al.*, (2010) mejoran éste método para la identificación de Salmonella, combinando la técnica FTIR con la de separaciones inmunomagnéticas utilizando partículas Dynabeads® adicionadas al cultivo para aislar y seleccionar de manera específica a Salmonella.

FTIR es reportado por investigadores Alemanes como un método para dilucidar importantes diferencias estructurales entre los priones infectivos causantes de BSE (Encefalopatía bovina espongiforme) y los daños

que estos causan en la estructura de las neuronas (Beekes, *et al.*, 2007). Una importante aplicación en inocuidad de alimentos.

Este capítulo termina indicando que las técnicas discutidas aquí son presentadas con la finalidad de dar un marco de referencia que permita al lector tener una visión sobre las técnicas instrumentales más comunes utilizadas en la investigación en alimentos; no se pretende que esta lista de posibilidades sea inclusiva de la totalidad de las técnicas, pero ayudará a colocar en un contexto adecuado las metodologías, motivo de discusión en los capítulos posteriores del presente volumen, donde se presentarán algunas aplicaciones prácticas, en las cuales para algunos casos se podrían requerir de éstas metodologías en algún momento de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA DEL CAPITULO 1

- Alldrick AJ, van Egmond HP y Solfrizzo M. 2009. Commercial use of rapid mycotoxin test kits: significance and potential harmonisation issues. *World Mycotoxin Journal* 2(2):215-215-220.
- Anonimo. 2010. Research and Markets: The Nutrigenomic Testing Marketing Market Is Currently Estimated To Be Worth US\$730 Million and Growing By 20% Per Annum Says 2010 Study. United Kingdom, Coventry: Normans Media Ltd. p. n/a.
- AOAC RI. 1994. Test Kit Definitions and Modifications Guideline. In. http://www.aoac.org/testkits/Appendix_18_Definitions_&_Modification%20Guideline.pdf.
- Barquero-Qiroz M. 2004. Mecanismos y Aplicaciones de la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Barquero-Qiroz M. 2006. Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Beekes M, Lasch P y Naumann D. 2007. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Veterinary microbiology* 123(4):305-319.
- Castle D y Ries NM. 2007. Ethical, legal and social issues in nutrigenomics: the challenges of regulating service delivery and building health professional capacity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 622(1-2):138-143.
- Connolly L, Thompson CS, Haughey SA, Traynor IM, Tittlemeier S y Elliott CT. 2007. The development of a multi-nitroimidazole residue analysis assay by optical biosensor via a proof of concept project to develop and assess a prototype test kit. *Analytica Chimica Acta* 598(1):155-161.
- Creeke PI, Lee HA, Morgan MRA, Price KR, Rhodes MJC y Wilkinson AP. 1996. Immunochemical Approaches to Research on Natural Toxicants and Phytoprotectants in Food. Immunoassays for Residue Analysis. American Chemical Society. p. 202-218.
- Chiueh LC, Chen FR y Shih YC. 2001. Evaluation of Commercially Available Kits for Detection of Escherichia coli O157. *Journal of Food and Drug Analysis* 9(4):207-207-214.

- De Lamo-Castellvi S, Manning A y Rodriguez-Saona LE. 2010. Fourier-transform infrared spectroscopy combined with immunomagnetic separation as a tool to discriminate Salmonella serovars. *Analyst* 135(11):2987-2992.
- Ellis Richard L. 1996. Screening Tests in a Changing Environment. *Environmental Immunochemical Methods*. American Chemical Society. p. 227-239.
- Fogg-Johnson N y Kaput J. 2007. Moving forward with nutrigenomics. *Food Technology* 61(8):50.
- Jhaveri SN. 2010. Ensuring Food Safety in a Global Marketplace. *Food Technology* 64(5):38-43.
- Jian L, Goessler W y Irgolic KJ. 2000. Mercury determination with ICP-MS: signal suppression by acids. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 366(1):48-53.
- Leake LL. 2007a. Reaching New 'Peaks'"in Pesticide Analysis. *Food Technology* 10:74-76.
- Leake LL. 2007b. Reshaping Food Analysis. *Food Technology* 4:74-78.
- Mermelstein NH. 2008. Testing for Salmonella. *Food Technology* 62(10):87 - 90.
- Mermelstein NH. 2009. Analyzing for Trans Fat. *Food Technology* 63(3):71-73.
- Qian M, Peterson D y Reineccius G. 2010. Gas Chromatography. In: Nielsen, S., editor. *Food Analysis*. USA: Springer Science. p. 513 - 537.
- Reuhs B y Rounds A. 2010. High-Performance Liquid Chromatography. In: Nielsen, S. S., editor. *Food Analysis*. USA: Springer Science. p. 499 - 512.
- Roberfroid MB. 2002. Aliments fonctionnels: définitions concepts et stratégies. In: Roberfroid, M. B., editor. *Aliments fonctionnels* Paris: Lavoisier. p. 1-17.
- Schubert-Ullrich P, Rudolf J, Ansari P, Galler B, Fuhrer M, Molinelli A y Baumgartner S. 2009. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(1):69-69-81.

Sharma SK, Eblen BS, Bull RL, Burr DH y Whiting RC. 2005. Evaluation of Lateral-Flow Clostridium botulinum Neurotoxin Detection Kits for Food Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7):3935-3935-3941.

Sloan AE. 2009. The Plesuare Principle. *Food Technology* 7:18-27.

Sloan AE. 2010. Consumers Are Confused, Concerned About Food Safety. *Food Technology* 3:17.

Tames R. 1994. Food Feast Cooks and Kitchens. London: Watts.

CAPÍTULO II

CONCEPTOS BÁSICOS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y ALGUNAS TÉCNICAS BÁSICAS DE IDENTIFICACIÓN EN MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Se introducirán algunos conceptos básicos de biología y bioquímica molecular, para facilitar a los tecnólogos de alimentos, la comprensión de métodos de análisis sencillos aplicados a la identificación de microorganismos de ocurrencia en alimentos. Este capítulo tiene por finalidad, proporcionar información para facilitar la lectura de los capítulos posteriores en especial del capítulo 6 de este volumen, donde se introducirán algunas técnicas de análisis más elaboradas aplicadas a microbiología de alimentos.

2.1 Técnicas Aplicadas a la identificación de Microbios en Alimentos.

Frente a la necesidad de saber qué hacer frente a un brote de enfermedad debida a agentes patógenos, la primera acción a seguir consiste en hacer la correcta identificación del microbio en el alimento, seguido de ello se podrán tomar acciones correctivas para evitar el consumo del alimento involucrado y proporcionar un tratamiento clínico para las personas afectadas.

El primer paso para la identificación de una cepa microbiana, consiste en el uso de medios de cultivo selectivos, los que utilizando combinaciones de diferentes ingredientes, ponen en evidencia diferencias observadas en la expresión genética de los complejos enzimáticos del metabolismo y diferencias en los factores de crecimiento intrínseco y/o extrínseco para los diferentes grupos microbianos. Por ejemplo (Merck®, 2005) presenta en su catálogo de medios de cultivo una gran variedad de

combinaciones de ingredientes, diseñados para facilitar el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos, e inhibir a los microorganismos interferentes. Estos medios orientados a la identificación de un determinado género y especie microbianos se basan en el perfil de requerimientos promedio de la cepa, sin embargo algunas cepas podrían alejarse de este valor promedio. Asimismo, cambios muy sutiles en la concentración de algunos de estos factores de crecimiento afectarían la concentración en la que es requerido algún otro ingrediente nutritivo; similarmente, un exceso puede generar efectos inhibitorios. También, diferentes géneros bacterianos pueden presentar notables parecidos en sus requerimientos como los que son reportados entre Salmonella y Citrobacter (Bel et al, 2005) ocasionando algunas confuciones en sus identificaciones mediante el uso de medio de cultivo selectivo (debido a falsos positivos).

Estas son algunas de las razones por la que después de aislar una cepa en un medio selectivo se necesitan pruebas de confirmación ya que los resultados son considerados “presuntivos”. Tradicionalmente se recurren a una serie de pruebas bioquímicas (baterías), lo que aumenta el costo y el tiempo para tener datos con suficiente grado de seguridad referente a la forma microbiana involucrada.

Los medios de cultivo para estas pruebas que antes eran preparados por el microbiólogo a partir de sus ingredientes (pesando en una balanza cada uno de ellos), ahora son disponibles en polvos listos para hidratar o en formatos (Tipo “kits”) listos para usar, permitiendo la eliminación de algunas fuentes de variabilidad y la reducción del tiempo de los análisis. Varios de estos métodos rápidos basados en reacciones enzimáticas, inmunológicas o moleculares se pueden encontrar en: <http://www.rapidmicrobiology.com/index.php> o en las páginas web de algunas compañías especializadas tales como <http://www.biomerieux-diagnostics.com/>; <http://www.vicam.com/products/mycotoxin.html>;

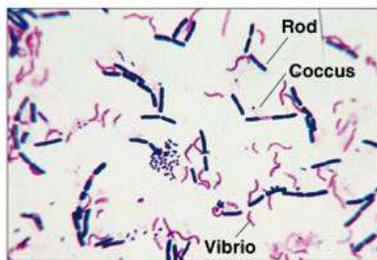
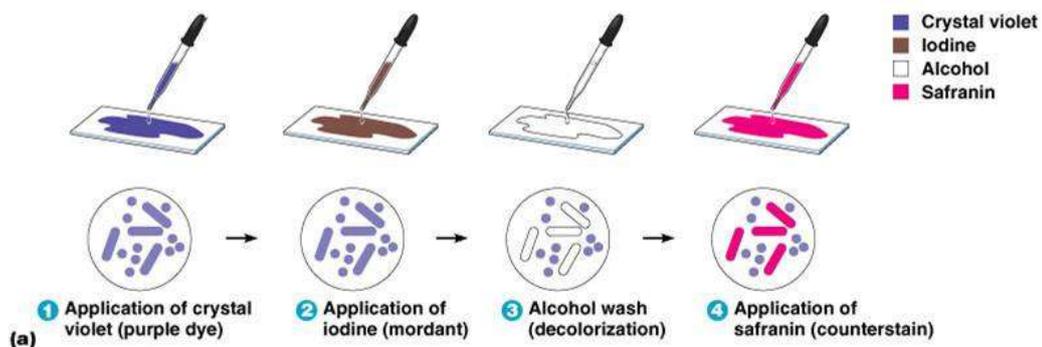
<http://www.bio-rad.com/evportal/evolutionPortal.portal> y otros; tal como lo resume (Mermelstein, 2009b).

El segundo paso después de las pruebas “presuntivas”, es el de las pruebas “confirmativas” donde existen asimismo diferentes niveles, como se menciona a continuación:

Pruebas morfológicas.

Relacionadas a la apariencia de la colonia en medios de cultivo de diagnóstico, como también a pruebas de observación de la célula microbiana bajo un microscopio de luz, donde se observan formas y tamaños. Asimismo datos de composición de la pared celular, se pueden obtener de observaciones bajo tinción, tal es el caso de la coloración Gram (Figura 4 y 5).

Figura 4. Coloración Gram de bacterias y observaciones morfológicas.



(b)

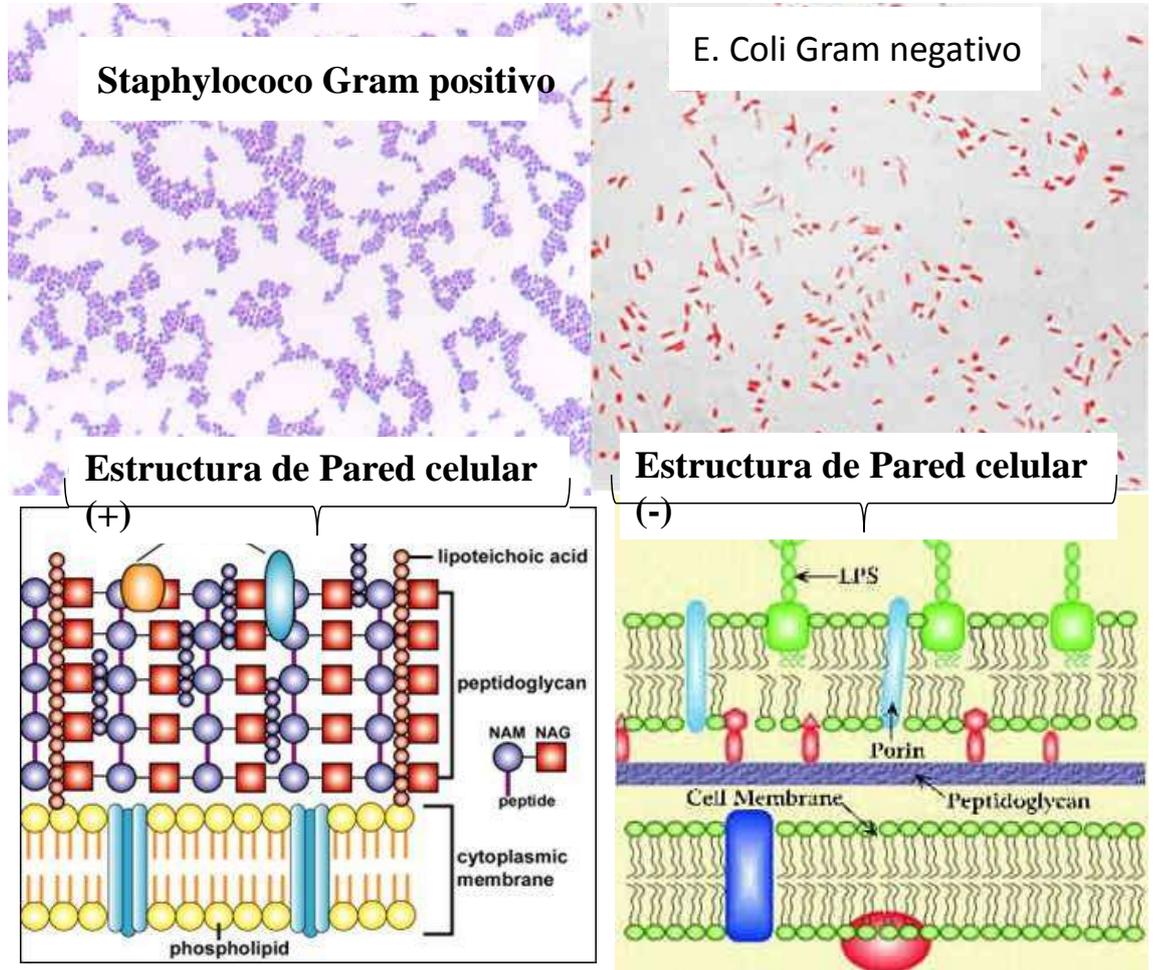
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

A: Etapas a seguir durante la Coloración Gram

B: Diferentes morfologías observadas durante la coloración Gram.

Fuente: ([Http://Faculty.Irsc.Edu/Faculty/Tfischer/Images/Gramstain.Jpg](http://Faculty.Irsc.Edu/Faculty/Tfischer/Images/Gramstain.Jpg), 2004)

Figura 5. Diferencias entre bacterias Gram positivos y Gram negativos.



Fuente:

([Http://Homepage.Ntlworld.Com/Diamonddove/04a_Gram/Gram.H11.Jpg](http://Homepage.Ntlworld.Com/Diamonddove/04a_Gram/Gram.H11.Jpg), 2001;

[Http://Faculty.Irsc.Edu/Faculty/Tfischer/Images/Gramstain.Jpg](http://Faculty.Irsc.Edu/Faculty/Tfischer/Images/Gramstain.Jpg), 2004).

Respuestas bioquímicas directas.

Entre ellas se cuentan la reacción de la catalasa, reacción de la oxidasa, utilización y ruptura de carbohidratos específicos entre otros. (Bell, *et al.*, 2005). Ejemplo: El reactivo de “Nessler” o yodo mercuriato potásico [$K_2(Hgl_4)$], reacciona con el amoniaco (el cual podría provenir de

la degradación de algún aminoácido) y produce una coloración rojo parduzca o rojo amarillenta. Ver Figura 6. Algunas metodologías de interés se pueden encontrar en:

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

Respuestas bioquímicas ante habilidades metabólicas complejas.

Se pueden aplicar tanto a gram positivos como gram negativos. Entre ellas (Ver Figura 6) se incluyen las pruebas de IMViC (Indol, Metilo, Voges-Proskauer, Citrato), donde I: Producción de indol a partir de triptófano; M: producción de ácido a partir del metabolismo de la glucosa a pH<4.4 (Prueba rojo de metilo); V-P: producción de acetil metilo carbinol (Prueba Voges-Proskauer VP); C: uso de citrato, como fuente única de carbón. Asimismo, se tienen las pruebas de: hidrolisis de *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) por la β -galactosidasa; decarboxilación de aminoácidos tales como la lisina y la ornitina; producción de sulfuro de hidrógeno; producción de enzima ureasa, licuefacción de la gelatina y reducción del nitrato al nitrito o nitrógeno. De todas las enumeradas anteriormente, IMViC es particularmente importante para el grupo de las Enterobacteriaceae ya que permite distinguir el grupo “coli” del “aerógenos”; una prueba que se adiciona al IMViC llamada “test Eijkman”; permite la identificación de *Escherichiacoli* (Con esta adición la prueba se llama IMVEC); ésta prueba adicional, incluye un medio para la evaluación de la producción de ácido y gas por fermentación de la lactosa a 44°C. (Bell, *et al.*, 2005).

Figura 6. Coloraciones en pruebas bioquímicas: Pruebas diseñadas para diferenciar homofermentativos de heterofermentativos:



A la izquierda; Primer tubo: resultado positivo de fermentación de glucosa indicado por viraje del púrpura de bromocresol a color amarillo; segundo tubo, presencia de gas indica fermentación y utilización de glucosa y/o gluconato; (Parte derecha de la foto) en placa: una coloración rosácea amarillenta, después de adición de Reactivo Nessler indica: utilización de Arginina. Fuente: Elaboración propia.

Diferencias respecto a factores extrínsecos.

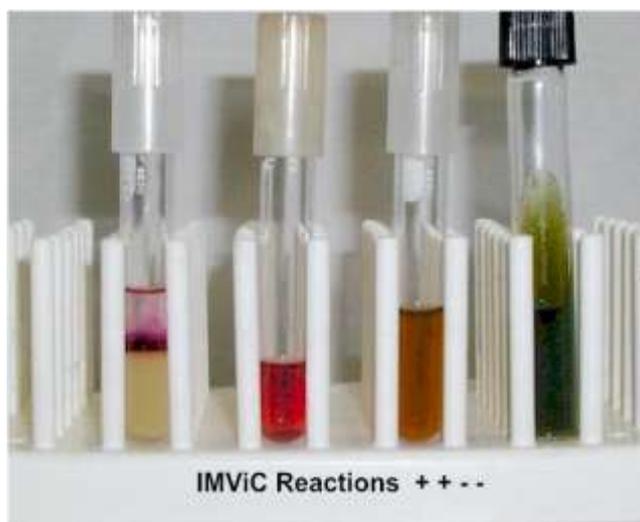
Como lo revisa Bell, et al., (2005) para la identificación de *Campilobacter*, se recomienda evaluar el crecimiento en atmósferas aeróbicas o micro aeróbicas; para identificar *Streptococcus* spp., evaluar la resistencia al calor (60°C por 30 minutos); para caracterizar *Staphylococcus*, la producción de enzima coagulasa; para *E.coli*, la fermentación de lactosa a elevadas temperaturas de incubación (Test Eijkman para *E.coli*); y, para diferenciar *Salmonella* spp de *E.coli* O157, la identificación de antígenos serológicos superficiales. Para diferenciar presuntivamente *Listeria monocytogenes* de *S.agalactae*. Phillips, et al., (1980) recomienda examinar el aumento en la producción de hemolisinas, en presencia de otros microorganismos como es el caso del test CAMP (Christie AtkinsMunch-Petersen). Esta prueba de CAMP permite la

identificación del Grupo B β -estreptococo, CAMP es un factor que cuando está presente aumenta el área de hemólisis debido a β -hemolysin.

Pruebas moleculares de identificación.

Consideradas como herramientas alternativas a las consideradas “metodologías de referencia” (publicadas por los organismos oficiales de análisis, tales como AOAC y otros) y generalmente utilizadas cuando hay que resolver litigios. Las técnicas moleculares son las basadas en el estudio del ADN del microorganismo.

Figura 7. Las pruebas de IMViC (Indol, Metilo, Voges-Proskauer, Citrato)



Fuente: ([Http://Nhscience.Lonestar.Edu/Biol/Wellmeyer/Media/Imvic1.Jpg](http://Nhscience.Lonestar.Edu/Biol/Wellmeyer/Media/Imvic1.Jpg), 2009)

Los resultados de estas pruebas se han venido usando mucho en los últimos años principalmente en el área de la investigación clínica como de alimentos, generando un aumento en el número de compañías productoras de los insumos y maquinarias necesarios, logrando reducir los costos; más aún, la mayor parte de las sociedades han tomado conciencia sobre la importancia de la inocuidad de los alimentos en la seguridad alimentaria de un país, por lo que el uso de pruebas moleculares de identificación se

encuentra cada vez más difundido a nivel de las agencias reguladoras en el mundo y también con un uso cada vez más frecuente en las empresas productoras de alimentos.

Actualmente se disponen de sistemas automatizados para la detección que hacen uso de la tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la identificación de patógenos, permitiendo la detección de un gran número de muestras en un tiempo corto.

2.2 Algunos Conceptos de Biología y Bioquímica Molecular

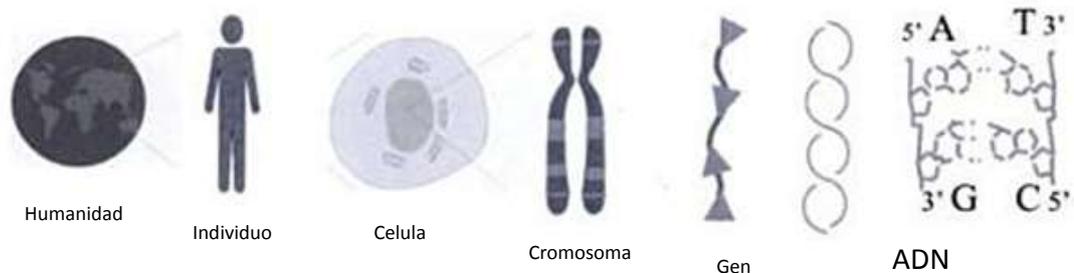
2.2.1 La Bioquímica y Biología molecular.

La bioquímica es el estudio de los componentes químicos de los organismos vivos, dentro de los cuales uno de los más importantes son las proteínas, componente mayoritario de las enzimas. Las enzimas catalizan las diferentes reacciones que ocurren en la célula (Bioquímica del metabolismo). *La biología molecular*, estudia los diferentes procesos desarrollados en los seres vivos a nivel molecular; tales como reacciones bioquímicas al nivel molecular, donde se aplican diferentes disciplinas para buscar el entendimiento de los diferentes sistemas que mantienen funcionando la célula.

La célula unidad visible de los seres vivos al microscopio, está conformada por el citoplasma y el núcleo (el cual se tiñe más intensamente). En el núcleo la información hereditaria está en los cromosomas, en los que se encuentra el ADN. Ver Figura 7. El citoplasma está conformado por el citosol compuesto por el cito esqueleto (elementos insolubles) y moléculas solubles con diferentes funciones, algunas muy importantes por participar en la señalización y comunicación interna. En el citoplasma también se encuentran los ribosomas (donde se sintetizan las proteínas (Ver Figura 8) y lípidos) en el retículo endoplasmático; el aparato

de Golgi importante para la secreción de productos celulares; mitocondrias para la producción de energía, y peroxisomas y lisosomas (Turnpenny y Ellard, 2009).

Figura 8. Tamaño y ubicación de los cromosomas. Tomado de:(Oliva, *et al.*, 2004)



La biología molecular examina las interacciones y los sistemas reguladores existentes entre ADN (ácido desoxirribonucleico), RNA y síntesis de proteínas (ácido ribonucleico) Ver Figura 8. Al ser muchos de estos estudios de tipo cuantitativo, en los últimos años, las ciencias computacionales y la bioinformática han sido muy importantes por ser utilizadas como una interface que permite obtener estos resultados cuantitativos. Durante muchos años el dogma central de la biología molecular ha sido el estudio de replicación, transcripción, y traducción del material genético a través del RNA.

2.2.2 El ADN o DNA (en Inglés).

Es la molécula que contiene toda la información que la célula necesita para su normal funcionamiento durante el desarrollo, reproducción y funcionamiento. Ver Figura 9. Químicamente es un polímero de nucleótidos (polinucleótidos), siendo cada nucleótido formado por un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada (adenina: A, timina: T, citosina: C o guanina: G) y un grupo de enganche el fosfato. La secuencia de unión de los nucleótidos es típica del gen.

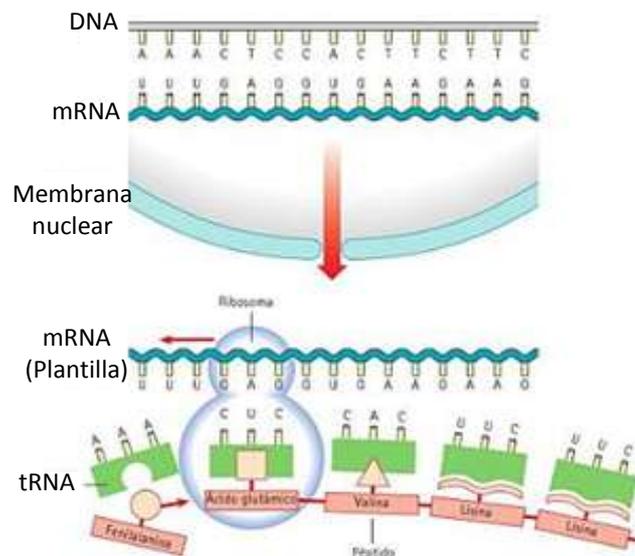
2.2.3 Algunas Técnicas básicas de biología Molecular.

a) **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Conocida en inglés como “Polymerase Chain Reaccion” Permite reproducir “in vitro” de uno o más fragmentos específicos de la molécula en doble cadena del ADN (En Figura 9 y 10 se aprecia la doble cadena de ADN en forma de α hélice), para ello una de las cadenas iniciales se usa como molde. A la región de la cadena inicial usada como molde se le llama “secuencia *diana* del ADN” o en el inglés *target*. La reacción PCR permite copiar una determinada secuencia *diana* del ADN millones de veces; para poder hacerlo, se requiere someter al ADN a una alta temperatura (generalmente entre 90 y 92°C); a esta temperatura, la molécula se desnaturaliza y la doble α hélice se abre, quedando en forma de mono cadena, exponiendo sus nucleótidos. Es entonces, cuando entran en acción unos oligonucleótidos que fueron adicionados al inicio al tubo de la reacción; éstos, son los llamados *cebadores* o en el inglés “*primers*”, ellos se caracterizan por presentar sus oligonucleótidos ordenados en una secuencia que es precisamente la complementaria, a las regiones que delimitan la región *diana*, es decir se pueden unir y formar una doble cadena (“hibridar”) en las zonas que flanquean el ADN *diana*. Esta reacción ocurre entre los 35° a 65°C (Torres-Lamas y Moreno-Vásquez, 2001).

La secuencia de oligonucleótidos en los cebadores tiene que ser específica y complementaria a esas zona de la región *diana* ya que se conoce que el nucleótido A solo se une con T y el oligonucleótido G sólo con C en la molécula de ADN. Después de delimitarse la región a amplificar por acción de los *cebadores* de la manera indicada, sigue la reacción de amplificación propiamente dicha, para que esto ocurra se necesita la acción catalítica que una enzima: la polimerasa

del ADN, quien cataliza la elongación del cebador por introducción de un dNTP (deoxidoribonucleótido) complementario.

Figura 9. Interacción entre ADN y Síntesis proteica.



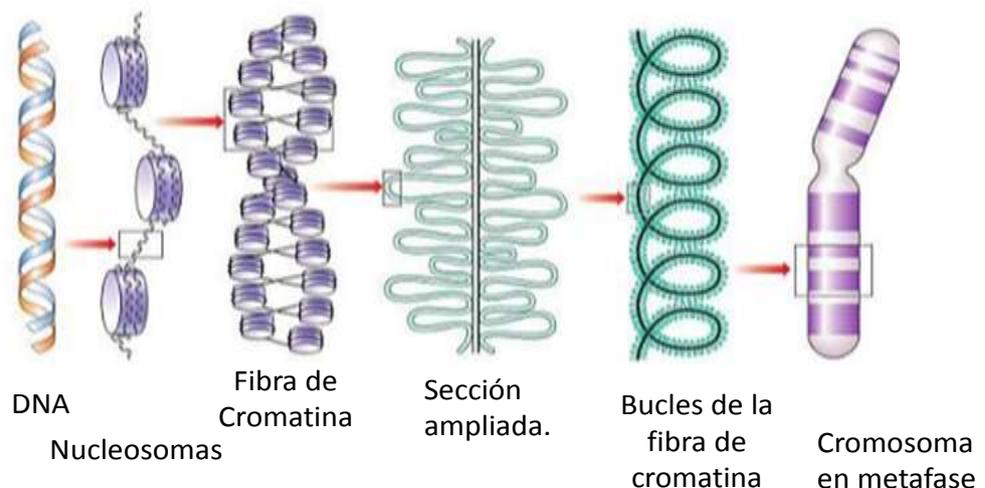
Tomado de Turnpenny y Ellard (2009).

Un dNTP es la unidad estructural del ADN y está conformado por una base nitrogenada, una desoxirribosa y grupos fosfatos. De esta manera la polimerasa empieza a alargar la cadena hasta completar la región *diana* lo que ocurre cuando encuentra al otro extremo al otro cebador que flanquea la región a amplificar. La polimerasa del ADN es una enzima termoestable y su temperatura óptima está entre los 72°C. Estas reacciones se realizan en ciclos varias veces y dentro de un equipo llamado termociclador (o máquina de PCR) que permite controlar la temperatura como también subirla y bajarla.

En el Capítulo 5, se profundiza sobre esta técnica y se describen algunas variantes que han surgido a través de los años como la variante cuantitativa conocida como PCR en tiempo real.

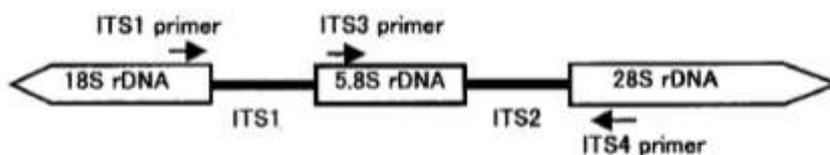
- b) **Gel electroforesis.** Permite la separación de las moléculas en función de su carga y su carga eléctrica. La separación se realiza dentro de un campo eléctrico en un soporte como un gel de agarosa (Ver Capítulo 5).
- c) **ITS (del inglés: “internal transcribed spacer”).** son secuencias cortas dentro de la unidades de transcripción pre –tRNA (Ver Figura 11) de los eucariotas (5'18S – ITS1 - 5.8S – ITS2- 28S 3') Ver Figura 11. Su análisis es muy utilizado en la identificación de las cepas (Fujita, *et al.*, 2001) debido a que son regiones que han evolucionado junto con los microbios; presentandose diferencias entre los diferentes grupos bacterianos.

Figura 10. ADN (Gráfico tomado de: (Turnpenny y Ellard, 2009))



- d) **La fracción 16S rDNA.** son secciones de nucleótidos que codifican el 16S rRNA. La molécula 16S ribosomal RNA es un componente de las subunidades 30S (unidades svedberg) de los ribosomas procarióticos, existiendo múltiples secuencias de esta molécula dentro de una bacteria. El gen que codifica para 16SrRNA es muy usado en estudios de filogenia ya que incluye algunas regiones bien conservadas en diferentes especies de bacteria. Para la amplificación de esta sección se usan *primers* o cebadores llamados “cebadores universales”.

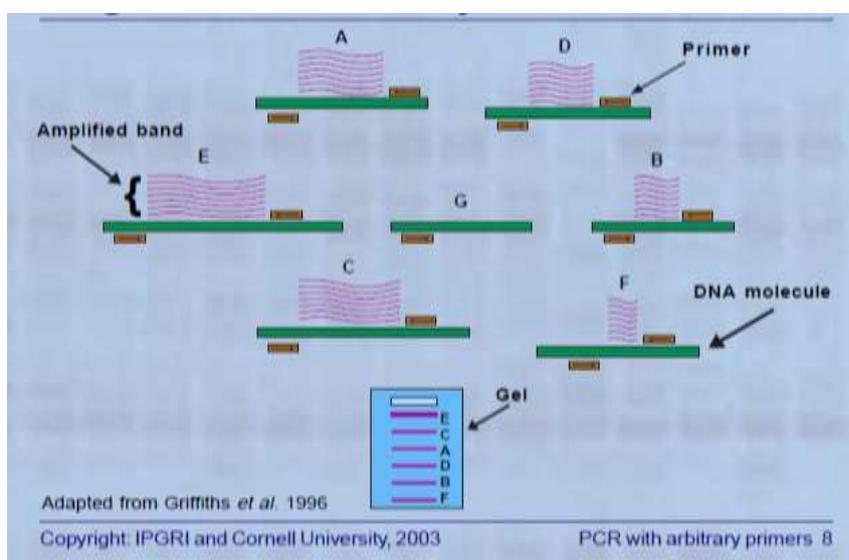
Figura 11. Genes ribosomales unidos por ITS señalando los “primers” usados por Fujita, *et al.* (2001) en un estudio de identificación de levaduras.



Estos cebadores universales son diseñados para acoplarse a algunas de las regiones conservadas. Entre esas regiones conservadas delimitadas por los cebadores, o sea, en la *región diana*, existen zonas hipervariables, que también serán amplificadas. Las regiones hipervariables, son típicas del microbio, (su huella digital) las que después de su secuenciamiento (método analítico que permite determinar la secuencia en la que se unen los nucleótidos: Ver Capítulo 5) permiten la identificación bacteriana (Frusca, 2008). Esta es una alternativa a los métodos fenotípicos de identificación de bacterias (Franzetti, *et al.*, 2004).

Figura 12. Esquema de Técnicas RAPD.

Tomado de: ([Http://Irc.Igd.Cornell.Edu/Molecularmarkers/Rapds.Pdf](http://Irc.Igd.Cornell.Edu/Molecularmarkers/Rapds.Pdf), 2003)



a) **RAPD (“Random Amplification of Polymorphic DNA”).** Es una de las técnicas que usa “primers” o cebadores arbitrarios para amplificar secuencias anónimas de ADN, estos cebadores son secuencias cortas de 8 o 12 nucleótidos los cuales se introducen en el ADN genómico y se prosigue con la reacción de PCR, al final se obtendrán algunas fracciones amplificadas. Para diferentes microorganismos el número de fragmentos y el tamaño de estos (determinados por técnicas electroforéticas) serán diferentes y dependerá de la cepa microbiana. (Ver Figura 12 y también Ver Capítulo 6).

2.2.4 Introducción a algunas aplicaciones prácticas para la Identificación de microorganismos con técnicas moleculares.

La identificación de los microorganismos ha sido una tarea que ha demandado de estrategias cada vez más precisas a los microbiólogos de alimentos. Las identificaciones realizadas en base a características morfológicas vía microscopios (coloración *Gram* y otros) son todavía de gran ayuda las que seguidas por las pruebas bioquímicas que ponen en evidencia diferencias en características enzimáticas de los microorganismos, son el clásico punto de partida para la identificación.

Estas técnicas sin embargo no son suficientes para establecer el taxón al que pertenece una determinada cepa (taxón: grupo de microorganismos considerados como un grupo por los taxomistas, el grupo tiene un nombre formal o *nombre científico*). La determinación de la huella genética del microorganismo, llamada también “fingerprint” es necesaria para su identificación y diferenciación de aquellos que son relacionados muy cercanamente. La Figura 13 presenta un esquema tomado del trabajo de (Frusca, 2008) para identificación microbiana en alimentos. Un número

mayor de alternativas de identificación microbiana, se discuten en el *Capítulo 6*, algunos mucho más exactos y basados en técnicas moleculares.

El método de la Figura 13 inicia con la purificación de la cepa, con ayuda de medios de cultivo selectivos, a continuación se usan las técnicas moleculares como las de amplificación con PCR de la fracción 16S rDNA. Los datos del secuenciamiento son analizados comparándolos con bases de datos que se pueden encontrar en:

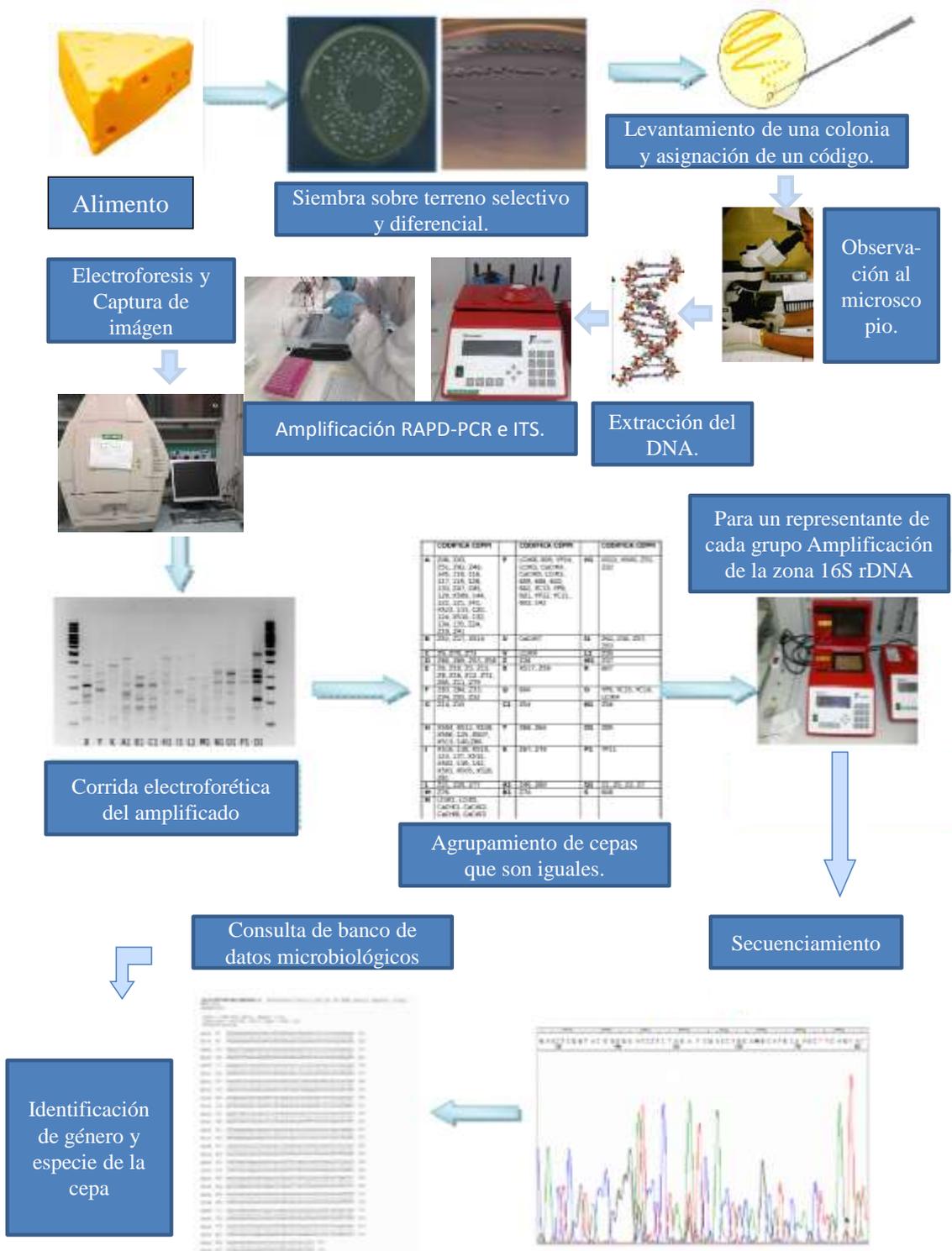
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genomes-maps/>. Sin embargo, éste método es bastante largo, por lo que en el transcurso del tiempo han aparecido otros más simplificados (ver *Capítulo 6*). Como ejemplo, se hará referencia que a nivel comercial, existen algunos formatos de tipo rápido, aunque todavía costosos, pero que tratan de ser orientados al control de la inocuidad de los alimentos. Entre ellos se encuentra el método BAX®. Este sistema ya se ha experimentado en productos marinos y consiste en lo siguiente:

(http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/BAX_System/index.html) los microbios de la muestra son sometidos a un periodo de pre-enriquecimiento, y luego son calentados con la finalidad de lograr la ruptura de la pared celular y liberación del ADN, después de ello las diferentes muestras y los controles son colocados en cada uno de los pocillos de una placa especial para ser introducidos en una máquina de tipo PCR en tiempo real (Ver *Capítulo 5*), adicionando luego a cada pocillo, unas pastillas que son proporcionadas en el kit y que contienen todos los reactivos en la cantidades correctas para que la reacción de PCR prosiga, mas unos tintes fluorescentes que permitirán ver si la región de ADN típica (única en la bacteria) de un determinado microorganismo se llega a amplificar. Esto se consigue a través del examen de la información generada por la interacción de esta región con un sensor etiquetado con el tinte fluorescente. De esta manera se puede identificar el microbio. (Mermelstein, 2009).

Una técnica alternativa muy usada en los centros de investigación en años recientes para determinar si dos cepas microbianas son iguales es la electroforesis de pulsos (descrita con más detalle en el Capítulo 6). En centros de investigación internacionales tales como CDC (Mermelstein, 2008), se viene aplicando a alimentos junto con otros métodos moleculares para la identificación correcta de los microbios principalmente patógenos. Una electroforesis de pulsos para identificar patógenos se caracteriza porque, la separación ocurre en campos eléctricos que cambian de orientación periódicamente; esta variabilidad permite la resolución de los fragmentos grandes (>600 kb) producto de las pruebas moleculares. Las bacterias aisladas después de ser lisadas dentro de bloques de Agarosa, son lavadas, el ADN que queda en la agarosa es digerido con enzimas de restricción (enzima que corta la doble cadena de ADN en lugares donde existe una secuencia específica de nucleótidos [sitios de restricción] con lo que se generan diferentes tipos de fragmentos, típicos para el microbio. Los fragmentos son separados por este tipo de electroforesis, obteniéndose un patrón de fracciones. Este método se fundamenta en que si dos cepas de bacterias generan los mismos patrones después de la electroforesis de pulsos entonces son la misma cepa. (PulseNet at: <http://www.cdc.gov/pulsenet/index.htm>)

Una limitación señalada para los métodos de PCR es la de no poder diferenciar entre células microbianas muertas y células vivas. Según lo reporta (Mermelstein, 2009a) la coloración con “ethidium bromide mono azide”, previo al análisis se uniría al ADN en las células muertas volviéndolo insolubles e invisibles para las etapas posteriores del análisis por los métodos de PCR; es de señalar que este colorante no puede penetrar las células vivas (Mermelstein N, 2009).

Figura 13. Ejemplo de la metodología para identificación de género y especie, seguida por (Frusca, 2008)



BIBLIOGRAFÍA DEL CAPITULO 2

- Bell C, Neaves P y Williams A. 2005. Food Microbiology and Laboratory Practice. In: Science, B., editor. Oxford: Blackwell.
- Franzetti L, Pompei M, Scarpellini M y Galli A. 2004. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. of different origins. *Current microbiology* 49(4):255-260.
- Frusca M. 2008. Tipizzazione Microbiologica di Tome Caprine Ottenute da Latte Crudo Mediante Lavorazioni Artigianali. . Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche. Italia: Università degli studi di Milano.
- Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S y Hashimoto T. 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology* 39(10):3617.
- <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/images/gramstain.jpg>. 2004. Gram Stain. Pearson Education.
- http://homepage.ntlworld.com/diamonddove/04a_Gram/Gram.h11.jpg. 2001. Gram Positive and Negative bacteria In: Gram_h11, editor.: University of Warwick.
- <http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/RAPDs.pdf>. 2003. PCR-based technologies PCR with arbitrary primers (RAPDs, DAF, AP-PCR). In: RAPD, editor.: IPGRI and Cornell University.
- <http://nhscience.lonestar.edu/biol/wellmeyer/media/IMViC1.jpg>. 2009. IMVIC reactions
- Merck®. 2005. Microbiology Manual. 12 ed. Darmstadt Germany.
- Mermelstein N. 2009a. Advances in sample preparation. *Food Technology* 63(12):76 -79.
- Mermelstein N. 2009b. Analyzing for Microbial Contaminants. *Food Technology* 63(10):68 - 72.
- Oliva R, Ballesta F, Oriola J y Claria J. 2004. Genética Medica. Universitat de Barcelona. p. 346.

- Phillips EA, Tapsall JW y Smith DD. 1980. Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). *Journal of Clinical Microbiology* 12(2):135 - 137.
- Torres-Lamas M y Moreno-Vásquez S. 2001. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. In: Gonzáles-Andrés, F. & Pita, J., editors. *Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos*. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola INEA. p. 279.
- Turnpenny P y Ellard S. 2009. Emery, *Elementos de Genética Médica*. España: Elsevier - Health Sciences Division.

CAPÍTULO III

CARACTERÍSTICAS INSTRUMENTALES DE LOS LECTORES DE MICROPOZOS DE UBICACIÓN ACTUAL EN EL MERCADO.

3.1 Luz, absorción, emisión y Lectores: Conceptos básicos.

Los métodos basados en espectroscopia son muy variados, como variada es la interacción entre la energía y la materia. Como lo revisan (Willard, *et al.*, 1988), la luz es una forma de energía electromagnética. Esta forma de energía presenta algunas características que son explicadas a través de su naturaleza ondulatoria (longitud de onda λ , frecuencia ν , velocidad $c = \lambda \times \nu$) y su naturaleza cuántica (cantidad de energía (E) en un fotón o unidad de absorción por la materia). Ambas naturalezas están interrelacionadas de manera que $E = h \nu$. donde (h = constante de Planck). Asimismo un haz de radiación de un determinado nivel energético puede presentar una diferente intensidad, la cual es definida como el número de fotones por segundo que se propagan por el haz. Cuando un haz de luz transporta radiación de una sola longitud de onda se conoce como monocromática y cuando transporta radiaciones de diferente longitudes de onda, policromática.

El espectro electromagnético presentado en la Figura 14, muestra que para las diferentes regiones existe un rango de valores de longitud de onda y frecuencia. Se observa asimismo que a mayor longitud de onda (λ) menor es la frecuencia (ν) y menor es el contenido de energía asociado a los fotones que ella transporta; lo contrario se observa para una menor longitud de onda λ (Penner, 2010a). Esta radiación que se transporta en línea recta con velocidad c , vibra en diferentes planos con sus λ y ν característicos, más si atraviesa un dispositivo que deja salir sólo la luz que vibra en un solo

plano, recibe el nombre de luz polarizada, usada en polarimetría bajo los principios de la ley de Biot (Figura 15).

3.2 Luz: Conceptos Básicos.

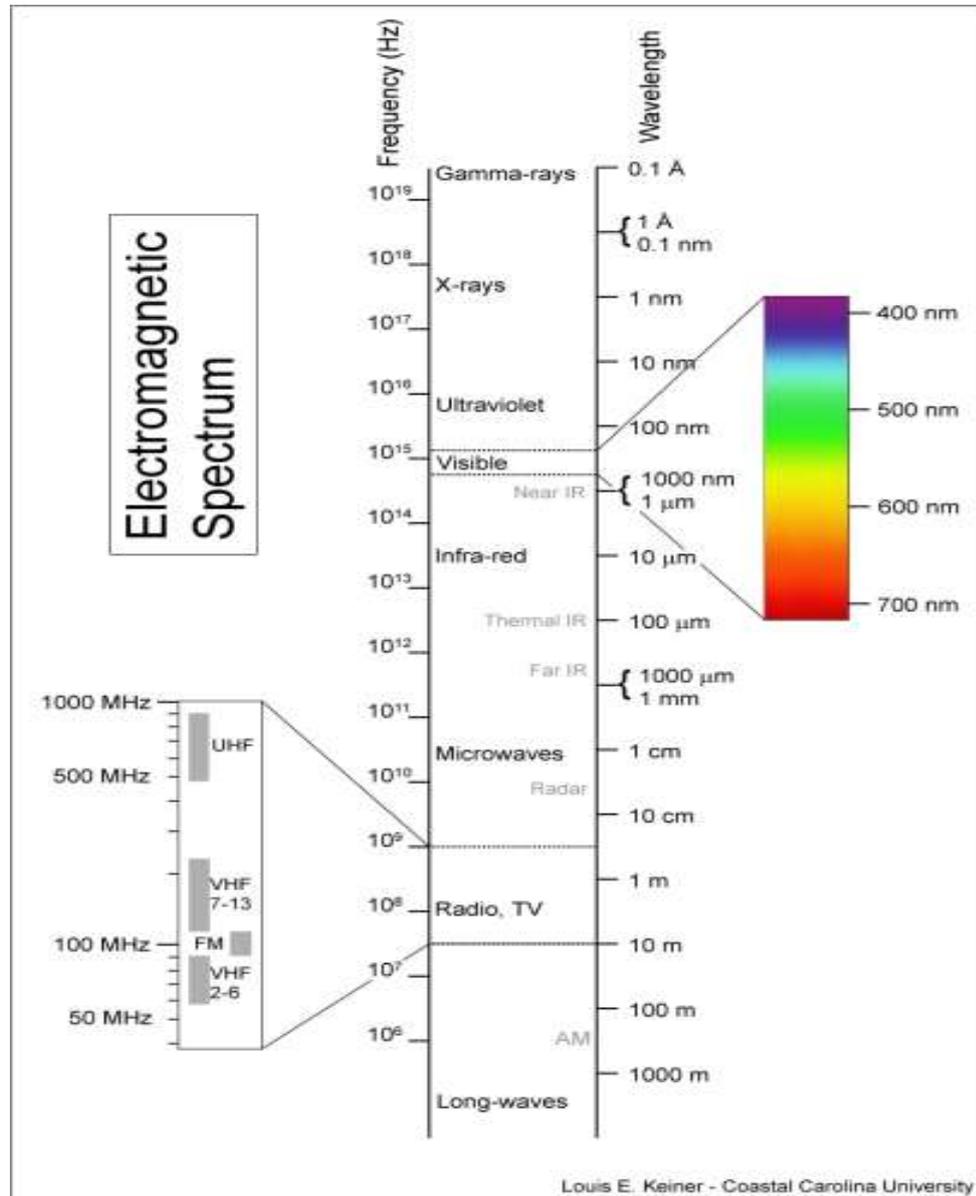
Willard y Merrit (1988); Skoog y Leary (1992) y otros, señalan como poder radiante P , a la energía del haz de luz que atraviesa una determinada área por segundo, entendido también como la velocidad de desplazamiento de la energía del haz. El concepto de poder radiante es usado con frecuencia de manera indistinta con el de Intensidad I , sin embargo Skoog y Leary, (1992), precisan como diferencia que I se refiere específicamente al poder luminoso por ángulo sólido. Aun cuando son términos que con frecuencia se usan de manera indistinta, el poder radiante P expresado como energía se mide en watt (W) con unidades de energía/tiempo o en unidades SI joules/segundo. Mientras que I se reporta en unidades conocidas como candelas (cd), que representa la cantidad de flujo luminoso en lúmenes que emite una fuente por unidad de ángulo sólido en estereorradianes (sr) (ver Figura 16). El flujo luminoso se obtiene ponderando la potencia para cada longitud de onda con la función de luminosidad, que representa la sensibilidad del ojo a diferentes longitudes de onda (lumen= cd x sr). Se mide sólo en el rango visible.

3.2.1 Transmitancia.

Esta referido a la cantidad de energía que atraviesa un cuerpo en unidad de tiempo. Cuando se entiende por transmitancia óptica se habla de la fracción de luz incidente, a una longitud de onda especificada, que pasa a través de una muestra. Cuando P_0 es la radiación incidente en la celda de absorción y P es la radiación de salida al otro extremo, se tiene a la

Transmitancia T expresada tal como se muestra en la Figura 17, en función de dicha radiación.

Figura 14. Regiones del espectro electromagnético. Clasificadas en función a su longitud de onda. Tomado de: <http://scipp.ucsc.edu/>



3.2.2 Absorbancia.

Es otra forma de describir la relación entre P_o y P , Ver Figura 17. En análisis de alimentos se utiliza con fines cuantitativos la relación entre la Absorbancia de una determinada solución (A) y la concentración de las

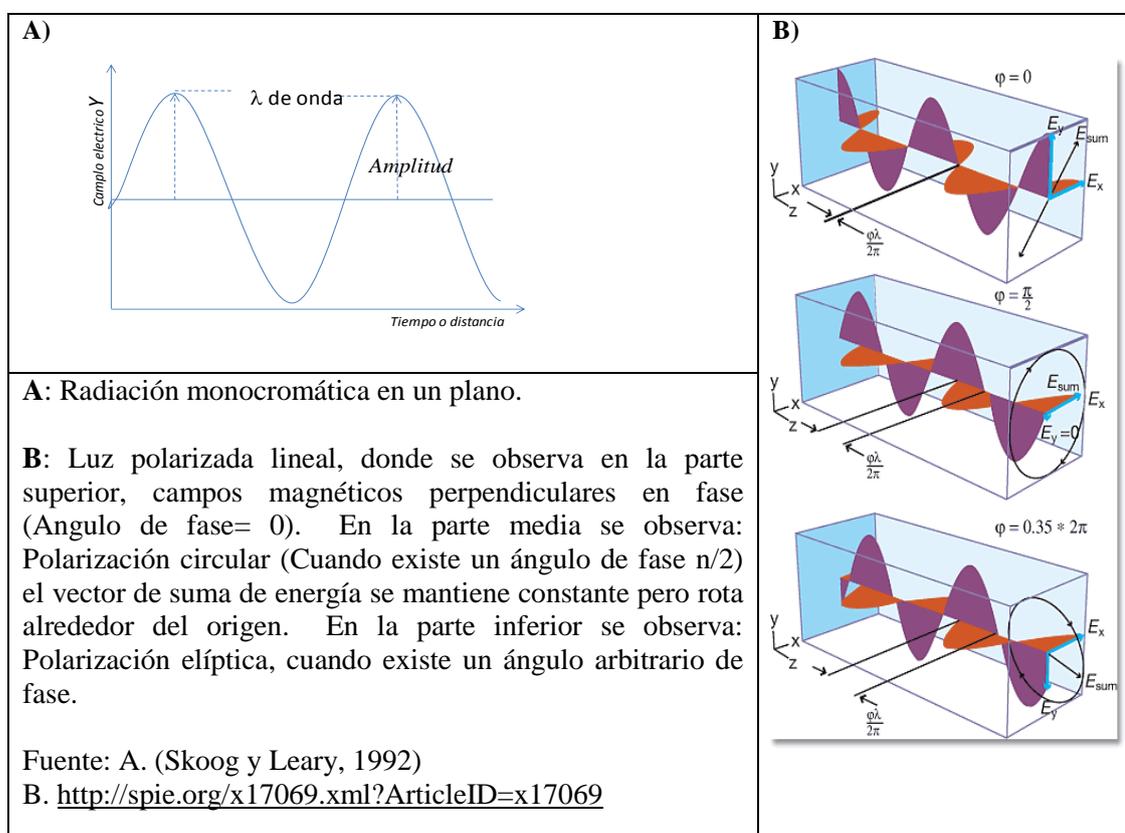
especies absorbentes (C), dicha relación fue establecida por Beer como una Ley que lleva su nombre de esta manera:

A (absorbancia) = *Concentración de especies absorbentes x longitud del camino que recorre el haz de luz en solución (cm), x constante de absortividad que depende de las propiedades moleculares de las especies absorbentes ($\text{cm}^{-1} \times \text{concentración}^{-1}$).*

Estas propiedades moleculares son afectadas por la longitud de onda y las condiciones químicas del entorno tales como pH, fuerza iónica, tipo de solvente y otros (Nielsen, 1998). Cuando la concentración del analito se reporta en unidades de molaridad, la absortividad es reemplazada por la absortividad molar “ ϵ ”, $A = \epsilon \times b \times c$.

Figura 15. Representación de un haz de luz monocromático, radiación polarizada en un plano.

En la izquierda se observa la representación bidimensional del vector eléctrico. En la derecha se observan los campos eléctricos y magnéticos representados en ángulos rectos uno con el otro y la dirección de propagación en el eje X.



En este último caso, “c” esta expresada como concentración molar. Skoog y Leary (1992) explican el proceso de absorción como un “proceso” por el cual la energía electromagnética de la luz es trasferida a los átomos, iones o moléculas que constituyen la muestra.

Tabla 1. Métodos espectroscópicos basados en radiación Electromagnética.

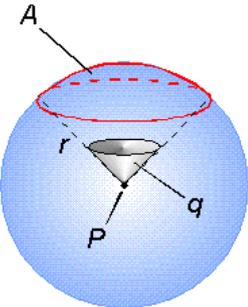
<i>Tipo de Espectroscopia</i>	<i>Rango de longitud de onda usual</i>	<i>Tipo de transición cuántica</i>
Emisión de rayos γ	0.005 – 1.4 °A	Nuclear
Rayos – X absorción, emisión, fluorescencia y difracción.	0.1 – 100 °A	Electrones internos
Absorción de ultravioleta en el vacío.	10 – 180 nm	Electrones de enlace
Absorción ultravioleta, visible y emisión en fluorescencia.	180 – 780 nm	Electrones de enlace
Absorción infrarroja y Dispersión Raman	0.78 – 300 μm	Rotación / Vibración de moléculas.
Absorción de microondas.	0.75 – 3.75 mm	Rotación de moléculas
Resonancia Electrón spin.	3 cm	Spin de electrones en un campo magnético.
Resonancia Magnética Nuclear.	0.6 – 10 m	Spin de núcleos en un campo magnético.
$1^\circ\text{A} = 10^{-10} \text{ m} = 10^{-8} \text{ cm}$; $1\text{nm} = 10^{-9} \text{ m} = 10^{-7} \text{ cm}$; $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m} = 10^{-4} \text{ cm}$		

Fuente: (Skoog y Leary, 1992)

Figura 16. Representación gráfica de 1 estereoradián. (unidad de ángulo sólido).

Tomado de:

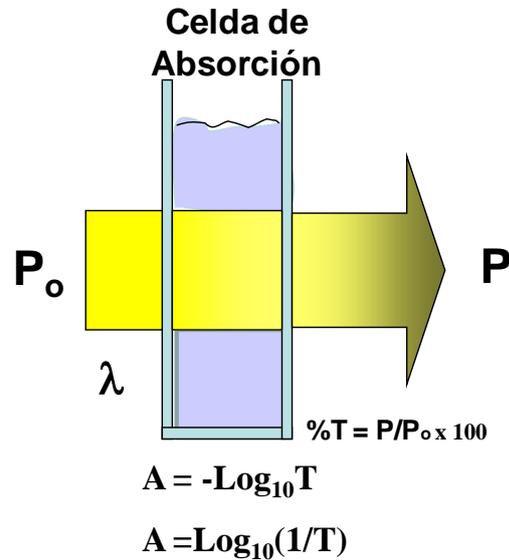
http://searchciomidmarket.techtarget.com/sDefinition/0,,sid183_gci528813_00.html

	<p>El estereoradián es el equivalente tridimensional del “radian” o “rad”, ángulo plano en el Sistema Internacional de Unidades, que representa el ángulo central en una circunferencia que subtende un arco cuya longitud es igual a la del radio.</p>	<p>Un estereoradián está definido de modo que: P en la figura representa el centro de la esfera, el ángulo cónico sólido que representa un estereoradián de modo que el área A de la esfera es equivalente a R^2 donde R es el área de la esfera.</p>
---	---	--

Esto ocasiona que las moléculas puedan pasar en condiciones de temperatura ambiente de un estado basal a un estado excitado de mayor energía. Los niveles energéticos posibles para una molécula, son un número limitado o discreto y de acuerdo con la teoría cuántica, para que la absorción pueda ocurrir, la energía del fotón que producirá la excitación deberá ser exactamente igual a la diferencia energética entre el estado basal y el estado excitado para las moléculas absorbentes de la muestra a esa determinada longitud de onda. El patrón de absorción para una sustancia a diferentes longitudes de onda es único por lo que puede ser utilizado en la caracterización de la misma, haciendo un barrido de absorbancia a diferentes longitudes de onda. El estado excitado es muy inestable y tiene un tiempo de duración muy corto, regresando las moléculas a su estado basal casi instantáneamente disipando la energía principalmente por un aumento en sus energías vibracional y rotacional. Tal como Pender citado por Nielsen, (1998) describe la energía de un átomo es igual a la energía de sus niveles electrónicos mientras que la energía de una molécula es más

compleja y puede ser descrita por la energía electrónica, vibracional y rotacional.

Figura 17. Esquema que expresan los conceptos de Transmitancia y Absorbancia.



3.2.3 Dispersión.

Llamada también “scattering” ocurre cuando la luz se desvía de su trayectoria original. Esto se puede explicar frecuentemente por el fenómeno de refracción. Cuando el haz de luz pasa por una celda que contiene partículas dispersas con un índice de refracción diferente del medio, la intensidad del haz saliente de la celda es menor debido al efecto de la dispersión. Willard y Merrit (1984) reportan que la dispersión total generada por un determinado número de partículas, sin interacciones de dispersión múltiple, es igual a la suma de las dispersiones individuales y la absorbancia del sistema es directamente proporcional a la concentración de las partículas. En este concepto se basan algunos de los métodos diseñados para cuantificar número de microorganismos en solución. Los métodos analíticos de Turbidimetría y Nefelometría se basan en ello. En Turbidimetría se suele medir la intensidad de la luz no dispersada %

Transmitancia y en Nefelometría se mide la luz dispersada generalmente a un ángulo recto con respecto a la dirección del haz de luz incidente.

3.2.4 Fotoluminiscencia: Fluorescencia y Fosforescencia.

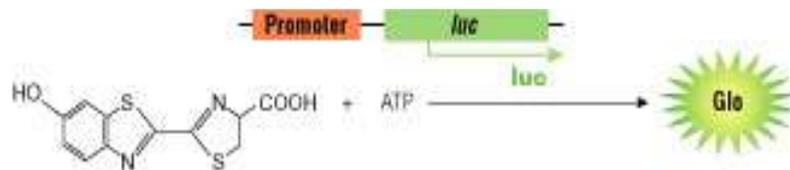
Skoog y Leary, (1992) definen estos fenómenos como un proceso de “emisión” por el cual la absorción de la radiación electromagnética de la luz genera átomos o moléculas excitadas las que después tienen que perder el exceso de energía, para poder regresar a su estado electrónico normal mediante emisión de radiación radiante “luz”. En Fluorescencia, esta emisión de luz (para poder regresar a su estado electrónico base) es casi inmediata entre los 10^{-8} a 10^{-5} segundos seguido de la excitación; a diferencia de ella, la Fosforescencia, presenta una emisión diferida (tiempos mayores de 10^{-5} segundos y puede durar minutos hasta horas). En los métodos de análisis que usan fotoluminiscencia generalmente se mide la emisión de la radiación electromagnética por la sustancia que se está analizando o “analito”. En la mayoría de los métodos estas mediciones se hace a un ángulo de 90° con respecto a la dirección del rayo de luz usado en la excitación.

Los analitos que son átomos en estado gaseoso exhiben fluorescencia resonante, porque la radiación que emiten durante la relajación, es igual a la radiación usada durante la excitación ya que no presentan un gasto de ella debido a vibración. Por el contrario las moléculas en solución presentan varios niveles de energía vibracional asociados a los niveles electrónicos de excitación, lo que se ha descrito como fluorescencia no resonante, por lo cual primero se empieza a disipar la energía absorbida por vibración y después cuando se empieza a disipar por emisión, ésta ya es un poco menor, por lo que la luz emitida generalmente es de una longitud de onda mayor

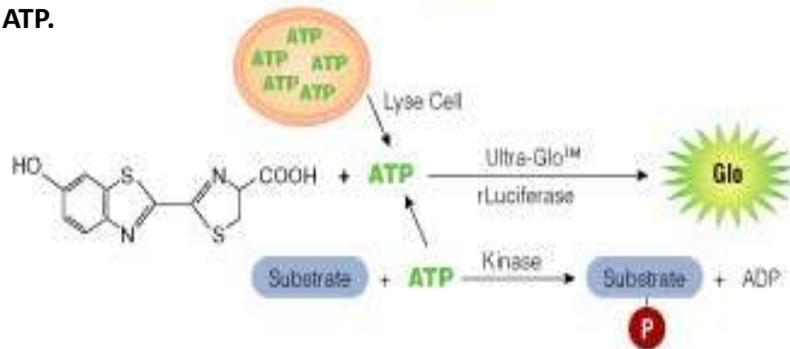
Figura 19. Algunas aplicaciones de luminiscencia en biología molecular.

Abajo: en un Kit de Promega®

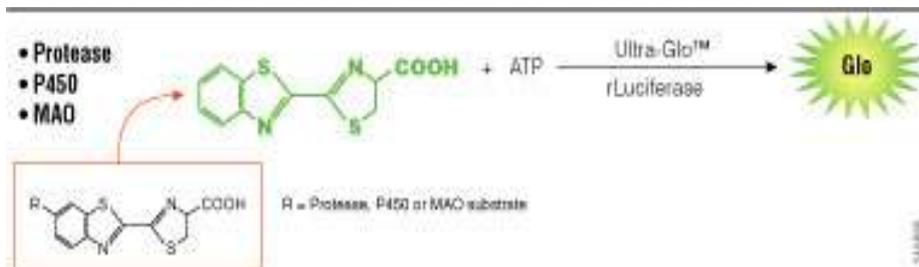
Ensayos de “gen de reporte” mide cambios en los niveles de luciferasa.



Ensayos de viabilidad celular y ensayos cinéticos miden cambios en los niveles de ATP.



Ensayos de Proteasa, P450, y MAO miden cambios en niveles de luciferin.



En la Figura: MAO: Monoaminaoxidasa. P₅₄₀, citocromo P 450. “Gen de reporte”, se refiere a que en algunos casos se usa el gen de la luciferasa para verificar el éxito de la incorporación de algún gen en estudio; por lo que algunas veces es introducido dentro de la molécula del ADN y puedo compartir o no la misma región del ADN “promoter” (que facilita la transcripción de un gen en particular) para el gen en estudio.

Fuente: (Wood, 2007)

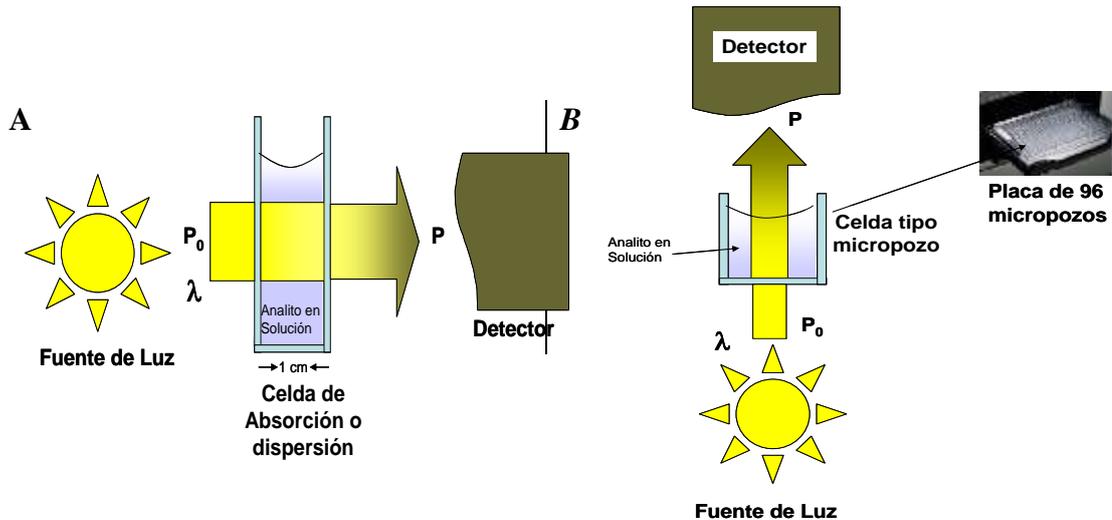
Cuando estas reacciones de quimioluminiscencia ocurren en el interior de los organismos vivos, reciben el nombre de bioluminiscencia. Este es un fenómeno muy extendido en bacterias, hongos, protistas unicelulares, gusanos, equinodermos, insectos y peces. Las moléculas químicas producidas por estos organismos han sido identificadas y en muchos casos clonadas por lo que se usan en una variedad grande de kits en biología

molecular como por ejemplo se presentan en la Figura 19. Una de las ventajas es que se pueden medir unas cuantas moléculas bioluminiscentes dentro de la célula.

3.3 Lectores. Comparación entre lector de absorbancia en cubetas tipo celdas vs lector de absorbancia en micropozos.

Los equipos que determinación de la absorbancia, son los llamados espectrofotómetros, generalmente ellos se presentan en un formato de cubetas, donde: Luz → Monocromador → Muestra → Detector, es el diseño más común, ver Figura 20 A. En éste diseño de fotometría clásica, el haz de luz es de dirección horizontal, lo que facilita la aplicación de la ley de Beer debido a que se usan cubetas de espesor y forma definida. En la Figura 20A, se observa claramente que el espesor de paso de luz es de 1 centímetro; sin embargo este diseño al requerir que cada muestra individualmente deba ser movida para ser expuesta al rayo de Luz, solo permite determinaciones de 9 a 10 cubetas en una secuencia de lecturas. En los lectores en formato de micropozos, el flujo de luz es de tipo vertical (Figura 20 B), por lo tanto, este espesor de paso de luz no está delimitado por la geometría del pozo sino más bien por la altura del líquido, incluyendo variabilidad; de esta manera los volúmenes utilizados en los diferentes micropozos deben ser constantes (Medidos con micropipetas). Los lectores de micropozos modernos, están conectados a un software y computadora, con el cual, normalizan todas las lecturas y las corrigen automáticamente a valores de densidad óptica equivalentes a un espesor de paso de luz de 1 cm. Esta y otras metodologías desarrolladas para eliminar fuentes de variabilidad han permitido el uso difundido de los lectores de micropozos en los laboratorios de química, bioquímica y biología.

Figura 20. Esquema comparativo del paso del haz de luz por la muestra en los espectrofotómetros.



Formato: A: de lector de absorbancia en cubetas tipo celdas; B: lector de absorbancia en micropozos.

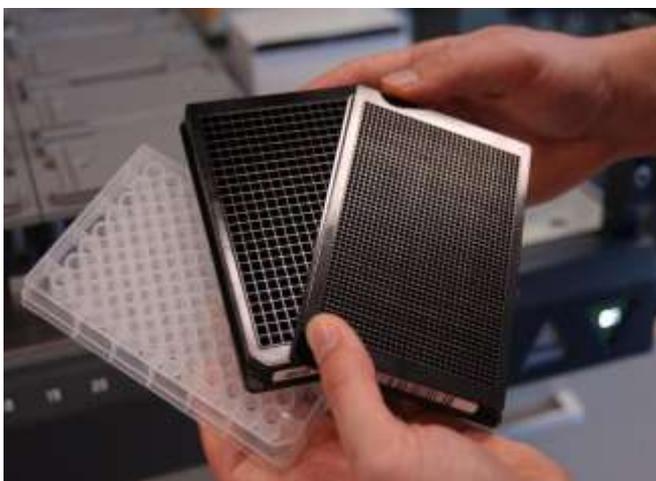
3.4. Origen de los lectores en formato de micropozos.

Los primeros micropozos construidos en 1951 fueron pocillos realizados con alambre enrollado en filas de 12 por 6 sobre bloques de acrílico los que fueron usados en vez de los tubos de prueba (Buie, 2010a). Posteriormente la compañía “the American Linbro” comenzó la producción en masa de las placas de 96 micropozos. En 1991 las placas empezaron a ser producidas en formatos de 864 micropozos por la compañía Bio-Rad, al año siguiente la compañía Genetix® reporta que el tamaño óptimo para varias aplicaciones es el de 384 micropozos. Ver figura 21.

En 1988 la asociación SBS (Society for Bimolecular Screening) en coordinación con varios fabricantes decidieron estandarizar el tamaño y forma de los micropozos, esto permitió que se produzcan equipos para automatizar el lavado de los mismos y también instrumentos de medición donde la muestra estaría en este formato.

Los primeros lectores de micropozos aparecieron frente a la necesidad de trabajar con el sistema ELISA (técnica de inmunoensayo que en español significa ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) en 1976. Entre los primeros fabricantes tal como lo revisa Buie (2010a) se tienen, LabSystems, ahora parte de ThermoFisher, quien produce el fotómetro multiskan. Ver figura 22.

Figura 21. Micropozos en diferentes tipos. Los de color negro son para estudios con sustancias fluorescentes.



Primera placa de la izquierda:
Formato de 96 micropozo. Placa
central de color negro: Formato de
384 micropozos. Placa de la izquierda
en negro: Formato de 1536
micropozos.

Fuente de la foto:
[http://www.labautopedia.org/
mw/index.php/Image:Microplates.jpg](http://www.labautopedia.org/mw/index.php/Image:Microplates.jpg).
Autor: S.D. Hamilton

En 1986 aparecieron las primeras aplicaciones para medir radioactividad en alícuotas por el método del Conteo por centelleo líquido (Modelo Wallac (ahora en PerkinElmer). 1997 fue el año en que BMG LABTECH®, fue el primero que introdujo el lector de micropozos de multidetección incluyendo determinaciones de fluorescencia polarizada.

Figura 22. Fotómetro Multiskan. Uno de los primeros modelos.



Fotómetro de multiplacas con 25000 unidades vendidas globalmente.

Rango de longitudes de onda 400 - 750 nm. Linealidad 0 — 2,0 Abs, $\pm 2\%$ a 405 nm. Exactitud: $\pm 2\%$ o 0,007 Abs, valor típico $\pm 1\%$ (0-2,0 Abs). Filtros de 405 nm, 450 nm y 620 nm. (Ficha Técnica EQUILAB, Santiago. Chile)

3.4.1 Aplicaciones de Absorción Ultravioleta, Visible y Emisión en Fluorescencia en la Investigación con Alimentos.

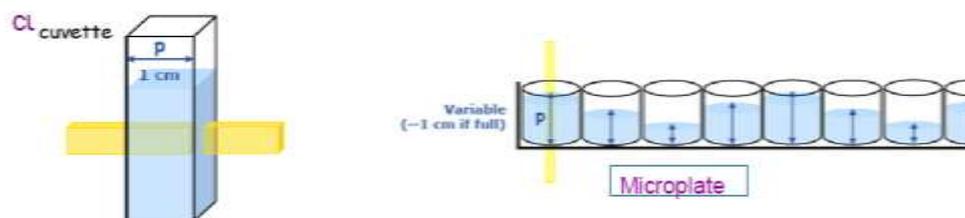
Son variadas las aplicaciones que hacen uso de la espectrofotometría en control de calidad y en investigación con alimentos, por lo que existe una amplia distribución de los equipos que determinan la absorción UV-VIS (200 a 700 nm) en la mayoría de los laboratorios. Varios métodos que hacen uso de determinaciones de absorbancia UV-VIS se han adaptado al formato de los equipos lectores de micro pozos en los últimos años; generalmente 96 micro pozos; esto ha hecho posible incrementar el número posible de muestras a analizar por una misma persona, facilitando un mayor número de determinaciones. Asimismo los métodos basados en fluorometría han revolucionado las determinaciones de propiedades bioactivas tales como de capacidad antioxidante en éste formato. Las determinaciones de luminiscencia también han encontrado aplicaciones bajo este formato de micropozos principalmente en la industria de

alimentos para garantizar la inocuidad en alimentos líquidos y cremosos tal es el caso del microplate ATP luminómetro (Swientek, 2008).

3.4.2 Algunas de las ventajas y desventajas de los formatos de micropozos.

Entre las principales ventajas se encuentran el alto rendimiento en el número de determinaciones analíticas facilitando el ahorro de muestra, ya que los volúmenes empleados son pequeños. El usar volúmenes pequeños genera un aumento en la tensión superficial de los líquidos lo que puede ofrecer algunas desventajas en lo que respecta a la posterior adición de reactivos durante el análisis y para la homogeneización respectiva. Asimismo un pequeño volumen está ligado a la utilización de un haz de luz mucho más pequeño en los lectores de micropozos por lo que en la realización del experimento hay que tener mucho cuidado con cualquier material insoluble interferente, puesto que los errores ocasionados serían aquí mayores que en los de los lectores de absorbancia convencionales.

Figura 23. Esquema que muestra la variabilidad en los volúmenes que podrían acontecer en lecturas en micropozos y la necesidad de normalizarlos a un valor estándar como el de una cubeta de 1 cm³



Fuente: Heredia et al.,(2008)

Otra desventaja reportada es precisamente la debida a que las lecturas son de tipo vertical, las distancias que atraviesa el haz de luz podrían ser

relativamente variables por lo que la mayoría de los equipos cuentan con software que hace los ajustes respectivos normalizando las lecturas que se tendrían si el volumen fuera a un determinado valor estándar. Ver figura 23.

3.5 Ubicación Actual de los Lectores de Micropozos en el Mercado.

Buie (2010a) en su guía de compra de un Lector de Micropozos para el Laboratorio, indica que entre los criterios de decisión, uno de los más importantes, es considerar el sistema de detección; el cual, se recomienda sea uni-modal si el equipo es para ser destinado a una aplicación específica y frecuente o multi modal si las aplicaciones de destino son muy variadas como las que se pueden encontrar en un centro de investigación. Para los equipos con múltiples sistemas de detección, hay que considerar una mayor inversión en la adquisición. DePalma, (2010) señala la mayor flexibilidad que ofrecen estos últimos, permitiendo un alto número de determinaciones y una mejor adaptación a los requerimientos de diferentes determinaciones analíticas. La compañía Htstec del Reino Unido, reporta que según los estudios de marketing realizados, el 60% de los lectores de micropozos, entre los equipos adquiridos, utilizan filtros para seleccionar una determinada longitud de onda del espectro luminoso (o dos para el caso de las determinaciones con fluorescencia) vs un 30% que utilizan monocromadores y un 10% que utiliza ambos sistemas. Este último 10% que utiliza el sistema híbrido, combina las ventajas de una alta sensibilidad y rapidez de lectura atribuida a los filtros y la posibilidad de hacer barridos de longitud de onda y bajos costos de operación. De acuerdo con Buie (2010), entre los diferentes modelos y representantes de Lectores de Micropozos a disposición en el mercado actual se pueden encontrar los siguientes equipos:

3.5.1. Equipos con sistema de detección uni-modal “Single-mode detection”

3.5.1.1. Detectores de Absorbancia.

Estos equipos son muy utilizados en la determinación analítica en el formato de ELISA de diferentes tipos de componentes, tales como cuantificaciones de Proteínas y Fenólicos totales y también en diferentes ensayos de actividad enzimática. Dentro de este grupo encontramos equipos que no requieren de conexión externa a una computadora como también otros que si la necesitan para el análisis de los datos.

Los lectores de micropozos generalmente vienen con software, el cual dependiendo del fabricante ofrecen las ventajas del análisis de datos, compilación y validación compatibles con la mayoría de sistemas de Gestión de Información de los laboratorios (De Palma, 2010).

3.5.1.2. Detectores de Fluorescencia.

Entre las variadas aplicaciones analíticas de estos detectores en alimentos se encuentran, por ejemplo las determinaciones de ORAC, capacidad antioxidante (oxygen radical absorbance capacity); estas hacen uso de determinaciones de fluorescencia en formato de micropozos y han sido reportados para diversos analitos (Huang, *et al.*, 2002)

Buie (2010) describe que en este tipo de lectores de micropozos, una vez que la luz de excitación ilumina la muestra y se produce la fluorescencia, el equipo, mide la luz emitida por el analito, por medio de un sistema de fototubos multiplicadores, separándola de la luz de excitación. Esta señal de luz emitida, puede obedecer la ley de Beer a bajas concentraciones de analito, presentándose una zona de linealidad, la que deberá determinarse experimentalmente para cada caso (Penner, 2010b). Si bien es cierto los lectores de fluorescencia son costosos, ellos presentan una mayor

sensitividad en las determinaciones. También se presentan en el mercado fluorímetros en formato de micropozos sin o con necesidad de conexión a computadora. Modelos como *Enspire* de Perkin Elmer, *GloMax®-Multi+* de Promega, *FLIPR Tetra System* de Molecular Devices y *ELx800* de BioTec entre otros se han reportado en el primer grupo y en el segundo grupo con conexión a computadora modelos tales como: *FLUOstar OMEGA* de BMG LABTECH, *Victor X* de Perkim Elmer, *Infinite 200 PRO* de TECAM entre otros (Buie, 2010b).

Tabla 2. Algunos modelos reportados por Buie (2010a) observados en el mercado con detección uni-modal de Absorbancia.

Modelo de Microplate Reader	Proveedor	Conexión externa a Computadora requerido
Stat Fax 4200	AwarenessTechnology	No
iMark Microplate Abs. Reader	Bio-Rad	No
ThermoScientificMultiskan FC	Thermo Fisher Scientific	No
Stat Fax 3200	AwarenessTechnology	No
EnSpire	PerkinElmer	No
xMarkMicroplateAbsorbanceSpectrophotometer	Bio-Rad	No
GloMax®-Multi+	Promega	No
ELx808	BioTek Instruments	No
SunriseTouchscreen	Tecan	No
ChroMate	AwarenessTechnology	Si
SPECTROstar	BMG labtech	Si
FLUOstar OPTIMA ABS	BMG labtech	Si
Tecan	SunriseRemote Control	Si
EnVision	PerkinElmer	Si
VICTOR X	PerkinElmer	Si
ThermoScientificMultiskanSpectrum	Thermo Fisher Scientific	Si
Infinite 200 PRO NanoQuant	Tecan	Si
PowerWave	BioTek	Si
Epoch	BioTek	Si
SpectraMax Plus 384 Absorbance MicroplateReader	Molecular Devices (ahora en MDS analytical)	Si
VMax ELISA Microplate Reader	Molecular Devices	Si

De Palma, (2010) señala que los detectores que usan dos de las tecnologías existentes para; fluorímetros tales como filtros y monocromadores, ofrecen una ventaja adicional a los que usan una tecnología uni-modal en lo que respecta a los diferentes tipos de ensayos fluorimétricos que se pueden seleccionar.

3.5.1.3. Detectores de Luminiscencia.

En formato de micropozos, el lector de luminiscencia detecta la luz emitida por la muestra, generalmente como resultado de una reacción bioquímica. El sistema óptico cuenta con una cámara de lectura de luz y un detector de tipo fotomultiplicador, el cual mide la luz emitida por las muestras durante la reacción. Esta reacción es muy usada en ensayos de expresión de genes, estudios citotóxicos, detecciones luminiscentes de ATP y viabilidad de células. Actualmente estos ensayos son usados para el estudio de los efectos bioactivos de diversos componentes alimentarios que han sido identificados en los llamados alimentos funcionales. Para este grupo (Buie, 2010a) reporta modelos de lectores con computadora incorporada y software tales como *CentroLIA LB 961 (ClinicalLuminometer)* de BERTHOLD TECHNOLOGIES; *EnSpire* de PerkinElmer o *GloMax®-Multi+* de Promega entre otros. Asimismo entre los modelos a disposición que requieren conexión a PC se tienen: *LuMate* de AwarenessTechnology Inc., *GloMax®-Multi+* de Promega, *Synergy 2 SL* de BioTek o *Orion II* de Berthold Detection Systems entre otros (Buie, 2010b).

3.5.2. Equipos con múltiples sistemas de detección.

Dentro de este grupo y dependiendo de si se usará sólo para un número determinado de ensayos (Grupo A) con los sistemas de detección más

comunes o se intentará usar para todas las aplicaciones posibles en este formato (Grupo B), incluyendo contadores de centelleo líquido, luminiscencia, fluorescencia (intensidad, “time resolved” o polarización) y absorbancia. Se encuentran en el mercado diferentes modelos para ambos grupos.

Grupo A.1: Para este grupo (Buie, 2010b) observa en los lectores una combinación de dos, máximo tres de los sistemas de detección más comunes como luminiscencia, fluorescencia y absorbancia. Para aquellos en los que el número de muestras no es muy alto (bajo rendimiento) son suficientes, matrices de micropozos de 8 x 12 (96 micropozos); donde se han comercializado modelos sin y con agitación/control de temperatura. *SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader* y *FLIPR Tetra System* de Molecular Devices y el modelo *Infinite F500* de Tecan son algunos ejemplos de estos equipos. Las ventajas de poder programar la agitación y el control de temperatura, permite realizar experimentos donde se producen reacciones dentro del equipo para su inmediata determinación.

Grupo A.2: Este grupo utiliza matrices de micropozos de alta densidad, 384- o 1,536 pocillos por ejemplo. Son usados cuando se necesita un equipo de alto rendimiento debido a la necesidad de analizar un número grande de muestras como cuando se hacen determinaciones de sondeo “screening”. En este grupo se encuentran modelos comercializados sin y con control de temperatura/agitación con los sistemas de programación respectivos necesarios para conseguir una alta uniformidad en la muestra. *EnVision* , *VICTOR X* de PerkinElmer, *POLARstar OMEGA* de BMG labtech o *Infinite 200 PRO* de Tecan son algunos modelos de este grupo tal como lo reporta (Buie, 2010b).

Grupo B.1: Son equipos de rendimiento promedio. Permiten el análisis de un número moderado de muestras, donde matrices de 8 x 12 (96 micropozos) son suficientes. En este grupo están los modelos comercializados sin y con control de temperatura / agitación. En este grupo (Buie, 2010b) reporta modelos tales como: “SpectraMax M5e Multi- Mode

Microplate Reader” o “Spectra Max Flex Station 3 System” de Molecular Devices y “Thermo Scientific Varioskan Flash” o “Thermo Scientific Appliskan” de Thermo Fisher Scientific entre otros.

Grupo B.2: En este grupo encontramos los equipos de alto rendimiento, que permiten el uso de matrices de (384 o 1,536 micropozos) muy usados en aplicaciones de sondeo y donde el costo de análisis por muestra es crítico. Aquí se encuentran modelos sin y con agitación/control de temperatura tales como: *Infinite 200 PRO* y *Infinite M1000* de Tecan o *Multimode Reader Mithras LB 940* de BERTHOLD TECHNOLOGIES, *PHERASTAR Plus* de BMG labtech y *PARADIGM Detection Platform* de Beckman Coulter entre otros.

3.5.3 Accesorios comunes en laboratorios para lectores de micropozos.

Además de las placas de micropozos, son de uso común las pipetas de multicanales y otros dispensadores automáticos de reactivos, asimismo frente a la necesidad de automatizar las lecturas, se recomiendan los apiladores y sistemas mecánicos de lavado de placas (Koppal, 2009). Entre las desventajas del uso de placas de micropozos de alta densidad (1536 pocillos), se tienen una mayor evaporación de líquidos y tensión superficial, que dificultan operaciones de lavado de células e intercambio de medios, por lo que para determinaciones de sondeo a costo reducido se recomienda el uso de placas hasta 384 micropozos.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 3

- Anonimo.2005. Advanced imaging laboratory. In.
<http://web.uvic.ca/ail/techniques/Jablonski.jpg>.
- Buie J. 2010a. Evolution of Microplate Technology. *Lab Manager Magazine* ® June.
- Buie J. 2010b. LAB MANAGER MAGAZINE'S Independent Guide to Purchasing a Microplate reader. *Lab Manager Magazine* ® July/August.
- De Palma A. 2010. Product Focus: Microplate Readers. *Lab Manager Magazine* July.
- Drecker S. 2004. Necessity is the mother of invention. In. GIT Labor-Fachzeitschrift. Darmstadt, Germany. www.gitverlag.com/go/git.
- Heredia T, Sutherland G, Motta C y Kant A. 2008. Measurement of Residual Sugar and Malate in Wines Using Molecular Devices' SpectraMax ® Plus 384 Plate Reader. Sunnyvale, CA 94089: MDS Analytical Technologies,.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill W, Judith A. Flanagan JA y Prior RL. 2002. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Forma. *J. Agric. Food Chem.* 50(16):4437–4444.
- Koppal T. 2009. Microplate Management Systems. *Lab Manager Magazine* July.
- Penner MH. 2010a. Basic Principles of Spectroscopy. In: Nielsen, S., editor. Food Analysis. Fourth Edition ed. New York, USA: Springer. p. 375 - 385.
- Penner MH. 2010b. Ultraviolet, Visible, and Fluorescence Spectroscopy. In: Nielsen, S., editor. Food Analysis. Fourth Edition ed. New York, USA: Springer. p. 387 - 405.
- Skoog DA y Leary JJ. 1992. Principles of instrumental analysis,4th Edltion ed. Philadelphia, PA: Saunders College Publishing.
- Swientek B. 2008. Ensuring Food Safety and Quality. *Food Technology* 62(8):105- 108.

Willard HH, Merritt LL, Dean JA y Settle FA. 1988. Instrumental Methods of Analysis. A & C Black.

Wood KV. 2007. Focus: Bioluminescent Assays. The Bioluminescence Advantage In. <http://www.promega.com/enotes/features/fe0027.htm>.

CAPÍTULO IV

EL LECTOR DE MICROPOZON EN ANALISIS FISICO-QUIMICO DE ALIMENTOS Y ALGUNAS APLICACIONES PRÁCTICAS

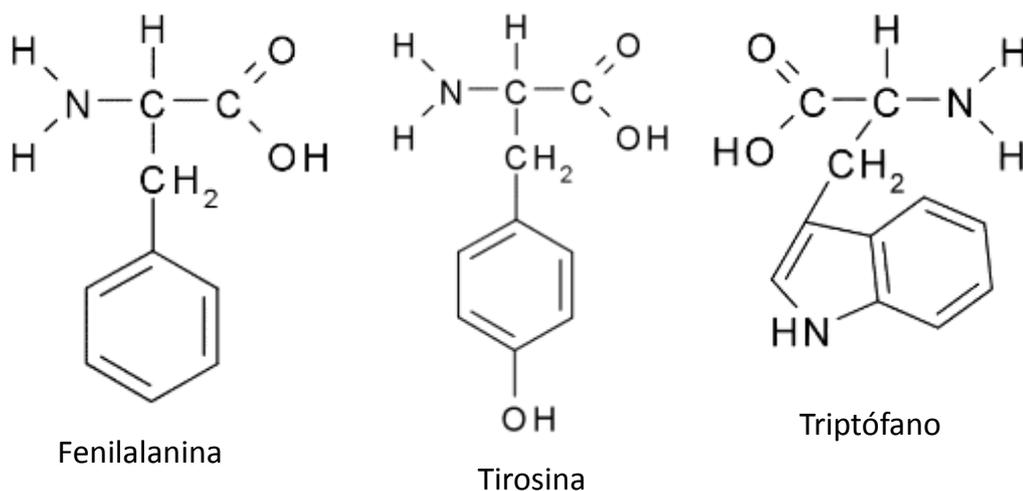
Son variadas las aplicaciones que se encuentran en la literatura concernientes al análisis espectroscópico de diversos analitos alimentarios, entre ellas algunas usan un formato de lectura en micropozos a fin de aprovechar algunas de sus ventajas.

4.1 Cuantificación de proteínas mediante lecturas en el rango ultravioleta.

Kreusch et al, (2003) reportan un estudio comparativo de los métodos para la cuantificación de proteína en el rango de 50 – 500 $\mu\text{g/ml}$ con lecturas en volúmenes de 150 μl usando un lector de micro pozos en la zona ultravioleta, a 205, 215 y 280 nm, basado en la absorción intrínseca utilizando un SPECTRA max PLUS de Molecular Devices, GMI Inc. Cuando se usa BSA como estándar se obtienen resultados con diferentes niveles de variabilidad para diferentes proteínas, siendo ésta la más alta a 280 nm donde la variabilidad fue mayor del 50%. Se ha reportado que la absorción de las proteínas a 280nm se debe principalmente a la presencia de Trp, Phe y Tyr (Chang, 2010). Kreusch et al. (2003) reportan a 280 nm las mayores variabilidades en los coeficientes de extinción en diferentes proteínas tales como Hemoglobina, BSA, Quimio tripsina y Lisozima debido principalmente al contenido variable de estos aminoácidos en cada una de ellas; asimismo, estos autores señalan que las lecturas de absorbancia a 205 nm son las más altas y varían menos debido ya que a esta longitud de onda la absorbancia de los enlaces peptídicos es más importante que la de los aminoácidos aromáticos, ver figura 24; por lo que no son necesarias las curvas de calibración para cada proteína con su proteína

específica. Sin embargo cuando se trabaja a estas longitudes tan bajas, se tiene que tener en cuenta la eliminación de una serie de posibles interferencias tales como una variedad de sustancias provenientes de los búferes y de los detergentes, las que se recomiendan sean eliminadas mediante diálisis previa al análisis. Existen dispositivos que permiten dializar las muestras dentro de los mismos micropozos. Asimismo hay que tener en cuenta, la posible presencia de señales interferentes debido a los ácidos nucleicos. Por ello se recomienda hacer la determinación de los coeficientes de absorptividad de la proteína de acuerdo con la siguiente ecuación: $\epsilon_{205\text{calc}} = 27 + 120 * (A_{280}/A_{205}) \text{ ml/ (mg X cm)}$. Estos autores sugieren hacer las determinaciones a 205nm pero trabajando a dos concentraciones diferentes, la posibilidad de usar un formato de lector de micropozos les permitió reducir los tamaños de muestras hasta valores entre 75 y 60 μl trabajando en placas de micropozos de 96 y 384 pocillos.

Figura 24. Aminoácidos aromáticos.



Fuente: <http://www.salood.com/la-fenilalanina/>
<http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Tyrosine>.

http://www.explicatorium.com/quimica/Aminoacido_Triptofano.php

Biotek® en su nota de aplicación, señala la importancia de la medición de la absorbancia a 240 nm en la detección de impurezas debido a

reactivos comunes tales como SDS o EDTA, señalando que en cantidades trazas estas impurezas no se pueden distinguir con la razón A 260/A280 que usan. (Biotek, 2006a)

4.2 Cuantificación de Carbohidratos.

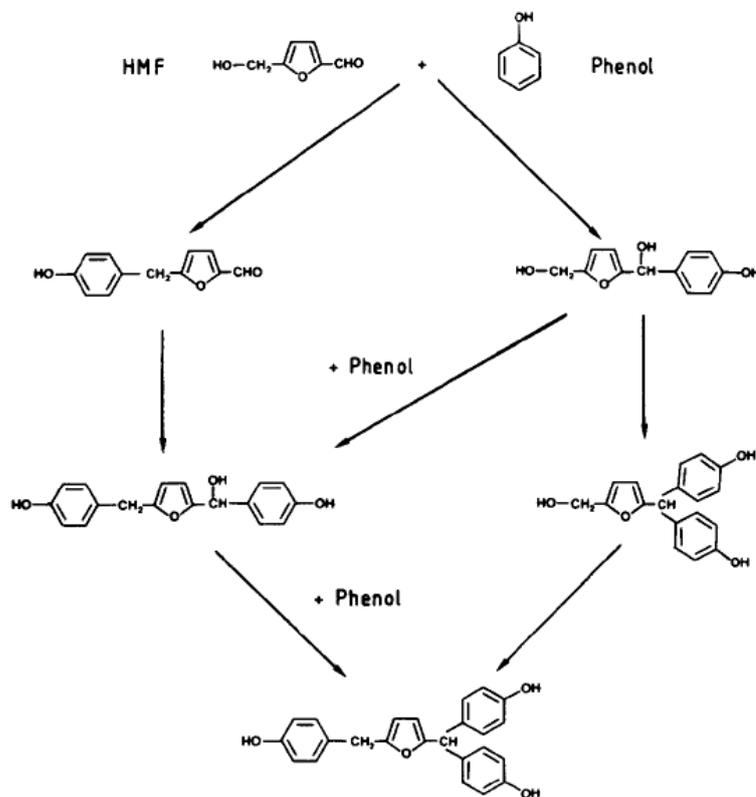
BeMiller, JN (2010) reporta el método de AOAC Método 44.1.30, basado en la reacción debida al calor y al ácido, que implica una deshidratación inicial de los azúcares seguida de formación de furanos y color al formar éstos condensaciones con fenol. Este color generalmente se mide a 490 nm. Asimismo reporta que los furanos formados podrían ser por ejemplo el Furfural y el Hidroximetilfurfural, derivados de pentosas, ácidos hexurónicos, hexosas, 6- deoxihexosas y ketohexosas.

Casi todos los azúcares se pueden determinar por este método, incluso los oligosacáridos y los polisacáridos ya que ellos sufren hidrólisis liberando monosacáridos en la presencia de ácidos fuertes y calor. Se reporta sin embargo que estas reacciones no son estequiométricas, el avance de la reacción es dependiente de la estructura del azúcar por lo que *BeMiller, JN (2010)* recomienda hacer una curva de calibración para cada tipo de azúcar y en caso de mezclas de azúcar hacer la curva con una combinación de azúcares muy parecida en proporción a los existentes en la muestra. Ver figura 25.

Recientemente se ha reportado una modificación de este método para ser trabajado en formato de micropozos donde Masuko, et al., (2005) reportan una metodología en la que se ha podido obtener una excelente sensibilidad en el rango de 1–150 nmol para Manosa. El poder trabajar esta metodología en formato de micropozos, ofrece la ventaja de poder analizar varias muestras simultáneamente como cuando se necesita estudiar las diferentes fracciones de separaciones cromatográficas. Según estos autores los mejores resultados se consiguieron con el siguiente procedimiento para una placa de 96 micropozos: 50 µl de muestra en cada

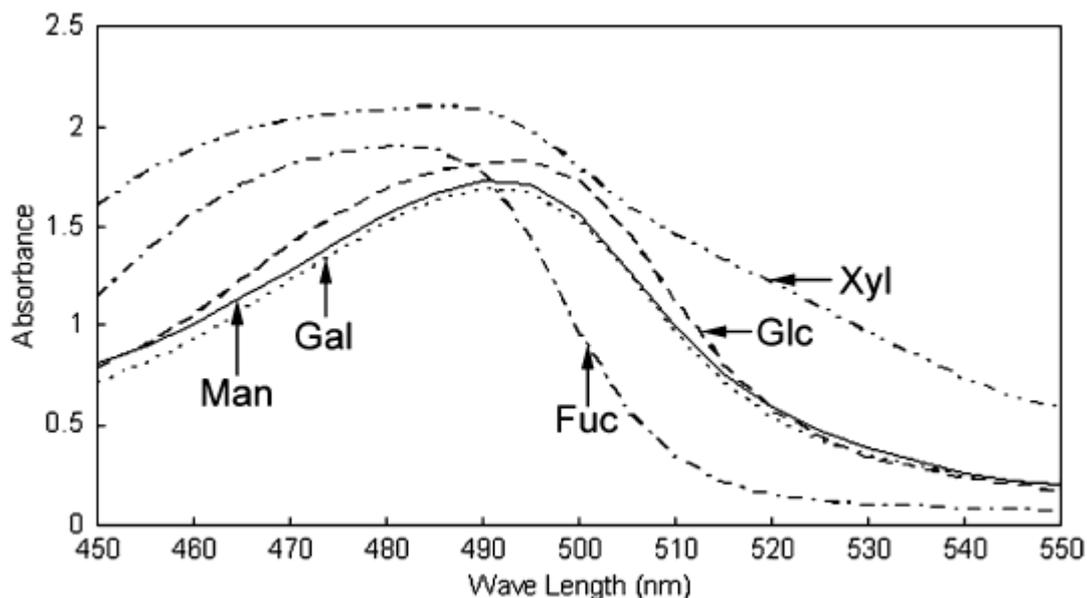
micropozo (concentración aproximada 100 nmol/pocillo), adicionar luego rápidamente 150 µl de ácido sulfúrico concentrado tratando que se consiga una máximo mezclado y seguido de 30 µl de una solución de fenol en agua al 5%, colocar la placa a incubar a 90°C por 5 minutos en un baño de agua haciendo flotar la placa cuidadosamente. Colocar la placa a enfriar a temperatura ambiente y hacer las lecturas de absorbancia a 490 nm en un lector de micropozos. Todo el ensayo toma menos de 15 minutos según los autores. Hacer curva de calibración para Manosa u otros azúcares en el rango de 1 -150 nmol /pocillo.

Figura 25. Posibles reacciones de condensación entre el Fenol y el HMF, según (Koch y Pein, 1985)



. HMF: Hidroximetilfurfural

Figura 26. Máximas absorbancias de los polímeros coloreados para diferentes azúcares experimentados por (Masuko, *et al.*, 2005)



4.3 Oxidación de β -caroteno.

Pedroche, et al.,(2006) reporta un método para monitorear la oxidación de β -caroteno en formato de micropozos. El protocolo en breve consiste en preparar una solución de 4 mg de β -caroteno en 1 ml de cloroformo. Después de la adición de 1 ml de Tween 20, el cloroformo es evaporado bajo nitrógeno y luego alícuotas de esta solución son disueltas en 100 mM pH 7.4 buffer fosfato (Concentración de cada una de estas alícuotas = 119 μ M) y son mezcladas con diferentes concentraciones de las sustancias que se desea evaluar por su efecto oxidante y antioxidante en otras, por ejemplo reporta que para algunas proteínas se dejaron incubar por 30 minutos en un volumen total de 250 μ l, monitoreando la degradación del caroteno, por disminución de la absorbancia a 470 nm. Megias et al., (2009) reportan su uso en el estudio de las propiedades antioxidantes de

hidrolizados proteicos de semillas de girasol, donde usaron β -caroteno 119 μM y Cu^{++} (0.1 μM) en un volumen final de 200 μl .

4.4 Aminoácidos libres en Quesos.

(Yvon y Rijnen, 2001). La cuantificación de los aminoácidos libres durante la maduración del queso (ver figura 27) puede ser utilizada para estimar el nivel de proteólisis y otras reacciones asociadas conducentes a una mejora en el sabor y en la textura del producto. Esta asociación entre formación de aminoácidos libres y maduración ha sido también encontrada significativa para el caso del queso de cabra, obtenido tanto de leche pasteurizada como no pasteurizada. (Psoni, *et al.*, 2006) Se ha reportado la transformación de varios aminoácidos en compuestos de sabor por diversos microorganismos.

Diferentes esquemas metodológicos se han probado para estimar el grado de proteólisis en quesos a fin de estimar su impacto en el sabor y la textura de los quesos (ver figura 28). Sousa, *et al.*, (2001) reportan que el fenómeno proteolítico es complejo en la medida que depende de la actividad enzimática residual de la renina, enzimas endógenas de la leche, de los microorganismos de los cultivos iniciadores y también de aquellos provenientes de la flora natural y de la flora secundaria (algunos hongos y bacterias tipo *Propionibacterium sp.*).

Reps, *et al.*,(2005) señalan que la degradación proteolítica del queso continúa incluso durante el almacenamiento en congelación de los mismos. Asimismo la degradación proteica genera el aumento de grupos NH_2 libres los que incrementan el pH del queso. Ollikainen, (1993) reporta un método rápido que utiliza la titulación para estimar en tres minutos el nivel de maduración de los quesos Suizos hechos en Finlandia.

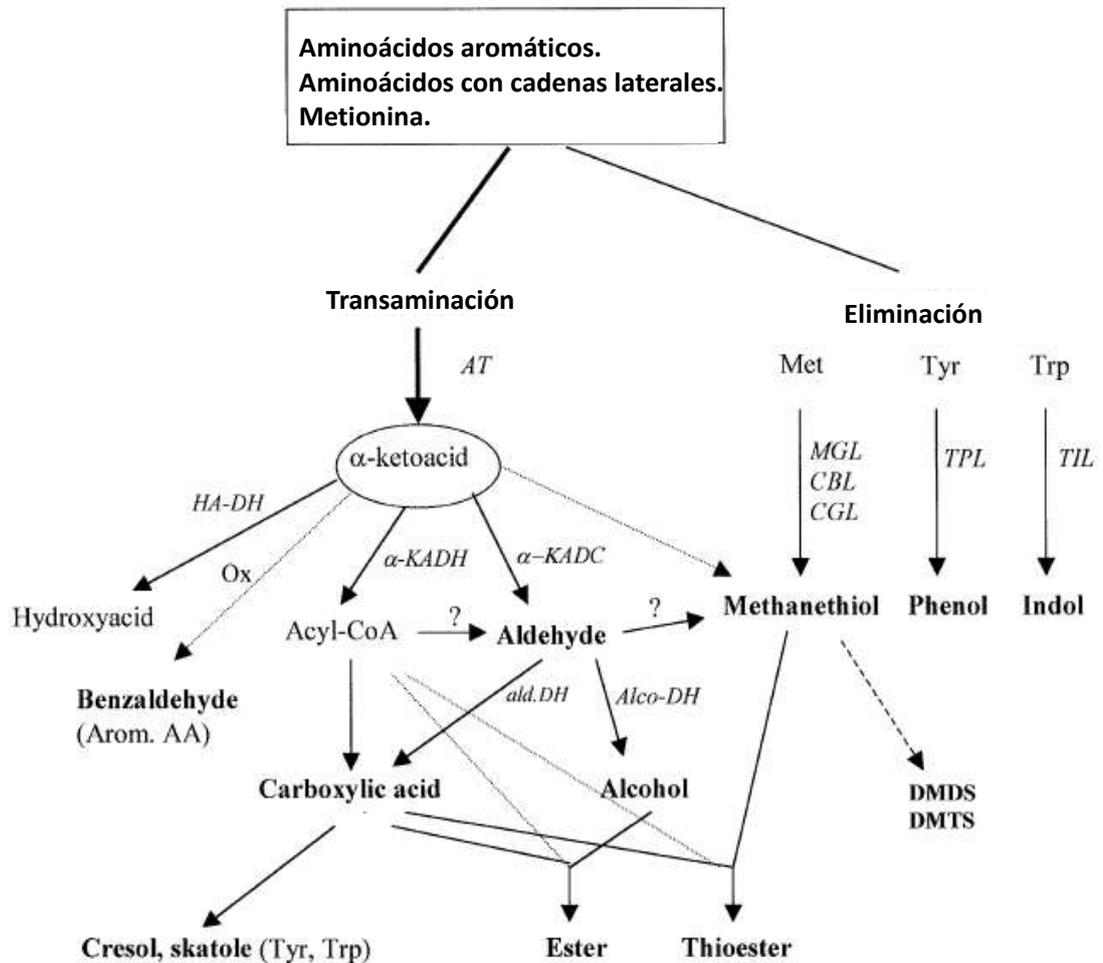
4.5 Medición de los aminoácidos libres

Baer, et al., (1996) describe un método para estimar aminoácidos libres por colorimetría en queso Suizo, utilizando Nihidrina en lector de micropozos. Señala que este método es adaptado de uno que ya se usa para el queso Cheddar. Aunque señala que los valores obtenidos son 15- 20% menores que los que se obtendrían con un HPLC, la metodología se podría emplear en estudios de monitoreo. Brevemente el método consiste en lo siguiente: 2.5 g de queso son prensados y adicionados a un vaso conteniendo 50 ml de citrato tri-sódico 68mmol/ L y 3mmol/L de ázida de sodio, luego sigue la homogenización a 15,000 rpm por 1 min luego de lo cual, con una cuchara, se retira la capa de grasa liberada. Se toma un alícuota de 2ml y se centrifuga a 7900 \times g por 10 min por ejemplo en *Eppendorfs*, el supernadante obtenido es diluido con el citrato trisódico hasta el nivel necesario para obtener una buena lectura de absorbancia (e.g. diluir 40 veces). En algunos casos la muestra se precipita con etanol 96° (dos volúmenes de muestra: un volumen de etanol) durante una hora de reposo a temperatura ambiente seguida de centrifugación por 10 min a 7900g. Por otro lado (0.8 g) Cd-ninhidrina son disueltos en 80 mL de etanol absoluto. Luego son mezclados con ácido acético glacial 10 ml y CdCl₂ (1 g disueltos en 1 ml agua). La solución es almacenada con protección de luz.

Siguiendo el procedimiento de Baer, et al., (1996), 100 μ L de la muestra, son mezclados con 200 μ L agua en un microtubo; luego se adicionan 600 μ L de la solución de Cd-ninhidrin y la mezcla se somete a calentamiento por 84°C durante 5 min, luego se enfría y se centrifuga a 17,000 \times g por 10 min. Se adicionan 200 μ L de esta mezcla a cada micropozo y la misma cantidad se usa para los blancos. Luego se adicionan 300 μ L Cd-ninhidrina y 300 μ L de agua a las muestras y a los estándares.

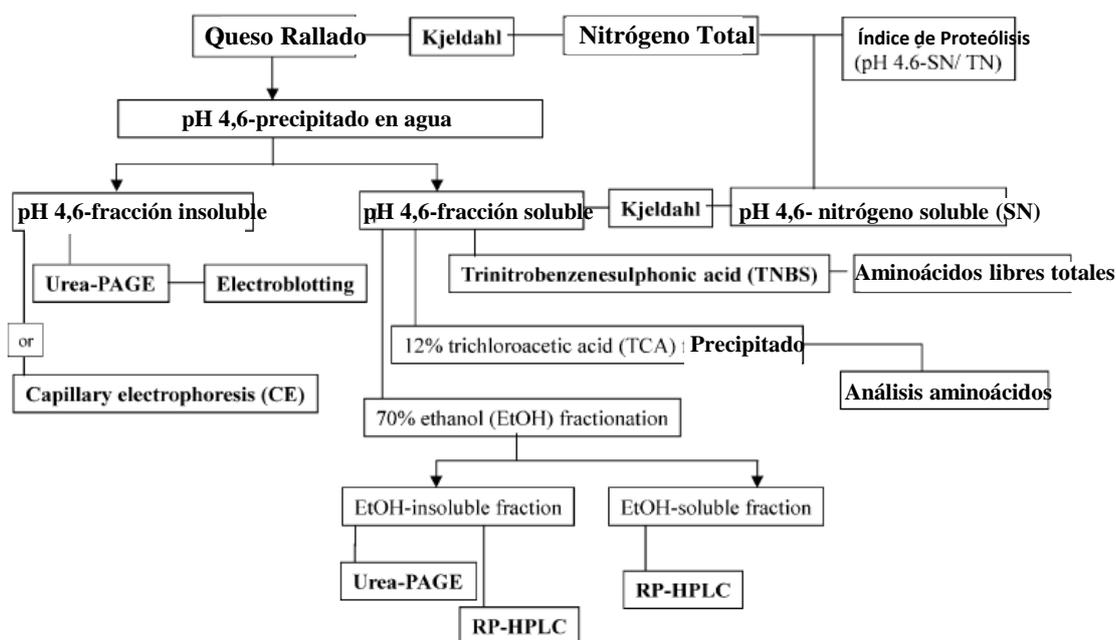
Usar como estándar, 0.6 mmol/L leucina. Realizar los análisis con duplicados y leer a 490 nm.

Figura 27: Rutas catabólicas de aminoácidos encontradas en diferentes microorganismos utilizados en la producción de quesos. Según (Yvon y Rijnen, 2001)



Dónde: DMDS, Dimetilsulfuro; DMTS, Dimetiltrisulfuro; AT, aminotransferasa; HA-DH, Hidroxiácido dehidrogenasa; α -KADC, α -ketoácido decarboxilasa; ald.DH, aldehído deshidrogenasa; Alco-DH, alcohol deshidrogenasa; MGL, metionina γ -liasa; CGL, cistationina γ -liasa; CBL, cistationina β -liasa; TPL, tirosina-fenol liasa; TIL, tríptofano-indol liasa; ox, oxidación.

Figura 28: Resumen de algunos de los métodos analíticos utilizados en el estudio de la proteólisis de los quesos durante la maduración, según Sousa et. al. (2001)



Dónde: RP-HPLC = HPLC de fase reversa. EtOH= Alcohol etílico. Urea-PAGE= electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando Urea como agente desnaturizante. CE= Electroforesis de capilares. Electroblotting= electrotransferencia por adsorción sobre una membrana de nitrocelulosa u otro desde un gel de electroforesis.

4.6 Aplicaciones Prácticas

4.6.1 Ensayo total de Proteína “Método Bradford”

El siguiente procedimiento está diseñado para concentraciones de muestra muy pequeñas, generalmente las que se encuentran en los lisados celulares. Por ejemplo podría ser después de que estas células han sido expuestas a un tratamiento con compuestos bioactivos extraídos de los

alimentos. Este método también es una etapa previa para realizar un Western Blotting con lo cual se podrían identificar los compuestos moleculares de interés.

El método se fundamenta en una determinación colorimétrica del color a 595 nm, donde ante la presencia de la proteína el colorante llamado Coomassie Azul Brillante G-250 es enlazado a las proteínas presentes por los residuos aminocídicos básicos y aromáticos; principalmente residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina, donde Ver figura 29.

Gallardo, J. reporta que basado en (Bradford, 1976), el reactivo colorante para esta reacción se puede preparar alternativamente de la siguiente manera:

- 10 mg de azul de coomassie G-250 (Pierce ChemicalTM).
- 5 mL de metanol.
- Filtrar en un filtro de fibra de vidrio.
- 10 mL de ácido fosfórico concentrado (H₃PO₄ 85%).
- Aforar a 20 mL con agua destilada.

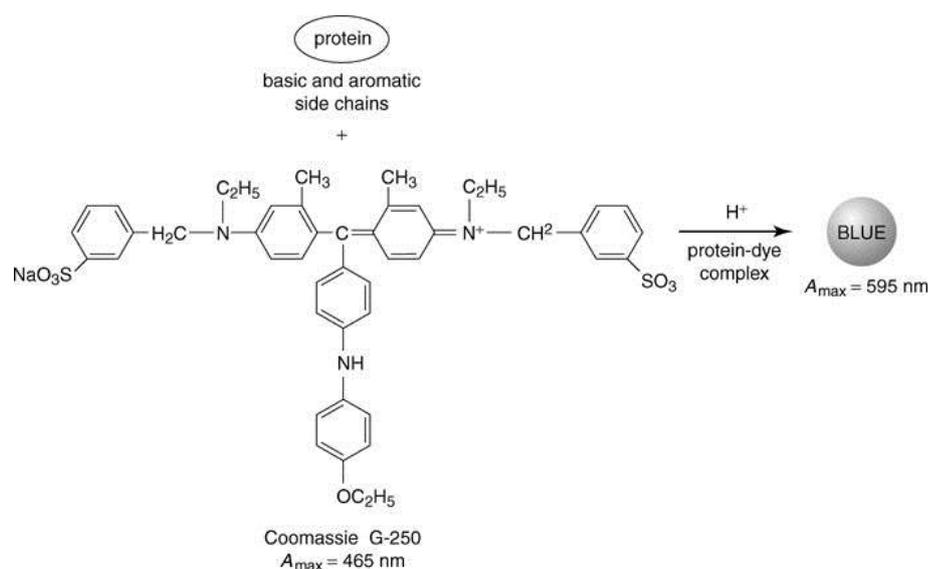
Describe que la solución a obtener es de color rojiza oscura que es estable indefinidamente en botella ámbar y a 4 ° C.

Olson y Markwell (2001) reportan la mayor sensibilidad de los residuos de arginina (sensibilidad ocho veces mayor que la de los otros residuos), debido a ello recomiendan que en los casos de las muestras ricas en arginina se use un estándar diferente y rico en arginina (ejemplo Histona). Existen algunas proteínas que son invisibles para este ensayo, entre ellas la enzima tripsina. Debido a requerir muy pocos reactivos, rapidez y facilidad, es una prueba muy usada para hacer investigación dentro de la industria.

4.6.1.1 Reactivos y materiales:

- Agua Nanopura (Pureza: 18.2 MΩ-cm, nivel de pureza recomendado para cultivo de tejidos y cromatografía). Dependiendo de las necesidades del laboratorio se puede usar agua de laboratorio tipo II apropiada para espectrofotometría.
- BSA (Albúmina de Suero Bovino) concentración (200 µg/mL) en 0.15 M ClNa o en agua nanopura.
- Reactivo de Ensayo Proteico BioRad® (Número de Catálogo: 500 – 0006)
- Placa de 96 micropozos.

Figura 29: Coomassie Azul Brillante G-250



Fuente: (Krohn, 2001)

4.6.1.2 Preparación de la curva estándar.

- Se realiza la curva estándar partiendo de una solución madre de BSA (Bradford, 1976).

- De esta dilución colocar diferentes cantidades en los micropozos tal como se indica más abajo en el esquema de placa.
- El rango de linealidad de las concentraciones de los estándares se encuentra en el rango de 1.25 – 25 µg/ml (trabajando con bajas concentraciones de proteína), cuando las lecturas de absorbancia son realizadas en un formato de micropozos en un volumen por muestra de 100 µl. Para más altas concentraciones el rango es (0.2-1.5 mg/ml) ver manual de BioRad® (discover.bio-rad.com), los que comercializan incluso kits con un menor precio para ser usados solamente con fines educativos.
- Diluir 1 ml de solución BioRad para ensayo de Proteína® (Bio rad) en 4 ml de agua. Adicionar 200µL de la dilución acuosa del reactivo de Bradford en cada micropozo.

Figura 30. Posible distribución de estándares y muestras en una placa de micropozos.

Cantidades en µl de
5 µl en
Standard de BSA a agregar

M_i: Muestras (Adicional
cada micropozo)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	M ₁	M ₃	M ₅	M ₇	M ₉	M ₁₁	M ₁₃	M ₁₅	M ₁₇	M ₁₉
B	2	2	M ₁	M ₃	M ₅	M ₇	M ₉	M ₁₁	M ₁₃	M ₁₅	M ₁₇	M ₁₉
C	3	3	M ₁	M ₃	M ₅	M ₇	M ₉	M ₁₁	M ₁₃	M ₁₅	M ₁₇	M ₁₉
D	4	4	M ₂	M ₄	M ₆	M ₈	M ₁₀	M ₁₂	M ₁₄	M ₁₆	M ₁₈	M ₂₀
E	5	5	M ₂	M ₄	M ₆	M ₈	M ₁₀	M ₁₂	M ₁₄	M ₁₆	M ₁₈	M ₂₀
F	7.5	7.5	M ₂	M ₄	M ₆	M ₈	M ₁₀	M ₁₂	M ₁₄	M ₁₆	M ₁₈	M ₂₀
G	10	10	M ₂₁	M ₂₁	M ₂₂	M ₂₃	M ₂₄	M ₂₄	M ₂₅	M ₂₆	M ₂₆	M ₂₇
H	12.5	12.5	M ₂₁	M ₂₂	M ₂₂	M ₂₃	M ₂₄	M ₂₅	M ₂₅	M ₂₆	M ₂₇	M ₂₇

- Las Muestras diluidas lo suficiente para encontrarse en una concentración proteica en el rango lineal de la curva de estándares es colocada en los micropozos por triplicado. (Cantidad

recomendada 5µl en cada micropozo) Cuando se trabaja con células lisadas las diluciones frecuentes son 1:20 o 2:40 (Solución de Células lisadas: Agua nanopura)

4.6.1.3 *Leer la Absorbancia.*

En el lector de micropozos se deberá programar el equipo para realizar las lecturas de absorbancia a longitudes de onda en 595 nm. El tiempo de incubación mínimo es de 5 minutos.

Figura 31. Colores aproximados de la reacción.



Fuente: tomado de,
http://cRNAegiescience.edu/first_light_case/horn/PROTsite/bradford.html

4.6.1.4 *Cálculo de la concentración proteica.*

Se podría recurrir a una hoja de cálculo para calcular el promedio de los triplicados de lecturas de absorbancia, para posteriormente graficar estos valores en las ordenadas vs los valores correspondientes de concentración de los estándares de BSA en las abscisas. Hacer correlación lineal y hallar fórmula. Asegurarse antes de empezar a trabajar que el coeficiente r^2 es un valor alto > 0.99 . Las concentraciones en µg/mL de los estándares de BSA, cuando se dispone los volúmenes indicados de estándar por micropozo como se indica en la figura 32 son:

Figura 32. Concentraciones en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA en cada uno de los micropozos (A-H) donde se colocó los volúmenes de estándares indicados en la Figura 30.

	1	2	3... 12	...
A	0	0	...	
B	.4	.4	...	
C	.6	.6	...	
D	.8	.8	...	
E	1.0	1.0	...	
F	1.5	1.5	...	
G	2.2	2.2	...	
H	2.5	2.5	...	

Ejemplo:

“Cálculo de las concentraciones proteicas en extracto células lisadas”. Ensayo realizado por la autora utilizando el Bio Rad Protein Assay Dye Reagent®, en el laboratorio de Suzanne Talcott (Instituto de Nutrición y Obesidad, Texas A&M University), solo con fines demostrativos para análisis de proteína.

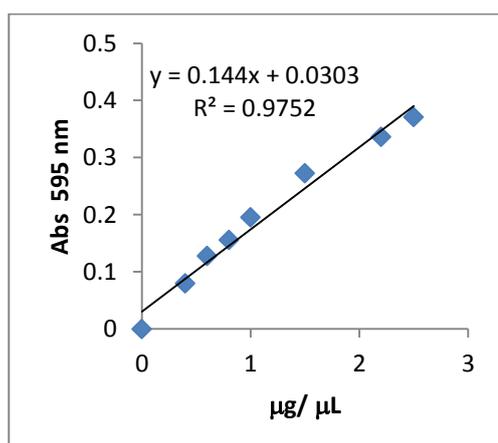
Se procedió a leer una placa similar a la reportada en la Figura 30. En este caso particular, se pudo observar que cuando la curva de calibración se realiza con los valores estándares hasta $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. es decir adicionando volúmenes de hasta $7.5 \mu\text{l}$ de solución BSA, se obtiene una curva de calibración con un r^2 alto. Figura 33 B, Sin embargo cuando se trabaja con valores estándares hasta $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. es decir adicionando volúmenes mayores de $10 - 12.5 \mu\text{l}$ de solución BSA (volúmenes mucho mayores de $5 \mu\text{l}$) y sin hacer los ajustes de reducción de éste volumen a los de $200\mu\text{L}$ del reactivo de Bradford a adicionar a todos los micropozos; se observa que la curva de calibración disminuye r^2 ; a valores menor a 0.99 Figura 33 A, es decir un valor de correlación menor al recomendado para determinaciones analíticas, según AOAC International (2002). Debido a ello, se debe recordar cómo

se explicó en el capítulo III sección 3.3 que es importante el mantener el volumen constante dentro de un micropozos para uniformizar el paso de la luz y por lo tanto disminuir la variabilidad.

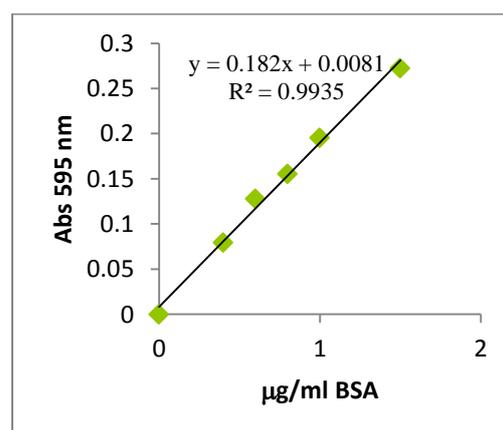
Asimismo, para determinaciones analíticas se recomienda no sólo un alto valor r^2 como el indicado arriba, si no también que las curvas de calibración construidas en un determinado laboratorio sean repetibles en momentos y días diferentes. (AOAC International, 2003).

Figura 33. Gráfico de los valores de Absorbancia obtenidos en Lector de Placas de la Figura 30

A Usando volúmenes de estándares hasta 12.5. μL



B. Usando volúmenes de estándares hasta 7.5 μL



Valore calculados con Curva B:

	Abs 595 nm	Factor Dilucion	Concentración Proteína $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Lectura promedio de control menos valor blanco	0.1075	20	10.923
Lectura promedio de tratamiento X menos valor blanco	0.222	20	23.285

4.6.2. Ensayo de Fenólicos Totales en formato de micropozos

El siguiente procedimiento realizado está basado en la reacción del Folin-Ciocalteu con los fenólicos, asociada a la capacidad reductora de estos últimos. En un pH alcalino, se ha descrito una transferencia de electrones de las sustancias reductoras sean estas de naturaleza fenólica o no hacia los ingredientes activos (ácido Molibdico / Fosfotungstico hexavalente) Se observa la formación de un complejo coloreado donde estos metales ahora presentan una menor valencia.

Sigma – Aldrich (2010) menciona en su ficha técnica para el reactivo Folin & Ciocalteu's phenol (Número de catálogo F9256) que su preparación implica disolver 10 g de Tungstato de sodio y 2.5 g de molibdato sódico en 70 ml de agua. Adicionar 5 ml de ácido fosfórico al 85% y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado. Hacer reflujo por 10 horas. Adicionar 15 g de sulfato de Litio, 5 ml de agua y una gota de Bromo. Hacer reflujo por 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a un volumen de 100 ml con agua. De esta manera se forma el complejo hexavalente de ácido fosfomolibdico/ fosfotungstico.

Figura 34. Estructuras del Ácido Molibdico Fosfotungstico hexavalente formadas en solución (Reactivo de Folin-Ciocalteu).

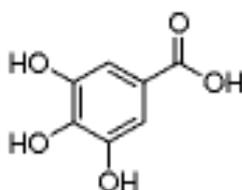


4.6.2. 1. Posibles interferencias.

Este ensayo es afectado por todas las sustancias reductoras que se encuentren en las muestras, por ejemplo (Waterhouse, 2001) menciona que

para el caso de muestras de vino, las interferencias causadas por azúcares reductores tales como la glucosa y fructosa son menores pero deben ser corregidas, el ascorbato, también reporta interferencias, mientras que las interferencias debido a la presencia del bisulfito son consideradas importantes para el caso de los vinos blancos con bajo contenido de fenólicos.

Figure 35. Estructura del ácido Gálico, sustancia fenólica usada como estándar en la determinación de Fenólicos.



Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com>

4.6.2.2. Reactivos Químicos:

- Muestras de extractos de Fenólicos de alimentos vegetales, previamente purificados y sin ningún componente insoluble.
- Agua Nanopura. (Pureza: 18.2 M²-cm, nivel de pureza recomendado para cultivo de tejidos y cromatografía). Dependiendo de las necesidades del laboratorio se puede usar agua de laboratorio tipo II apropiada para espectrofotometría.
- Reactivo concentrado (2N) de Folin Ciocalteau Phenol Reagent. En la presente experiencia se utilizó el reactivo de MP biomedical (<http://www.mpbio.com/>) Cat N° 195186 (diluir 125 ml a 1 litro)
- Solución de Carbonato de Sodio. (1N) Disolver 105.99g Na₂CO₃ en 800ml agua y luego aforar a un litro.
- Los estándares de ácido Gálico son los más comunes (miligramos de equivalentes de ácido gallico (GAE) por litro), otro estándar bastante

usado es (+)-catequin (mg CtE/lit) (Singleton, *et al.*, 1999). (Los extractos metanólicos permiten estudiar las muestras con antocianinas, mientras que los extractos con metil acetato, permite estudiarlos sin las antocianinas. Los extractos son purificados con cartuchos de extracción fase sólida C-18).

- Tubos de plástico de 5 ml.
- Placa de micropozos de 96

4.6.2.3. Preparación de la curva estándar y análisis de las muestras.

- Se realiza la curva estándar partiendo de una solución stock de ácido Gálico de 2000 ppm y se hacen las diluciones con agua destilada. En una fiola de 100 ml disolver 0.5 g de ácido gálico seco en 10 ml de etanol y llevar a volumen con agua nanopura. Se puede almacenar en congelación en tubos ependorf de 1.5 ml y en concentraciones de 2000 ppm.
- Las concentraciones de los estándares a preparar se encuentran en el rango de 100 – 2000 ppm ($\mu\text{g}/\text{m}$): 2000, 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200 ppm. Se analizan por triplicado.
- Las Muestra (Extractos vegetales purificados de fenólicos) dependiendo de su concentración, son diluidas (dilución recomendada: 1/ 200) y analizadas por triplicado.
- Procedimiento
 - Adicionar 50 μL de los extractos diluidos (pH 3 a los tubos de plástico)
 - Adicionar 0.5 ml de 0.25N Folin-Ciocalteau (amarillo) y agitar
 - Dejar reposar 3 minutos.
 - Adicionar 0.5 ml de 1N Carbonato de Sodio (incolore) y agitar
 - Dejar reposar 7 minutos.

- Adicionar 3.5 ml de agua y agitar
- Dejar reposar 20 minutos, en caso de aparecer precipitado centrifugar antes de hacer la lectura espectrofotométrica.

4.6.2.4. Leer la Absorbancia.

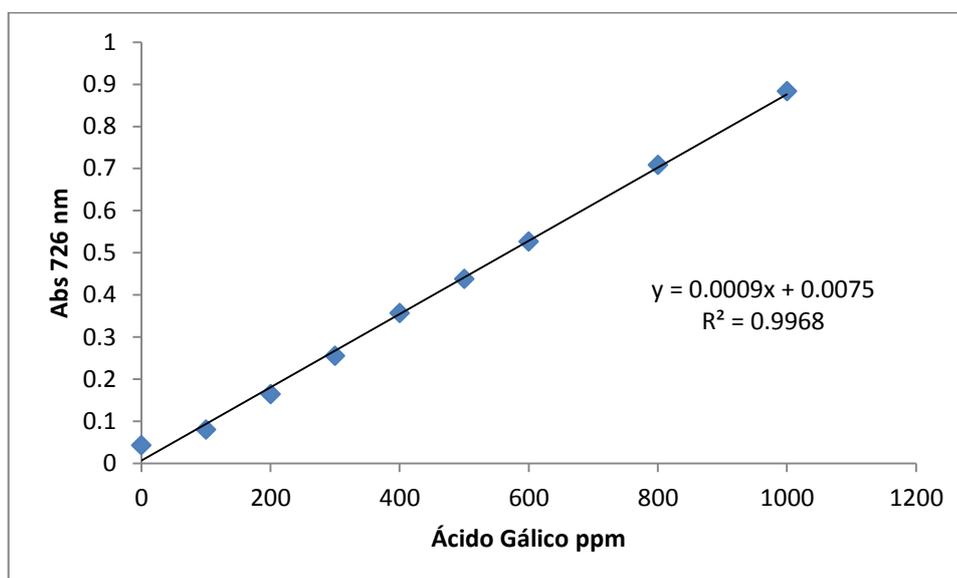
- Con una micropipeta colocar cuidadosamente y sin agitar 200 μ l del líquido superficial en uno de los micropozos de la placa.
- Después de colocar todas las muestras. Programar el Lector de placas para leer dicho volumen a una longitud de onda de 726 nm en los pocillos donde están depositadas las muestras y los estándares.

4.6.2.5 Cálculo de la concentración de Fenólicos.

Los promedios de las lecturas de absorbancia son ploteadas en el eje de las ordenadas y los valores correspondientes a concentración en ppm de los estándares de ácido gálico en las abscisas. Hacer correlación lineal y hallar fórmula. Se recomienda un r^2 alto. Recomendado ≥ 0.99 (AOAC International, 2002).

Ejemplo: En la Figura 36 se muestran las curvas utilizadas en el cálculo de las concentraciones de fenólicos totales en un extracto de Caupí. *Ensayo realizado por la autora utilizando el método de Folling – Ciocalteau en el laboratorio de Suzanne Talcott (Instituto de Nutrición y Obesidad, Texas A&M University).*

Figura 36. Ploteo de los valores de Absorbancia obtenidos en Lector de Placas.



	Abs 726 nm.	Factor Dilución	Concentración como μg Acido Gálico/ ml extracto concentrado recibido
Lectura promedio de extracto fenólico de Caupí	0.330	200	71740.7

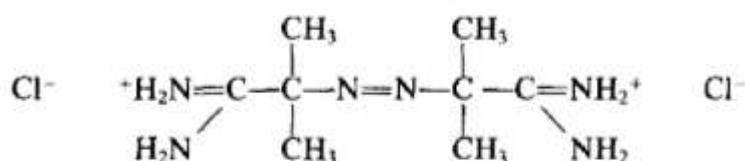
4.6.3 Determinación de la capacidad de absorción de especies radicales libres de oxígeno (ORAC) en formato de micropozos.

El siguiente procedimiento es muy utilizado en alimentos para la determinación de la capacidad que tienen algunos extractos alimenticios para absorber o neutralizar diferentes radicales de oxígeno. El ensayo de ORAC mide la inhibición del declive en las lecturas de fluorescencia inducido por AAPH (generador de sustancias peróxido) (Ver Figura 40) en sustancias fluorescentes tales como como la Ficoeritrina (Cao y Prior, 1999) (excitación 540 nm, Emisión: 565 nm) o Fluoresceína. (Exitación:

485nm. Emisión 520nm.) El método ORAC determina la extensión de la neutralización de dichos radicales libres debido a los alimentos.

A los radicales libres se les atribuye ser la causa de diferentes tipos de alteraciones en los tejidos de los organismos vivos tales como estrés oxidativo en los cromosomas y daños en el DNA. (Anderson, *et al.*, 1994). En matrices complejas, tales como vino, frutas, vegetales y tejidos animales, los diferentes componentes con capacidad antioxidantes, presentan con frecuencia efectos sinérgicos.

Figura 37. Reacciones de fundamento del ensayo: Mecanismo de descomposición térmica del radical AAPH, eficiencia de generación de radicales y reacción con ficoeritrina según (Glazer, 1990)

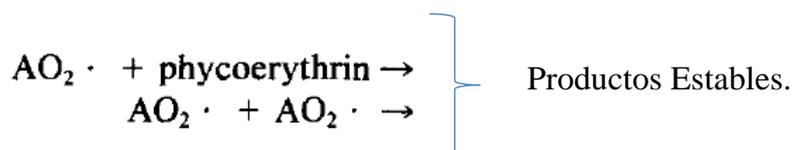
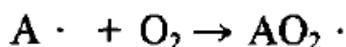


Es representado por: A – N = N – A

Donde “e” la eficiencia de generación de radicales es:



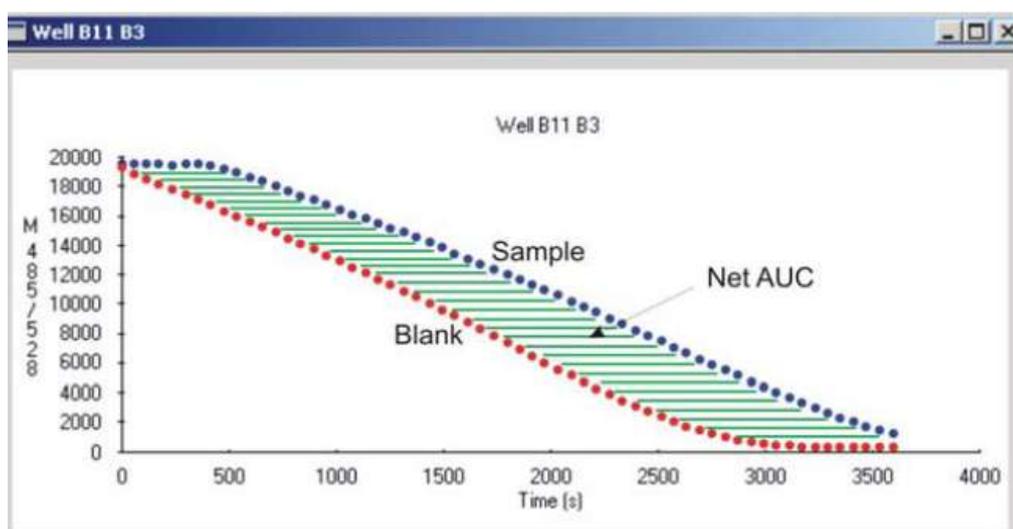
De esta manera:



Este método tiene la ventaja con respecto a los anteriores en que contempla la reacción completa de los radicales libres, al considerar el área bajo la curva de inhibición (Cao y Prior, 1999). Asimismo este tipo de reacción (que implica la transferencia de un átomo de hidrógeno de la

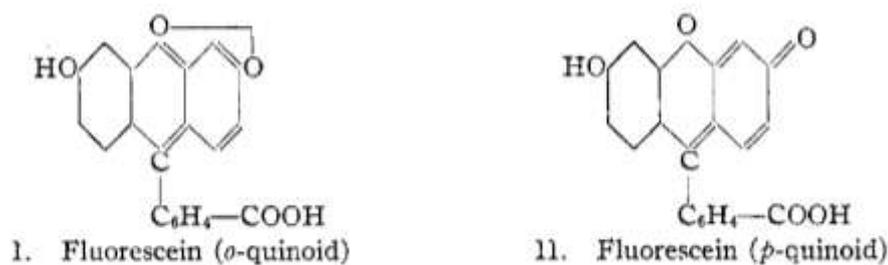
molécula fluorescente al radical) (Ou, *et al.*, 2002) se puede llevar a cabo con otras sustancias fluorescentes tales como la fluoresceína (3',6'-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanthen]-3-one) (Figura 39), con la cual algunos autores han reportados mejores resultados (Ou, *et al.*, 2001). También en tubérculos como la Mashua se ha usado fluoresceína.(Chirinos, *et al.*, 2008).

Figura 38. Curvas de Inhibición. Tomado de la nota de aplicación de Biotek donde se muestra la actividad antioxidante de la muestra expresada en área neta bajo la curva (AUC). En el eje de ordenadas valores de fluorescencia.



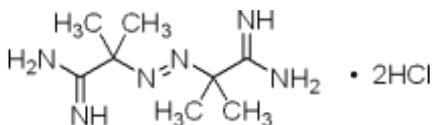
Fuente: Nota de Aplicación Biotek® (Biotek, 2006b).

Figura 39. Fluoresceína.



Fuente: (Orndorff y Hemmer, 1927)

Figura 40. Radical Azobis.



Fuente: (Sigma-Aldrich®, 2010)

4.6.3.1. Procedimiento. “Determinación de la capacidad de absorción de especies radicales libres de oxígeno (ORAC)” ensayado en los laboratorios del Instituto de Diabetes y Obesidad.

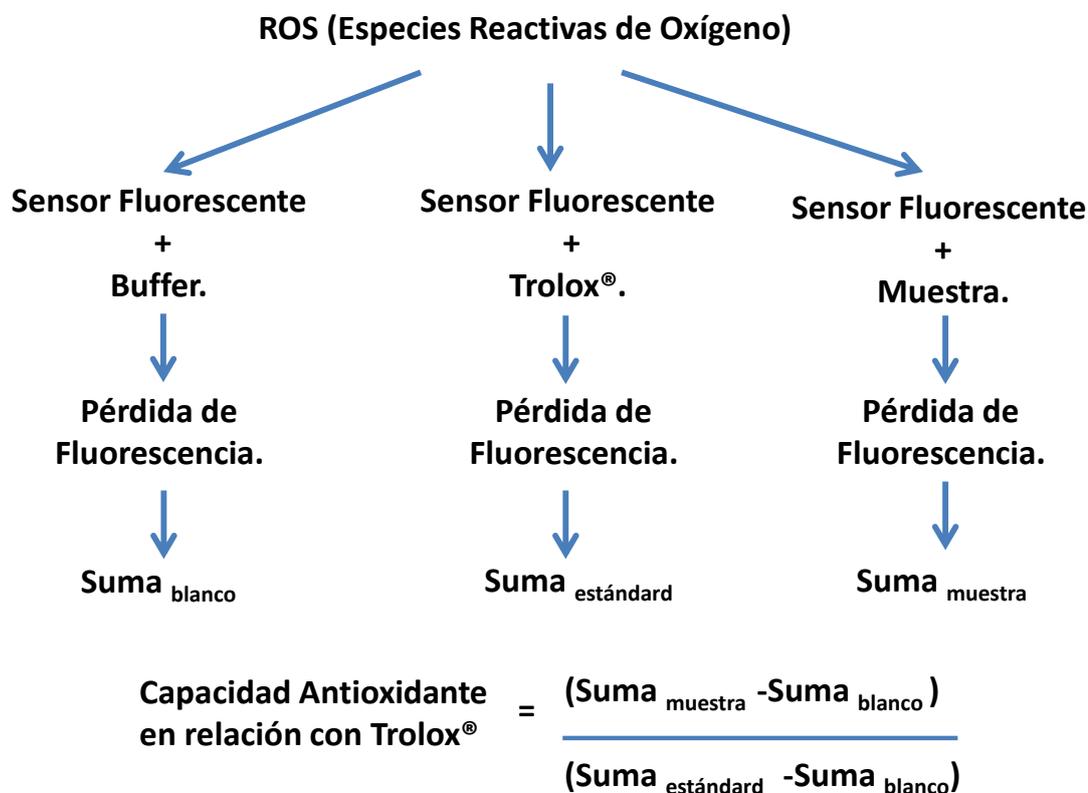
4.6.3.2. Reactivos.

Buffer Fosfato: Preparar 0.75M K_2HPO_4 (FW: 174.2) y 0.75 NaH_2PO_4 (FV: 119.98) en proporción 61.6:38.9, v/v. Diluir este buffer concentrado en proporción 1:10 y ajustar el a pH 7.0. Para ello se puede usar una solución de HCl 4N. (Aproximadamente entre 5 y 10 ml). A fin de evitar la contaminación microbiana de esta solución tampón se puede añadir ázida de sodio (NaN_3) y mantener en refrigeración.

Fluoresceína:

Se preparó y mantuvo en refrigeración una solución 50 mM de Fluoresceína (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA; peso molecular: 332.3) en metanol: Sonicar para disolver y luego diluir a 1000x, con metanol también para obtener una solución 50 μ M. El color debe ser verde neón.

Figura 41. Esquema del procedimiento de ORAC.



Fuente: Nota de Aplicación BMG (Bmg, 2006)

2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH): (Waco chemicals)

Esta sustancia es el generador de radicales, la concentración a usar depende del fluoróforo. Se debe ajustar la concentración de modo que la caída del área bajo la curva no sea tan lenta de modo a que haya espacio para poder visualizar el efecto de inhibición de las sustancias antioxidantes de los alimentos a estudiar.

Generalmente se tienen buenos resultados pesando de 350 a 450 mg y diluirlos en 5 ml de buffer fosfato. (258.12 mM). El reactivo debe ser preparado a los pocos instantes antes de su adición a los micropozos.

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Aldrich Chemicals) PM= 250.29. La solución stock se prepara en buffer fosfato, para lo cual se disuelven 5mg en 100ml. Se puede almacenar en congelación en pequeñas alícuotas. Dura dos meses a -20°C. Hacer diluciones a partir de este estándar de Trolox, con buffer fosfato. Preparar concentraciones de: 0, 12.5, 25, 50, 100 y 200 μM .

Placa de Micropozos. Usar de preferencia una placa negra *Costar* (Corning®) de 96 micropozillos con fondo transparente.

4.6.3.3. ***Posibles interferencias.***

El reactivo Azobis se tiene que adicionar rápidamente debido a la descomposición térmica que empieza a ocurrir de manera inmediata. Se ha reportado un método manual utilizando cubetas de fluorímetro individuales (Cao y Prior, 1999; Zheng y Wang, 2001), sin embargo un lector en formato de micropozos ofrece la ventaja de una mayor rapidez en las lecturas.

4.6.3.4. *Preparación de la curva estándar y análisis de las muestras.*

Procedimiento: En la Figura 42 se representa una posible distribución de muestras, estándares y blancos en una placa negra de fondo transparente. Donde se sigue el procedimiento indicado más abajo.

1. Adicionar 50 μL de los extractos alimenticios diluidos en el buffer fosfato.
2. Adicionar 100 μL de la solución de trabajo de Fluoresceína.
3. Adicionar 50 μL de cada uno de los estándares de Trolox en cada pocillo. (Rango de estándares 0 – 200 μM)
4. Usar como blanco 50 μL de buffer fosfato en el micropozo.

- Hacer una lectura en uno de los blancos con el Fluorímetro para tener un valor base.

Usando un equipo, Fluo Star Omega BMG LabTech. 36 ciclos en total, *cada dos minutos* una lectura de fluorescencia durante 70 minutos.

Programar el equipo para determinar la señal de base para hacer tres ciclos cada 90 segundos de lecturas en uno de los blancos, sólo con la adición de la sustancia fluorescente.

Las condiciones de medidas de fluorescencia para fluoresceína son: (Ex. 485 nm, Em. 520 nm).

Figura 42. Esquema representando posible distribución de muestra blanco y la placa negra de fondo transparente de estándares en 96 micropozos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	B	B	B	B	B
B	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
C	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
D	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
E	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
F	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
G	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
H	B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	B	B	B	B	B

Donde M: indica un pocillo donde se ensaya una de las muestras. Trabajar con las repeticiones necesarias. S: indica unos pocillos donde se ensaya el estándar, en el esquema de abajo se trabajan 6 estándares. B: Blancos e M: indica donde se colocó la muestra.

- Adicionar 50 μL de la solución del radical AAPH en solución buffer lo más rápido posible.
- Iniciar el ciclo de lecturas de Fluorescencia hasta completar 90 minutos.

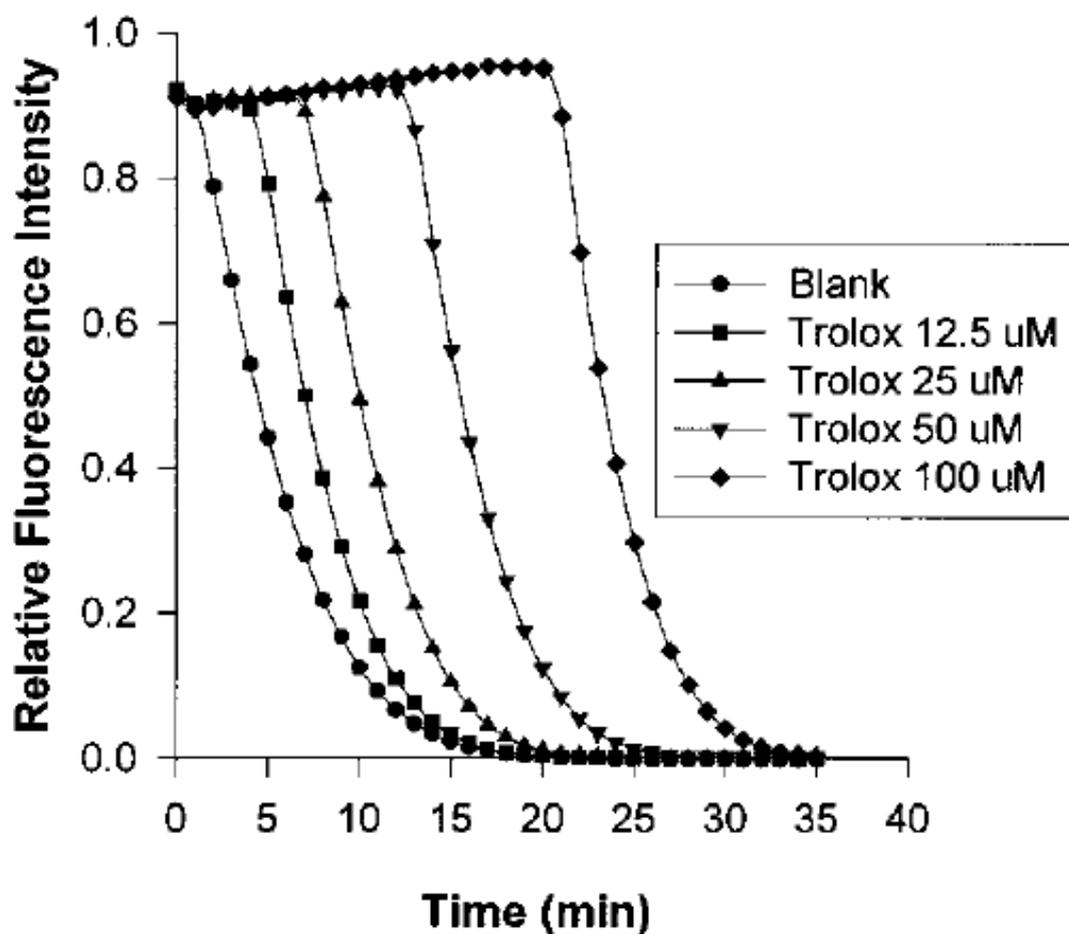
Nota: Algunos investigadores sugieren en sus protocolos, de no utilizar las filas ni las columnas del perímetro de las placas de micropozos. Debido a ello en una placa de 12 x 8 micropozos, todas las muestras, blancos y estándares se distribuyen en sólo 60 micropozos. Ellos asimismo

recomiendan llenar los perímetros con 300 μ l de agua con la finalidad de proporcionar una masa térmica grande. (Biotek, 2006b)

4.6.3.5 Cálculo de la concentración de los valores ORAC.

Con ayuda de una hoja de cálculo en excell® (microsoft, Redmond WA) como lo reporta (Ou, *et al.*, 2001) calcular: de acuerdo a la siguiente fórmula (ver más abajo (1)) reportada por Cao y Prior, (1999) para experimentos con lecturas programadas cada dos minutos (caso presente en esta propuesta metodológica):

Figura 43. Lecturas de Fluorescencia obtenida en las diferentes concentraciones de Trolox comparados con el Blanco.



Fuente: (Ou, *et al.*, 2001)

De esta manera el área bajo la curva: AUC Ver Figura 43

$$AUC = (0.5 + f_2/f_o + f_4/f_o + f_6/f_o + \dots + f_{68}/f_o + f_{70}/f_o) \times 2 \quad (1)$$

f_o = Valor inicial de fluorescencia a los cero minutos.

f_i = Valor de fluorescencia al tiempo i.

Cuando se grafican los valores promedio AUC – Blanco, para las diferentes concentraciones de Trolox se obtiene una curva de tipo lineal como la que se presenta en la Figura 44. Si solo se usa un estándar de 20 μ M de concentración entonces se aplica la siguiente formula: El valor ORAC es expresado como:

$$(\mu\text{M}) = 20 k (AUX_{\text{sample}} - AUX_{\text{blanco}}) / (AUX_{\text{Trolox}} - AUX_{\text{Blanco}}) \quad (2)$$

Fuente: (Cao y Prior, 1999)

Dónde: K: es el factor de dilución de la muestra.

Cuando se usan varios estándares y se tiene una curva de calibración para Trolox tal como se aprecia en la figura 44, entonces se utiliza la ecuación de la curva para identificar la equivalencia en Trolox de acuerdo con el valor AUX que proviene de la muestra.

Figura 44. Curva de calibración de Trolox. Fuente de figura: (Biotek, 2006b) Dónde Net AUC, es el área bajo la curva (Ver figura 43) para cada una de las concentraciones de Trolox.

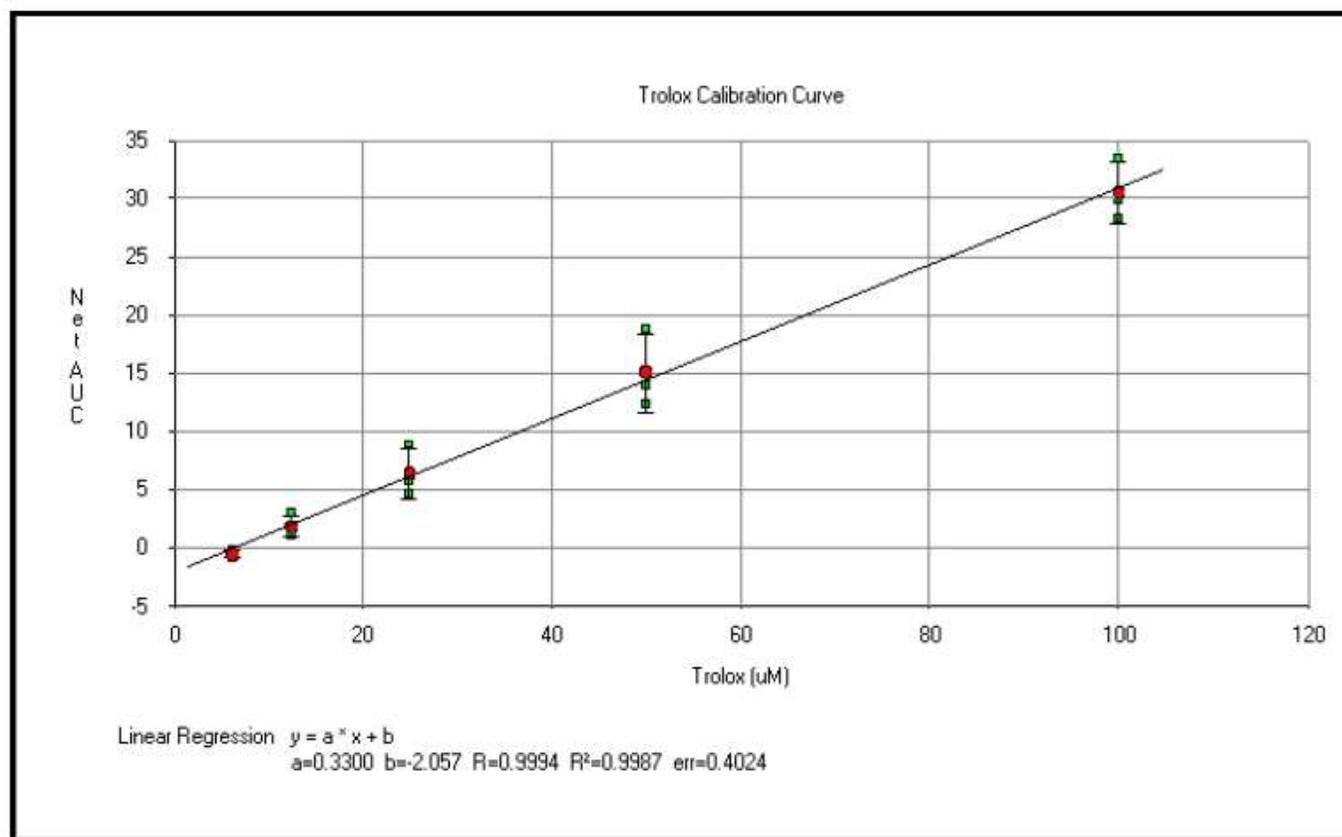
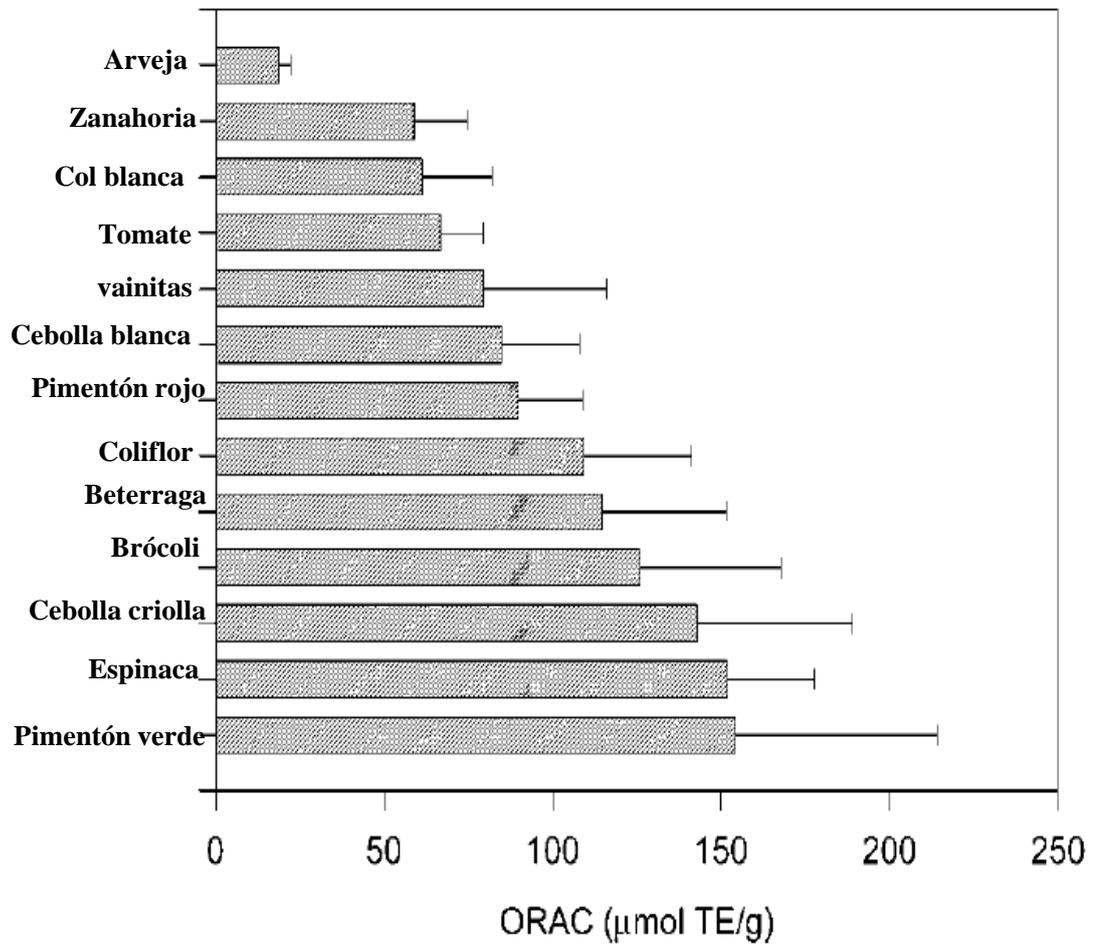


Figura 45. Algunos valores ORAC reportados en alimentos según (Ou, et al., 2002)



BIBLIOGRAFÍA DEL CAPITULO 4

- Anderson D, Yu TW, Phillips BJ y Schmezer P. 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 307(1):261-271.
- AOAC International. 2002. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. In. AOAC Guidelines. http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf.
- AOAC International. 2003. Validation: An invisible Component of Measurement. In. AOACI document. <http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/HorwitzValid.pdf>.
- Baer A, Ryba I, Meyer J y Bütikofer U. 1996. Microplate Assay of Free Amino Acids in Swiss Cheeses. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29(1-2):58-62.
- BeMiller JN. 2010. Carbohydrate Analysis. In: Nielsen, S., editor. Food Analysis. Fourth Edition ed. New York, USA: Springer. p. 147 - 177.
- BioTek. 2006a. The Importance of the 240 nm Absorbance Measurement. Application note. BioTek Instruments, Inc.
- BioTek. 2006b. Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity Assays with SynergyTMHT ORAC. Antioxidant Tests. In: BioTek Instruments, I., editor. Application Note. Vermont, USA: BioTek Instruments, Inc.
- BMG. 2006. ORAC Assay on the FLUOstar OPTIMA to Determine Antioxidant Capacity. Offenburg/Germany: BMG LABTECH GmbH.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Cao G y Prior RL. 1999. [5]Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. In: Lester, P., editor. Methods in Enzymology. Academic Press. p. 50-62.

- Chang SKC. 2010. Protein Analysis. In: Nielsen, S., editor. Food Analysis. Fourth Edition ed. New York, USA: Springer. p. 133 - 146.
- Chirinos R, Campos D, Costa N, Arbizu C, Pedreschi R y Larondelle Y. 2008 Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* 106:1285–1298.
- Glazer AN. 1990. [14] Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. In: Lester Packer, A. N. G., editor. Methods in Enzymology. Academic Press. p. 161-168.
- Koch H y Pein J. 1985. Condensation reactions between phenol, formaldehyde and 5-hydroxymethylfurfural, formed as intermediate in the acid catalyzed dehydration of starchy products. *Polymer Bulletin* 13(6):525-532.
- Kreusch S, Schwedler S, Tautkus B, Cumme GA y Horn A. 2003. UV measurements in microplates suitable for high-throughput protein determination. *Analytical Biochemistry* 313(2):208-215.
- Krohn RI. 2001. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. Current Protocols in Toxicology. John Wiley & Sons, Inc.
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Shin-Ichiro Nishimura y Lee YC. 2005. Phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem* 339:69–72.
- Megías C, Pedroche J, Yust MdM, Alaiz M, Girón-Calle J, Millán F y Vioque J. 2009. Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts. *LWT - Food Science and Technology* 42(9):1496-1500.
- Olson BJSC y Markwell J. 2001. Assays for Determination of Protein Concentration. Current Protocols in Pharmacology. John Wiley & Sons, Inc.
- Ollikainen P. 1993. Poster A5 Titration--A rapid method for the examination of the ripening of Swiss-type cheese. *International Dairy Journal* 3(4-6):549-550.
- Orndorff WR y Hemmer AJ. 1927. Fluorescein and some of its derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 49(5):1272-1280.

- Ou B, Hampsch-Woodill M y Prior RL. 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10):4619-4626.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA y Deemer EK. 2002. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11):3122-3128.
- Pedroche J, Yust MM, Megías C, Lqari H, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F y Vioque J. 2006. Binding to chickpea (*Cicer arietinum* L.) PA2 Albumin enhances hemin-dependent oxidative reactios. . *Journal of Food Biochemistry* 30(4):444-452.
- Psoni L, Tzanetakis N y Litopoulou-Tzanetaki E. 2006. Characteristics of Batzos cheese made from raw, pasteurized and/or pasteurized standardized goat milk and a native culture. *Food Control* 17(7):533-539.
- Reps A, Wisniewska K, Jarmul I y Brakoniecka-Sikorska A. 2005. Effect of freezing conditions on the ripening process and the quality of cheese. *Pakistan Journal of Nutrition* 4(4):210 - 214.
- Sigma-Aldrich®. 2010. 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride granular, 97%. In.: Copyrights © 2010 Sigma-Aldrich Co.
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=440914|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC.
- Singleton VL, Orthofer R y Lamuela-Raventós RM. 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: Lester, P., editor. *Methods in Enzymology*. Academic Press. p. 152-178.
- Sousa MJ, Ardö Y y McSweeney PLH. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11(4-7):327-345.
- Waterhouse AL. 2001. Determination of Total Phenolics. John Wiley & Sons, Inc.

Yvon M y Rijnen L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11(4-7):185-201.

Zheng W y Wang SY. 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11):5165-5170.

CAPÍTULO V

TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A ALIMENTOS, INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y ALGUNAS APLICACIONES.

5.1. Técnicas moleculares aplicadas a Alimentos.

La Biología molecular entendida como el conocimiento científico generado del estudio, estructura, función y composición de las moléculas importantes para los sistemas biológicos (definición tomada del proyecto genoma humano) es una disciplina que presenta posibilidades de mejora para la Industria de los Alimentos, al convertirse en el fundamento de variadas metodologías de verificación en la determinación de contaminantes biológicos, de toxinas y de alérgenos. En dichas metodologías mediante el análisis de los ácidos nucleicos, se determina la presencia de: una secuencia de nucleótidos que es parte del ADN característico del organismo contaminante; ó una secuencia que codifica la producción de una toxina o de un alérgeno (Marmioli y Maestri, 2007); ó una secuencia cuya presencia en el RNA, indicarían la expresión de una parte importante del genoma, que codifica la producción de un elemento clave para el estímulo de una ruta bioquímica benéfica para el organismo. (Caso de los alimentos funcionales y de la nutrigenómica)

Uno de los conceptos desarrollados en esta área considerado trascendente para el desarrollo de esta disciplina es el de la “Reacción en Cadena de la Polimerasa”, llamado también PCR (Ver sección 5.1.1.2). El premio nobel en química de 1983 fue otorgado al Dr. Kerry

Mullis por desarrollarlo cuando trabajaba para la corporación Cetus en Emeryville, California. Este concepto permitió que se desarrollen los equipos llamados termocicladores o máquinas de PCR, que al controlar de manera precisa los ciclos programados de calentamiento y enfriamiento, hicieron posible utilizar con eficiencia la reacción en cadena de la enzima termoestable polimerasa del ADN, permitiendo la amplificación selectiva de fracciones del ADN delimitadas según el criterio de estudio de los investigadores. Estas amplificaciones posibilitaron contar con fracciones de ADN en cantidad suficiente para alcanzar a los límites de detección de los fluorímetros u otros equipos usados como detectores al nivel tecnológico actual; y profundizar en el conocimiento de la información almacenada en esta molécula.

Es así que fraccionando el genoma, éste ha podido ser descifrado en una diversidad de especies (mediante la determinación de las secuencias de nucleótidos que los constituyen). Esta decodificación, llamémosla así, se realizó de manera gradual, por científicos de todo el mundo trabajando en laboratorios de países con alto nivel tecnológico. De esta manera, los seres humanos entran a este milenio iluminados en un conocimiento sobre ellos mismos, es decir sobre la vida, que es equivalente en importancia al conocimiento de los sistemas planetarios o de las galaxias del milenio anterior, estas nuevas luces del conocimiento se vislumbran con alcances insospechados para la investigación en el área de “Los alimentos”; es fácil constatar que las metodologías moleculares ya se han convertido en herramientas con ventajas nunca antes vistas para la investigación en el área; para confirmarlo basta leer las publicaciones científicas de los últimos cinco años sobre tópicos tales como: la identificación de GMOs (organismos genéticamente modificados) con fines de rotulado en alimentos tales como la soya y el maíz (Abdullah, *et al.*, 2006; Alary, *et al.*) o en la identificación de especies animales no declaradas tales como por ejemplo la aplicación de técnicas moleculares en la identificación de cRNAe de Pollo dentro de

productos de cRNAe de vacuno (Mane, *et al.*, 2009), o en la comprobación de un efecto benéfico debido al consumo de un alimento funcional. Así, cualquier búsqueda en una base de datos científica especializada con la palabra PCR genera miles de artículos recientes. Toda esta información ya es aprovechada con fines comerciales por varias compañías innovadoras, quienes ofrecen al mercado equipos y reactivos ensamblados en forma de kits, que sirven de soporte para la investigación a nivel molecular y para ser usados en base a protocolos que por lo general han sido desarrollados de forma específica para una determinada aplicación en alimentos. Por todas estas razones, es necesario detenerse por un momento para revisar los principales conceptos en éste tópico y comprender como se vienen aplicando como técnicas modernas de investigación a alimentos.

5.1.1 Algunas definiciones:

5.1.1.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Secuencia de reacciones que resultan en la amplificación catalizada por una enzima: ADN polimerasa termoestable, de una secuencia específica de nucleótidos dentro de una cadena individual de ADN. Esta secuencia es delimitada por los “*primers*”, llamados en español “cebadores”, los que son diseñados de acuerdo con la fracción del ADN que se desea amplificar (Ver figura 46). La unión de los nucleótidos en solución a la monocadena “*molde*” que se pretende amplificar, ocurre a nivel de los nucleótidos complementarios; es decir, la adenina es complementaria con timina (A-T) y la guanina con la citosina (C-G). Este proceso de síntesis de la cadena complementaria, teniendo como molde la cadena original, es catalizado por la ADN polimerasa termoestable. El tubo de ensayo donde ocurre esta reacción se encuentra dentro del equipo llamado termociclador, el cual, al término de la

reacción de síntesis (un ciclo), genera cambio en la temperatura del sistema ocasionando que el ADN (ahora ya con dos cadenas, la de molde y la recientemente sintetizada), se separe en dos cadena individualles (Ver Figura 47), que servirán a su vez en el siguiente ciclo como dos cadenas molde.

La técnica de PCR así descrita es conocida como de “punto final” y se termina generalmente después de 30 a 40 ciclos de amplificación en una zona donde según lo describe Roche® se llega a un *plateau* en las cantidades generadas del amplificado (Ver figura 68) donde cesa la correlación exponencial observada entre la cantidad que se amplificó con respecto a la fracción del ADN de partida vs el número del ciclo de amplificación. Generalmente después de 25 ciclos se tienen más de 8 000 000 de copias. Los productos de la amplificación son entonces analizados mediante electroforesis a fin de identificar y confirmar la presencia o ausencia de las fracciones amplificadas y luego si se piensa en una cuantificación éstos son transferidos a un “*blotting*” (Técnica que se describe más adelante: 5.2.4.2.2) donde son analizados con la ayuda de sensores. Las cuantificaciones por *blot* o *blotting*, de la región diana amplificada, tienen la desventaja que no permiten extrapolar información referente a la cantidad inicial (antes de la amplificación) de esta región diana en el ADN proveniente de la muestra.

Para hacer una cuantificación instantánea de la cantidad del ADN *diana* (objetivo para amplificar) proveniente de la muestra, es necesario hacer los cálculos de extrapolación cuando el proceso de amplificación se encuentre todavía dentro de la zona exponencial, antes de llegar al *plateau* arriba mencionado. Esto se logra actualmente con las técnicas de PCR en tiempo real, por medio de la cual se monitorea constantemente la producción del amplificado en la medida en que se vienen sintetizando, por medio de las señales que se generan,

generalmente señales fluorescentes o bio-luminiscentes. (Ver sección: 5.2.3) (Anonimo, 2006c).

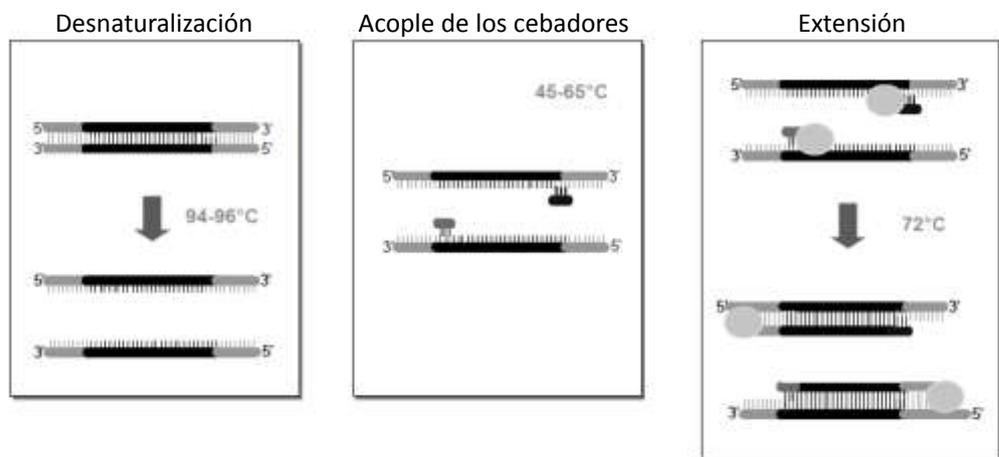
La reacción de amplificación del ADN con la polimerasa “PCR”, pueden ser subdivididas en tres partes:

1. Desnaturalización: ocurre entre 90 y 55°C (durante 20 a 30 segundos) se produce la separación de las dos cadenas de nucleótidos que conforman el ADN. Aquí todas las reacciones enzimáticas son inhibidas.
2. Acople de los Cebadores. “Annealing”. Es la alineación de los cebadores o “*primers*” (entre 20 y 30 nucleótidos unidos en una secuencia específica) a los flancos de regiones específicas del ADN a estudiar que se quiere amplificar (región “Tárgen” o Diana). En los flancos de las regiones *diana*, existen secuencias específicas que son reconocidas por los cebadores al estar constituidos éstos por la secuencia de nucleótidos complementaria, lo que les permite un acople específico y estable en esta zona. Éste tipo de acople, se denomina *hibridación* o unión de cadenas de nucleótidos con la secuencia complementaria dentro de otra cadena. (En la Figura 46, se observa como el acople de los cebadores delimita la región *diana*, la que aparece en color negro intenso). Los puentes de hidrogeno formados en estas uniones de nucleótidos complementarios son bastante estables y permiten que la enzima se una y empiece con la copia de la cadena; en la técnica de PCR, se utilizan *dos cebadores* que delimitan la zona a replicar. Martín, (2005) revisa que la temperatura a la que se realice la unión de los cebadores con la monocadena de ADN es muy importante para la especificidad de esta unión y depende de la composición

tamaño y concentración de cebadores, por ello se debe ser muy exacto en el control de las temperaturas, lo que se consigue con el uso de los termocicladores (Figura 67).

3. Elongación de cebadores. Extensión, durante esta etapa la enzima polimerasa reconoce la unión de los “cebadores” o “primers”, y empieza a catalizar el acoplamiento de los nucleótidos a partir del extremo 3’ del cebador (Ver Figura 46). La enzima es termoestable y no se inactiva durante la etapa de Desnaturalización. El descubrimiento de esta enzima a partir de un microorganismo termofílico *Thermus aquaticus* y su posterior clonación en E.coli han hecho posible la obtención a nivel comercial de la ADN polimerasa termoestable y que el método de PCR sea un método factible y práctico.

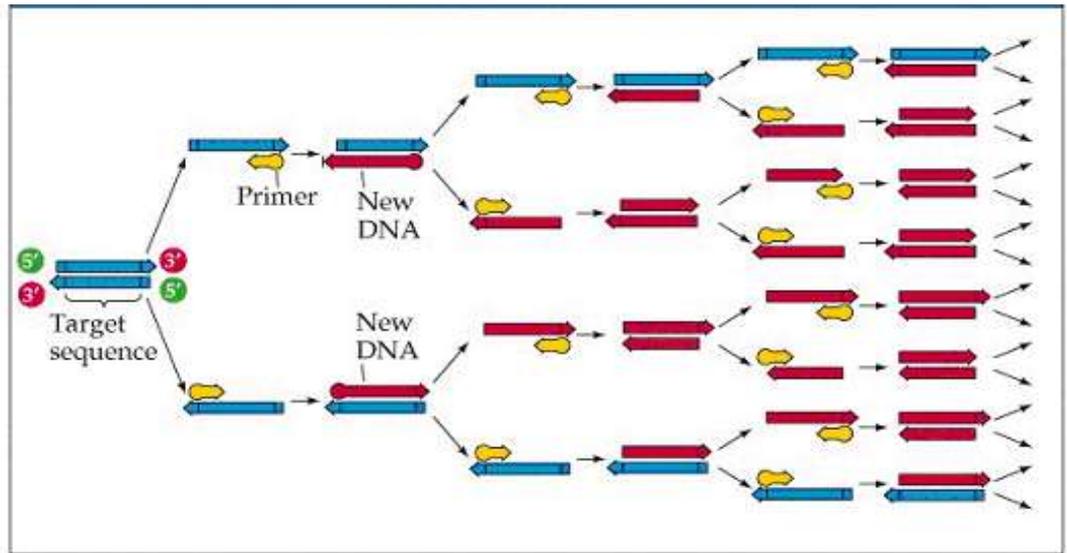
Figura 46. Esquema tomado de (Marmioli y Maestri, 2007) para la reacción de PCR (un ciclo)



En la Figura 47 se observa que el ciclo ya descrito de; desnaturalización, acople de cebadores y elongación, se repite varias veces ocasionando un aumento muy grande de la concentración de la región *diana*, es decir del amplificado (cadenas en color rojo). Esto permite que la concentración del ADN no específico, (es decir cuya

secuencia de nucleótidos no pertenecen a la región *diana*, en la figura cadenas en azul), sea ahora una concentración insignificante ya que esta región nunca se amplificó en una buena reacción de PCR.

Figura 47: Funcionamiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. El ciclo descrito en la Figura 46 se repite varias veces.



Fuente: (Purves W. K., *et al.*, 2001)

En el transcurso de los años la técnica de PCR ha experimentado una serie de variantes que le permite adaptarse a diferentes necesidades de investigación. Entre estas variantes se tienen aquí explicadas muy brevemente las siguientes:

5.1.1.3 Multiplex PCR.

Permite la amplificación de múltiples fragmentos de ADN (2 o más regiones “diana” diferentes) en un mismo tubo de prueba. Usa varios cebadores o “*primers*” al mismo tiempo. Esta técnica es útil en análisis de alimentos al permitir por ejemplo la búsqueda simultánea de un agente biológico productor de más de una toxina, lo que hace posible la

detección de falsos positivos. Es así que su uso en el análisis de serotipos patógenos de Salmonella, por Multiplex PCR usa cebadores que permiten todas: la amplificación del gen invasivo, gen de antígeno capsular y gen de antígeno flagelar. De esta manera se puede identificar la presencia de la salmonella patógena sin el peligro de realizar un falso positivo con otra cepa de salmonella que no sea typhi y que le falte alguno de estos genes.

Bai, *et al.*, (2009) reportan la reciente aplicación de un sistema multiplex PCR en la detección de la especie (pollo, vacuno, caballo o cerdo) en muestras de cRNAe. Sin embargo, Pemov, *et al.*,(2005) señalan como una de las restricciones importantes de los sistemas Multiplex a la posible interacción de “primers” o cebadores entre sí mismos, lo que reduce el número posible de Dianas o “Targets”. Pemov, *et al.*,(2005) reportan sin embargo, que usar un formato de Multiplex mejorado en una disposición de arreglo miniaturizado “*microarray*” para hacer PCR, evitaría este último inconveniente, ya que en un *microarray* o “microarreglo” uno de los cebadores se encontraría acoplado y fijo a un soporte (Ver sección 5.1.1.9); Usando un *microarray*, se elimina la necesidad de ver los productos amplificados por electroforesis para identificar las secciones que llegaron a ser amplificadas. De esta manera, un sistema multiplex modificado con uso de *microarray* ha sido exitosamente utilizado por Schmidt, *et al.* (2008) en el Canadá para la identificación de canola transgénica. De acuerdo con lo que reportan éstos autores, utilizando solamente un sistema de multiplex, se identifican con comodidad seis diferentes variedades de maíz genéticamente modificados (Bai, *et al.*, 2010), pero utilizando el sistema multiplex-*microarray* fue posible para Schmidt *et al.* (2008) la identificación de 12 diferentes canolas genéticamente modificadas sin tener una información precisa del tipo de modificación genética a las que ellas podrían haber sido sometidas.

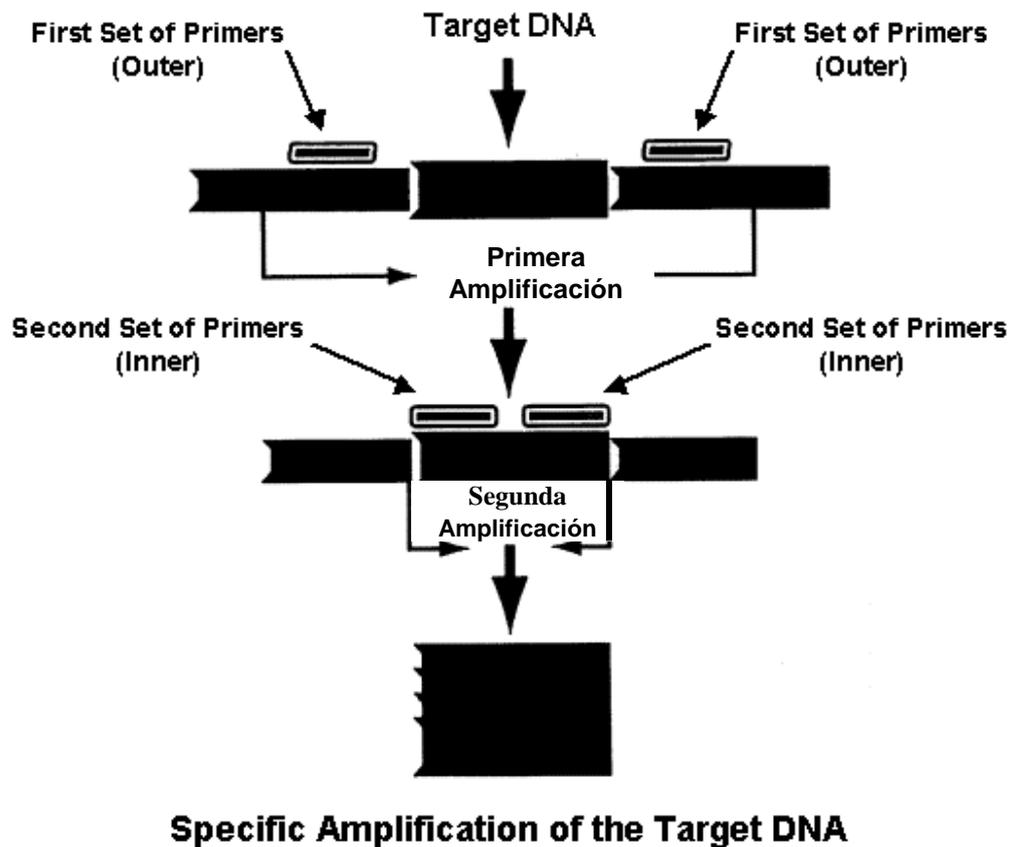
Estos métodos de identificación de GMO (Ver Glosario), reportados por Schmidt et al, (2008) están basados en el conocimiento de los elementos necesarios para la construcción de los tipos ya conocidos de modificación genética que cuentan con aprobación para Canola en Canadá y también en el conocimiento de los tipos de canola GMO que todavía no habían conseguido ser aprobados, pero que ya habían iniciado los trámites correspondientes. De esta manera, los investigadores, basados en la información existente seleccionaron e incorporaron 10 dianas o “targets” en los microarrays a ser amplificados con la ayuda de 20 “primers” o cebadores; se incluyeron asimismo los controles. Schmidt, *et al.*, (2008) mencionan finalmente que el método fue capaz de identificar los componentes transgénicos incluso en alimentos procesados, donde el ADN se encuentra con un alto grado de degradación.

5.1.1.4 “Nested” PCR (PCR anidada).

Es un procedimiento en el que se utilizan dos juegos de *cebadores* en dos etapas de amplificación en tándem; una, para hacer una primera amplificación o enriquecimiento de una fracción de ADN flanqueada por el primer juego de cebadores y dentro de la cual se encuentra una segunda región más pequeña con una secuencia específica de nucleótidos, la cual posteriormente, es reconocida y flanqueada por un segundo juego de cebadores, permitiendo su amplificación en una segunda PCR (ver Figura 48) (Dos reacciones de PCR en tándem). Este método tiene la ventaja de aumentar la especificidad ya que no se amplifican fracciones que podrían haber estado fuera del “locus” (Ver glosario); región que estaría siendo delimitada por el primer *par de cebadores* en la primera amplificación. Marmioli y Maestri, (2007) reportan que esta técnica ha sido utilizada por ejemplo en la detección de *E.coli* verotoxigénica en cantidades bajas de 110 ufc por 10 g de

cRNAe molida de res. También, un sistema de tipo PCR anidado ha sido empleado en la identificación de soya transgénica donde el método permite la identificación del gen “lectin” y otros genes foráneos. Zhang, *et al.*,(2007b) reportan que se necesitó un diseño de tipo PCR triplex nested para poder realizar estas identificaciones en productos de soya procesados tales como lecitina, polvo proteico y chocolate.

Figura 48: Nested PCR.



Fuente: http://www.ivpresearch.org/nested_pcr.htm

Una modificación del diseño anidado es la llamada diseño semi-nested o semi anidado y consiste en usar para la segunda amplificación de PCR (Ver Figura 48), un cebador “interno” (que se acopla en algún punto dentro de la región delimitada por el juego de cebadores utilizados en la

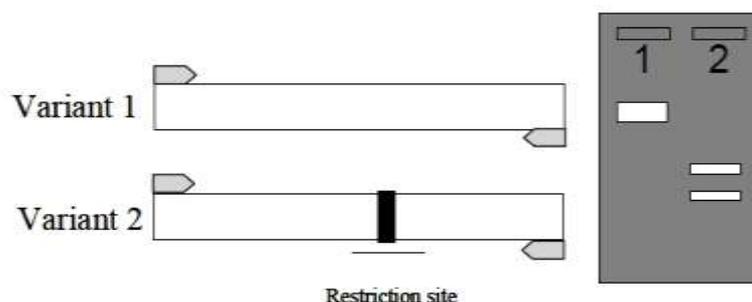
primera amplificación) y el otro cebador sigue siendo uno de los usados en la primera amplificación (Anonimo, 2007). Un diseño semi-nested evita ventajosamente la amplificación de regiones no deseadas de ADN (fuera del “locus”), cuando es usado en casos en que la región “Diana” se encuentra dentro de la zona cercana a la región delimitada por uno de los cebadores o “primers” utilizados en la primera amplificación. Se ha reportado que esta metodología ha sido utilizada en alimentos derivados del pescado salado para la identificación de las especies como el red-snapper conocido en Méjico como Huachinango o Pargo. (Zhang, *et al.*, 2006; 2007a).

5.1.1.5 PCR- RFLP.

Siglas que en el idioma ingles dicen: “Restriction fragment length polymorphism” Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de ADN. Fue una de las primeras técnicas que apareció para la detección de desórdenes genéticos, pruebas de paternidad y ahora también es usada en microbiología y en análisis de alimentos, en aplicaciones tales como el estudio de genes de virulencia (Martín, 2005) y la identificación de especies utilizadas en tuna enlatada (Lin y Hwang, 2007). Ésta técnica, consiste en amplificar primero una región del ADN delimitada por cebadores específicos (puede ser por ejemplo una región dentro de un gen de virulencia), luego este amplicón (lo que se llegó a amplificar), es sometido a la acción de enzimas endonucleasas de restricción, seleccionadas en función a la composición de bases de la región *Diana*. Estas enzimas fragmentarán el amplificado y dichos fragmentos se separan mediante una electroforesis de acuerdo con su longitud y tamaño, resultando en un patrón electroforético típico para la especie y cuya imagen es capturada. Actualmente PCR – RFLP, se usa muy poco, entre sus principales desventajas se encuentra una larga duración del análisis, ya que luego de la electroforesis se puede necesitar hacer un blotting, hibridización con

sensores y lavado, para la identificación y visualización de los fragmentos separados. Lee, *et al.*, (2009) reporta el uso de RFLP en la industria de alimentos, para la identificación de los genotipos en las especies de Anisakis que contaminan los peces del mar de Korea. Abdel-Rahman y Ahmed, (2007) usan esta técnica para discriminar cRNAe de búfalo, vacuno y oveja. En la Figura 49, la ausencia de determinadas bandas indican, que el sitio para la acción de la enzima de restricción no se encontraba presente; en el caso de la figura, esto se observó para la muestra # 1. Donde, se observa que para esta muestra la electroforesis indicó la presencia de un solo fragmento de alto peso molecular. El método termina con la transferencia del material separado en la electroforesis a una membrana e hibridación con un sensor (Técnica de Blotting, ver sección 5.2.4.2.2). Tal como lo mencionan Marmioli y Maestri, (2007) este método es muy largo pero al permitir determinar las zonas que son importantes para la identificación de la especie; o de la zona de virulencia u otro (ya que son zonas que siempre están presentes en el patrón de fragmentos típico obtenido); éstas zonas pueden ser secuenciadas posteriormente (ver sección 5.1.1.8) para luego diseñar cebadores específicos, que las permitan amplificar directamente, por lo que al final, este ensayo se puede transformar en una prueba de PCR simple (“end point”) con la que se lograría después de manera más rápida el objetivo de identificación propuesto en el alimento.

Figura 49. PCR- RFLP tomado de (Marmioli y Maestri, 2007) Con la electroforesis se puede determinar la presencia o ausencia de un determinado sitio de restricción.



Asimismo, mediante la identificación de similitudes en los patrones RFLP para los genes de virulencia, se puede determinar si los microorganismos que contaminan alimentos diferentes provienen de una misma fuente original de microbios.

5.1.1.6 PCR en tiempo real.

Método conocido también con el nombre de PCR cuantitativo. Es una modificación de la técnica de PCR de punto final llamada también “end point”, por la cual se optimizan los cebadores, los tiempos y temperaturas necesarios para la amplificación de una secuencia específica, región *diana*, las que generalmente son fracciones más pequeñas de las regiones *diana* frecuentemente amplificadas en una PCR de punto final. En el equipo de PCR en tiempo real, existe un sistema de detección que utiliza un fluorímetro, el cual monitorea de manera instantánea y constante el proceso de amplificación; para ello, se introducen sensores fluorescentes entre los reactivos para la reacción de la PCR. PCR en tiempo real, es un método que permite verificar que las fracciones del ADN diana o “target” se están realmente amplificando y el momento en el que lo están haciendo. Este objetivo es logrado introduciendo en la PCR unos sensores, sondas, o “probes” quienes pueden ser de diferentes tipos. Un tipo de sensor consiste en nucleótidos complementarios los que al ser ensamblados en la secuencia correcta complementaria dentro de la región *diana* del ADN que se desea amplificar, emiten una señal. A mayor cantidad del ADN diana amplificado, mayor será la señal. Un tipo frecuente de sonda consiste en una secuencia de nucleótidos, que son complementarios dentro de una zona de la región *diana* y que llevan adheridos una molécula fluorescente acompañada de un “*quencher*” (o inhibidor de fluorescencia), Ver Figura 50A: Sensor TaqMan[®] de

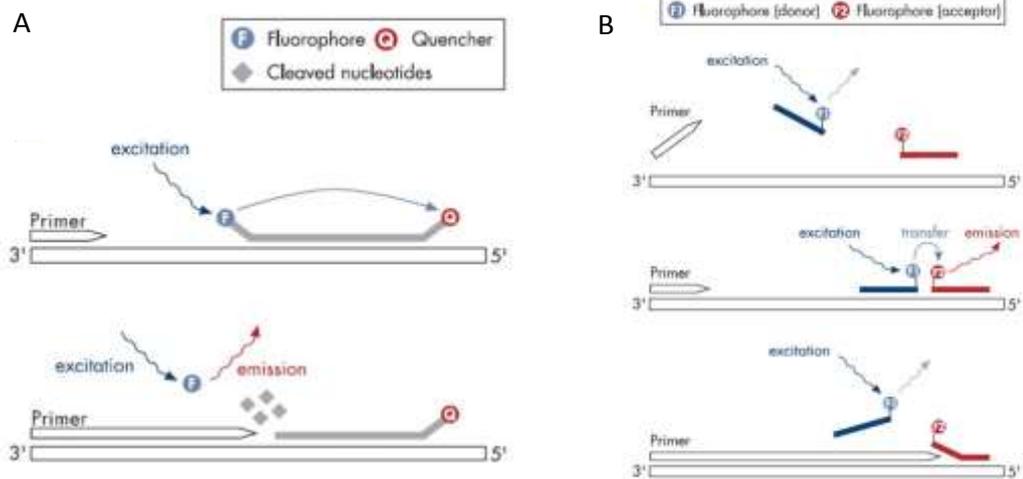
Quiagen™. De esta manera, durante el proceso de amplificación por acción de la Taq DNA polimerasa, los cebadores se elongan, como ya se explicó en la sección 5.1.1.2; en el momento en que el proceso de elongación llega a la zona de la región *diana* donde el sensor ha hibridado, la Taq DNA polimerasa ejerce una acción exonucleasa 5'→3' ocasionando en la cadena de oligonucleótidos que constituye la sonda, la liberación de la molécula fluorófero, ya que éste se encontraba adherida al extremo 5' de la sonda, de ésta manera al separarse el fluorófero del *quencher*, se produce la fluorescencia, después de recibir la iluminación de un láser con el que cuenta el instrumento detector; la fluorescencia, es continuamente monitoreada, la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de material nucleico amplificado. (Ver descripción del equipo en sección 5.2.3). Los ensayos cuantitativos de PCR requieren de una curva de calibración construida en las mismas condiciones de ensayo para la muestra la cual debe relacionar la Fluorescencia con la cantidad de ADN de la región *diana* amplificado. Ver Figura 68. Este método tiene la ventaja de ser bastante específico al estar reportando la amplificación en el instante en que ocurre (Anonimo, 2010).

Otro método de detección específico para el amplificado en PCR tiempo real es el de los sensores basados en el principio FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster). Ver Figura 50 B. Aquí se usan, dos sensores de hibridación etiquetados con fluorocromos, cada uno con un fluorocromo diferente. Estos sensores serán incorporados por hibridación en el proceso de amplificación durante la etapa de “annealing” o acople del ADN; la compañía Qiagen® por ejemplo reporta que sus sensores FRET son sintetizados de modo que la molécula fluorescente (con la cual se etiqueta uno de los oligonucleótidos usados como sensor) se encuentre en la cola o extremo final del sensor, mientras que para el otro sensor la molécula fluorescente se encontrará en la cabeza, o parte inicial del sensor.

Figura 50. Mecanismos de detección de la amplificación de las regiones “diana” o “target” por algunos tipos de sensores comúnmente usados en PCR tiempo real. Adaptado de (Anonimo, 2010). A. Principio de los sensores TaqMan®, B. Principio de los sensores FRET.

Sistema de sensor que hibridiza en la región diana con ayuda de la enzima Taq DNA polymerase. Ver detalles en texto.

Sistema FRET. Solo en la parte del medio, cuando ambos hibridizan en la region diana se produce FRET. Ver detalles en el texto.



Así, en el momento en el que se produzca el acople en la región *diana*, debido a que la secuencia de oligonucleótidos que ellos contienen, se acoplarán inmediatamente junto del otro sensor, de modo tal que la cola de uno de los sensores se encuentre suficientemente cerca de la cabeza del otro sensor, esta cercanía entre las moléculas de los fluorocromos, facilita ocurra la reacción FRET; ésta se basa en la transferencia de energía resonante fluorescente entre una molécula fluorocromo, que se excita, frente a la llega de la luz del equipo y una molécula fluorocroma cercana aceptadora de dicha energía y responsable de la emisión de la luz debido a la fluorescencia, que es detectada por el equipo. Es decir, frente a la exposición a la luz, sólo la molécula donadora de energía (ubicada en la cabeza), absorberá la energía, excitándose y transferirá la energía a la molécula aceptadora de energía (ubicada en la cola), quien finalmente emite luz a la longitud de onda de emisión que detecta el equipo (Ver Figura 50 B). Ésta señal será proporcional a la cantidad de amplificado. En

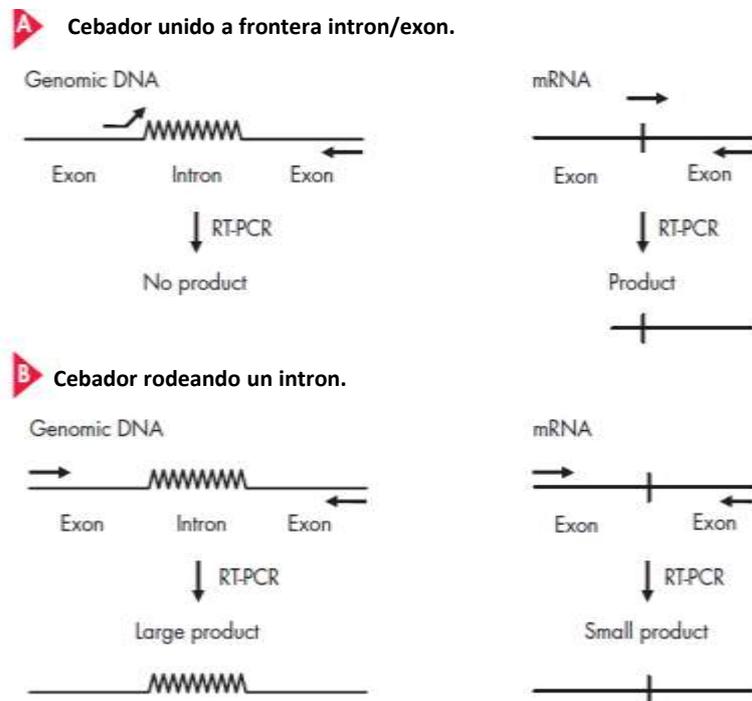
la Figura 50 B se aprecia que conforme la polimerasa elonga la cadena, los sensores son removidos por la enzima, perdiendo la proximidad de uno con el otro, cesando la reacción FRET y también la señal en el equipo. Si no existe la región *diana* buscada en el ADN que se amplifica, entonces los sensores nunca se acoplarán cerca y no existirá ninguna señal en el equipo tampoco. La molécula donadora que capta la energía también puede emitir luz por ser fluorescente pero la emite a una longitud de onda diferente de la que emite la molécula aceptadora, por lo tanto esta no es detectada. (Anonimo, 2010). El uso de moléculas fluorocromas fue útil para el diseño de sistemas multiplex en PCR tiempo real. Asimismo, los métodos de PCR en tiempo real se vienen aplicando tanto para ADN como para RNA vía (RT-PCR) (Marmioli y Maestri, 2007; Cultek, 2011) Los sensores descritos aquí, son sólo dos de los más frecuentes entre los muchos existentes que se pueden seleccionar acorde con una necesidad específica.

5.1.1.7. Amplificación de RNA. Se utilizan técnicas como las de amplificación de transcripción reversa (RT-PCR)

En variadas investigaciones son necesarios los análisis de fracciones de RNAm. (Ver Figura 9, Capítulo 2). El RNA en general no sirve de molde para las reacciones de PCR, por lo que para usar esta técnica los protocolos de uso común consideran primero copiar el RNA con la ayuda de una enzima llamada “*transcriptasa reversa*” en cADN (ADN complementario), el que si puede ser amplificado por técnica de PCR hasta un nivel detectable. En la práctica (Anonimo, 2006a) estas operaciones se llevan a cabo por separado o en un mismo tubo donde estarían juntos la enzima para RT (Transcripción reversa) y los “primers” para el PCR. Actualmente existen kits comerciales para la transcripción reversa los que son escogidos con frecuencia, en función de la cantidad inicial de RNA. El RNA usado en el estudio debe encontrarse intacto y ser de buena calidad.

Quiagen® (Anonimo, 2001) recomienda para los casos de transcripción reversa, que a fin de evitar contaminaciones, los “primers” o cebadores se deben desarrollar de modo que amplifiquen una zona conteniendo un intron, en el ADN genómico, es decir la mitad de los cebadores deberán hibridizar la región 3’ de un exón y la otra mitad la región 5’ del exón adyacente (Ver Figura 51); de este modo, si la region amplificada proviene de un cADN no contendrán “intron” (ya que el RNA no tiene intrón y el cADN proviene del RNA, post síntesis de la cadena complementaria) y serán por lo tanto fracciones más pequeñas que se podrán distinguir de las regiones amplificadas provenientes del material genómico (Contaminación) las que si presentarán el intron y serán de mayor tamaño.

Figura 51. Diseño de Cebadores para A: Eliminar; B: Detectar contaminaciones debido a amplificaciones de DNA genómico. Segun Quiagen® (Anonimo, 2001)



En algunas circunstancias el *RNA_m* aislado no se encuentra en cantidades suficientes para hacer identificaciones del gen en la molécula del

ADN del cual ha sido transcrito; esto ocurre especialmente cuando se desea evaluar su origen en al menos 39 000 diferentes eventos de transcripción de un genoma como el del ratón o de otra especie en un solo experimento; como ocurre cuando se usan algunos *chips* en *microarray*, o “microarreglos”, existentes comercialmente; por ejemplo, los chips de Affymetrix® , diseñados para el estudio de la transcripción del genoma del ratón. (Ver Figura 57). En estos casos, cuando el RNA aislado de los tejidos de los animales experimentales no se encuentra en cantidades suficientes, hay que amplificarlo. Para hacerlo primero se transcribe a cADN (Para lo cual hay kits como los de BioRad, que se pueden usar en el Termociclador). El cADN obtenido se puede amplificar más, esta vez, a cRNA utilizando la metodología del PCR y un kit de Ambion® que usa la enzima T7 RNA polimerasa, la que introduce el nucleótido uracilo como nucleótido complementario (www.ambion.com). Con este amplificado finalmente se obtienen cantidades suficientes de cRNA y se procede a una fragmentación, donde los fragmentos, en forma de monocadena acoplada a un fluorocromo u otro sensor, son expuestos al chip en “*microarreglo*” de Affymetrix® o algún otro, construido por el mismo investigador. En este *microarreglo*, se pondrá en evidencia, la posible expresión del gen en estudio (o *transcripción*) por mecanismos de hibridación de los fragmentos de RNA con la secuencia de oligonucleótidos complementarios fijados en el *microarreglo* del chip, las que son secuencias específicas del gen transcrito. Se producen las señales correspondientes del sensor, a capturar y analizar, por un sistema de captura y análisis de imágenes. (Ver Figura 52).

En la investigación de los llamados “alimentos funcionales”, las técnicas moleculares son usadas para identificar a este nivel los cambios benéficos para la salud inducidos por las sustancias bioactivas presentes en este tipo de alimentos. Usando metodologías moleculares de investigación, Nordentoft, et al., (2008) reportan el estudio del efecto de las dietas de soya con un alto contenido de isoflavonas en: los cambios de sensibilidad a la

insulina, en el perfil de expresión de genes que controlan insulina y en los cambios en la transcripción de los genes de células beta del páncreas en ratones. Nordentoft, et al., (2008), utilizaron una línea de ratones genéticamente diabéticos: la línea KKAY. Los investigadores dividieron los ratones en dos grupos para alimentarlos durante nueve semanas uno, con alimentación control y al otro grupo con una dieta suplementada en un 50% con soya rica en isoflavonas. Se monitoreó en los ratones, los niveles de glucosa e insulina en el plasma (mediante kits enzimáticos y anticuerpos extraídos de *Cavia porcellus*), y se encontró un incremento en la sensibilidad a la insulina, reducción de los niveles de glucosa en ayunas y mejora del perfil lipídico, en el grupo de ratones alimentados con la dieta de soya rica en isoflavonas. En este estudio los autores evitaron todo tratamiento térmico que pudiera degradar las isoflavonas. Luego de las nueve semanas se extrajo de los ratones, las células de los islotes del páncreas y de ellas el RNA, el cual fue amplificado hasta cRNA como se explica arriba, para luego ser utilizado en los chip de Microarray de Affymetrix® (para genoma del ratón) logrando de esta manera identificar un aumento en la transcripción de algunos genes; que precisamente son importantes para el control de la insulina, tales como *GLUT2*, *GLUT3*, *Ins1*, *Ins2*, *IGF1*, *Beta2/Neurod1*, *cholecystokinin* y *LDLr*.

Es de señalar que antes de hacer el estudio con el microarray probaron la expresión con la técnica de RT en tiempo real, (transcripción reversa en PCR en tiempo real) para solo 9 genes seleccionados por producir las proteínas necesarias, receptoras en las rutas metabólicas para el acople con la insulina liberada. Algunos de los resultados del RT en un tiempo real fueron confirmados por el estudio de *microarreglo*, en algunos casos el *microarreglo* no detecta cambios de expresión cuando se encuentra el RNA en cantidades muy pequeñas. Sin embargo el *microarreglo* permitió en esta investigación el estudio de un número mayor de genes en un tiempo corto, por lo que les fue posible la identificación de un mayor número de cambios en los eventos de transcripción que explican mejor, a

nivel molecular, los cambios observados en los animales debido al consumo de estas isoflavonas.

5.1.1.8 Secuenciación del ADN.

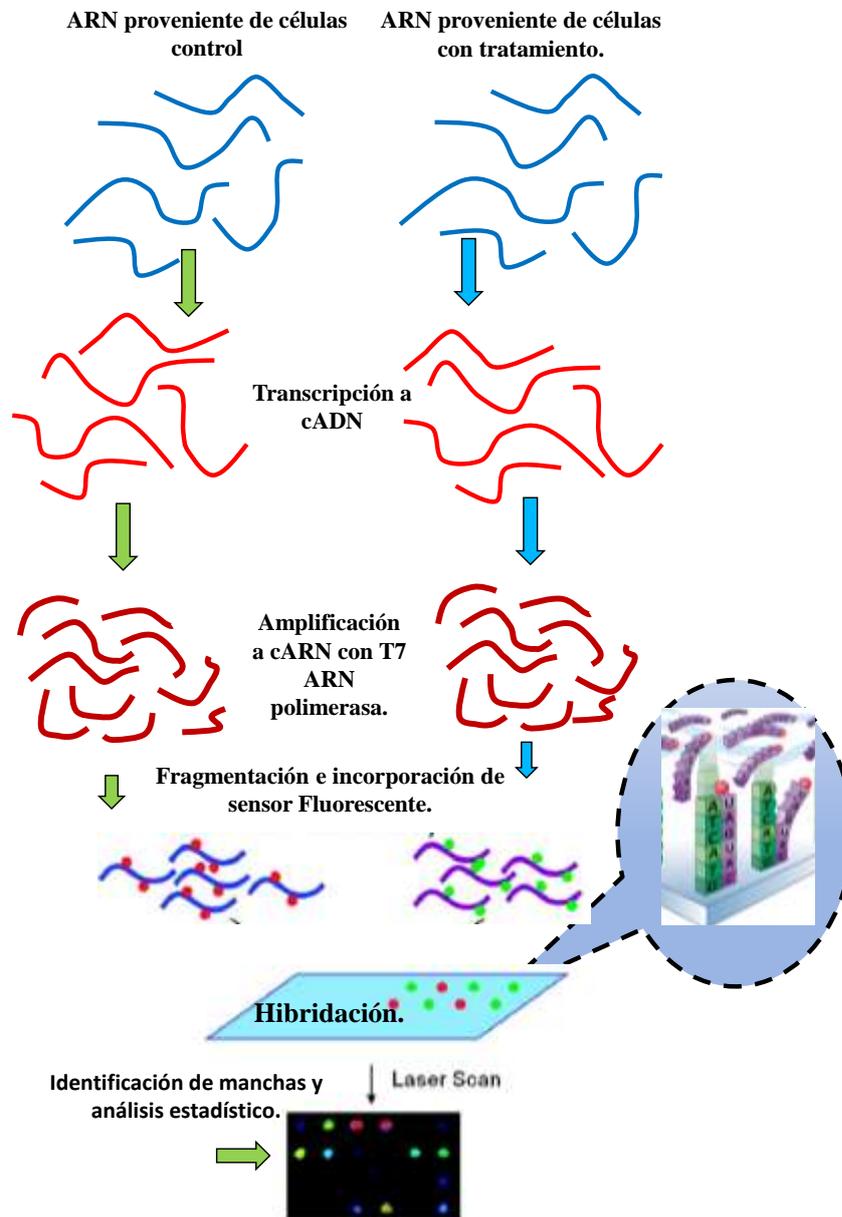
Mediante esta técnica es posible identificar la secuencia de nucleóticos (Adenina, Timina, citosina y guanina) que conforman la cadena del ADN, codificando la información almacenada en los genes. Los procedimientos de uso más difundido, para conseguir este objetivo de secuenciación se basan en la idea desarrollada por Frederick Sanger (quien recibiera un segundo premio Nobel por ella), mediante la cual, se amplifica una mono-cadena de ADN (la que se quiere secuenciar) mediante PCR con ayuda de los *cebadores*, polimerasa y nucleóticos; dentro de los nucleótidos se reemplaza uno de ellos primero (ya sea A, T, C o G) por un tipo especial de nucleótido modificado. La modificación es de dos tipos; la inclusión de un marcador (una molécula con fluorescencia o radioactividad) de modo que después que termine la amplificación por PCR se pueda identificar éste nucleótido modificado y también la eliminación en el nucleótido modificado del grupo 3'-OH necesario para la formación de enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos; ésta modificación debe ocasionar que la elongación de la cadena de ADN termine ahí. Estos nucleótidos que podríamos llamar “nucleótidos de interrupción de cadena” pueden ser de diferentes tipos, siendo los más utilizados: Nucleótidos modificados didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, o ddTTP) (Twyman, 2003). En la Figura 53 – A se aprecia un esquema del procedimiento de secuenciamiento descrito, en el que se muestra que se preparan cuatro mezclas reaccionantes diferentes, en cada una, se reemplaza uno de los cuatro nucleótidos diferentes del ADN por uno modificado de la manera arriba descrita. Cada mezcla por separado se somete a PCR, donde en cada amplificación se terminará al azar la síntesis de la cadena de ADN, tan pronto se incorpore alguno de los didesoxinucleotidos; entonces, se

generaran fragmentos de diferentes tamaños. Luego estos fragmentos se separan por técnicas de electroforesis ya sea en gel o en capilares y se ordenan las fracciones (con los datos de las cuatro PCR) de modo que cada una difiera de la otra en tamaño por solo una base. Cada una de estas fracciones terminará en una determinada base (A, C, G o T). Ahora la secuencia ya conocida. El procedimiento de secuenciación descrito, actualmente se ha automatizado de diferentes maneras. Pero como estos métodos de secuenciamiento trabajan bien con cadenas entre 500 y 800 bases por experimento; y debido a que para secuenciar un genoma como por ejemplo el genoma humano que en promedio cuenta con 3 000 000 de bases de pares, se tiene que recurrir a algunas estrategias alternativas como las conocidas con el nombre de “shootgun”, “fuerza bruta” o “escopetazo”, mediante las cuales se rompe todo el ADN en fragmentos al azar, y cada fragmento es secuenciado por ejemplo con el método descrito en la Figura 53 para luego ensamblar toda la información de los fragmentos con la ayuda de software que permite identificar zonas de solapamiento entre bases, las que ofrecen información valiosa para unir la información proveniente de los diferentes fragmentos. Se consigue la exactitud en estos experimentos repitiéndolos varias veces.

Otra de las metodologías para hacer secuenciamiento de bases es la llamada pirosecuenciación la que se diferencia de la anteriormente descrita, en que es un método de secuenciación por síntesis, es decir, colocando como molde una de las fracciones del ADN que se quiere secuenciar, se monitorea la incorporación de bases durante la síntesis de su cadena complementaria. Para lograrlo se emplean las llamadas deoxibases de nucleótidos las que al ser incorporadas en la cadena molde liberan grupos fosfatos los que por medio de una ATP sulfúrilasa son transformados en ATP, este ATP reacciona con una enzima luciferasa, catalizando la activación de un componente que genera luminiscencia, la que es proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados en ese momento

(Ver Figura 54). Un *software* analiza la secuencia de incorporación de nucleótidos en el tiempo con respecto al control.

Figura 52. Esquema de un procedimiento de Microarray. Adaptado de: Kong *et. al.*, (2011) y Shulumpberger (2004)



Superficie celeste: Soporte del *microarray* (vidrio químicamente modificado). Los puntos sobre superficie celeste: secuencias de oligonucleótidos únicos y exclusivos de un gen y que son fijados en la superficie. Las secuencias de oligonucleótidos de la muestra y blanco son etiquetados con dos sensores fluorescentes diferentes (color rojo y verde en la figura). Cuando estos últimos son expuestos a las cadenas complementarias en el *microarray* se producirá la hibridación. La exposición posterior con luz láser permitirá identificar intensidad de señal para cada mancha es decir expresión diferencial de genes

Figura 53. Secuenciación de ADN por el método de terminación de cadena.

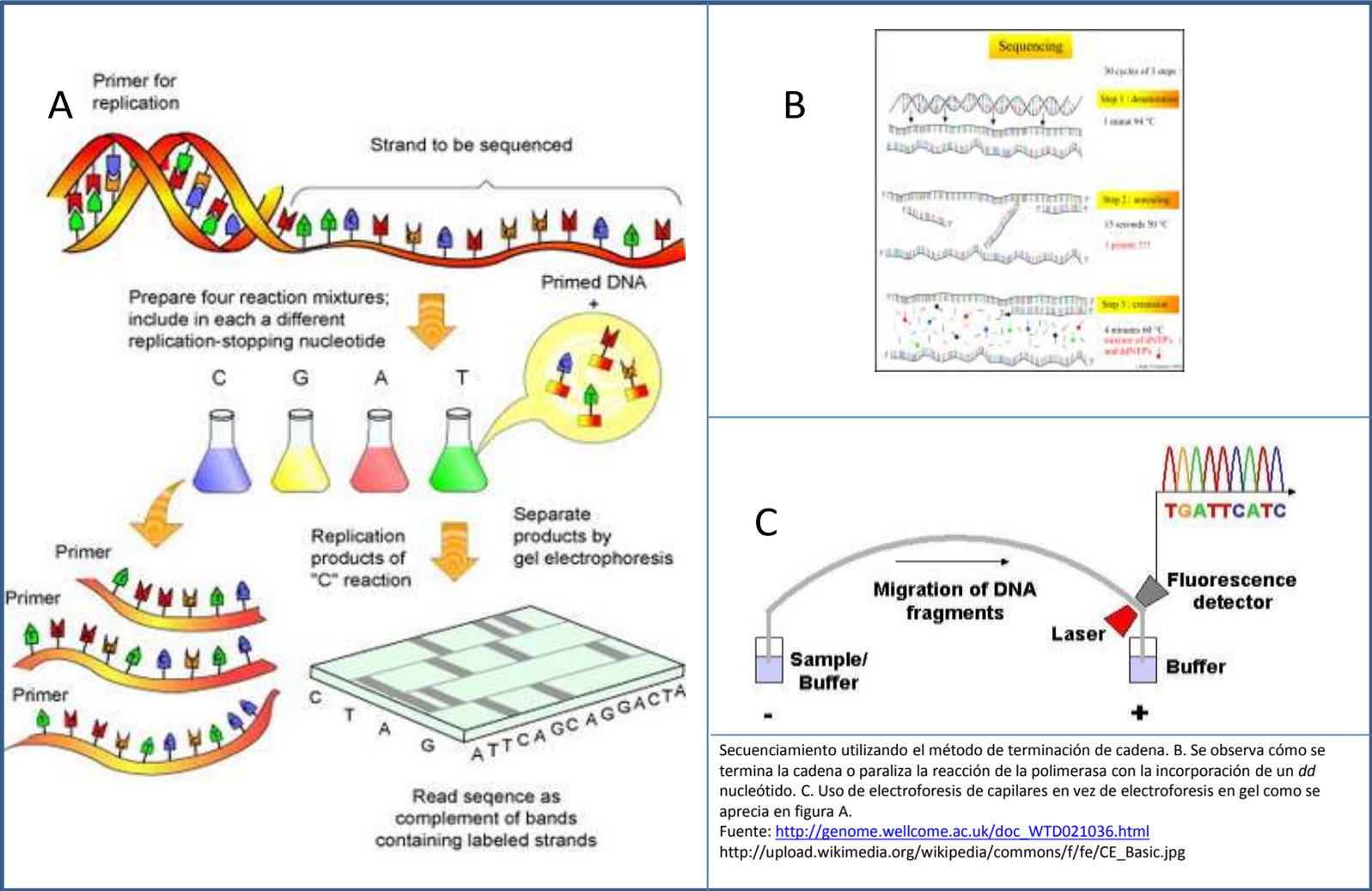
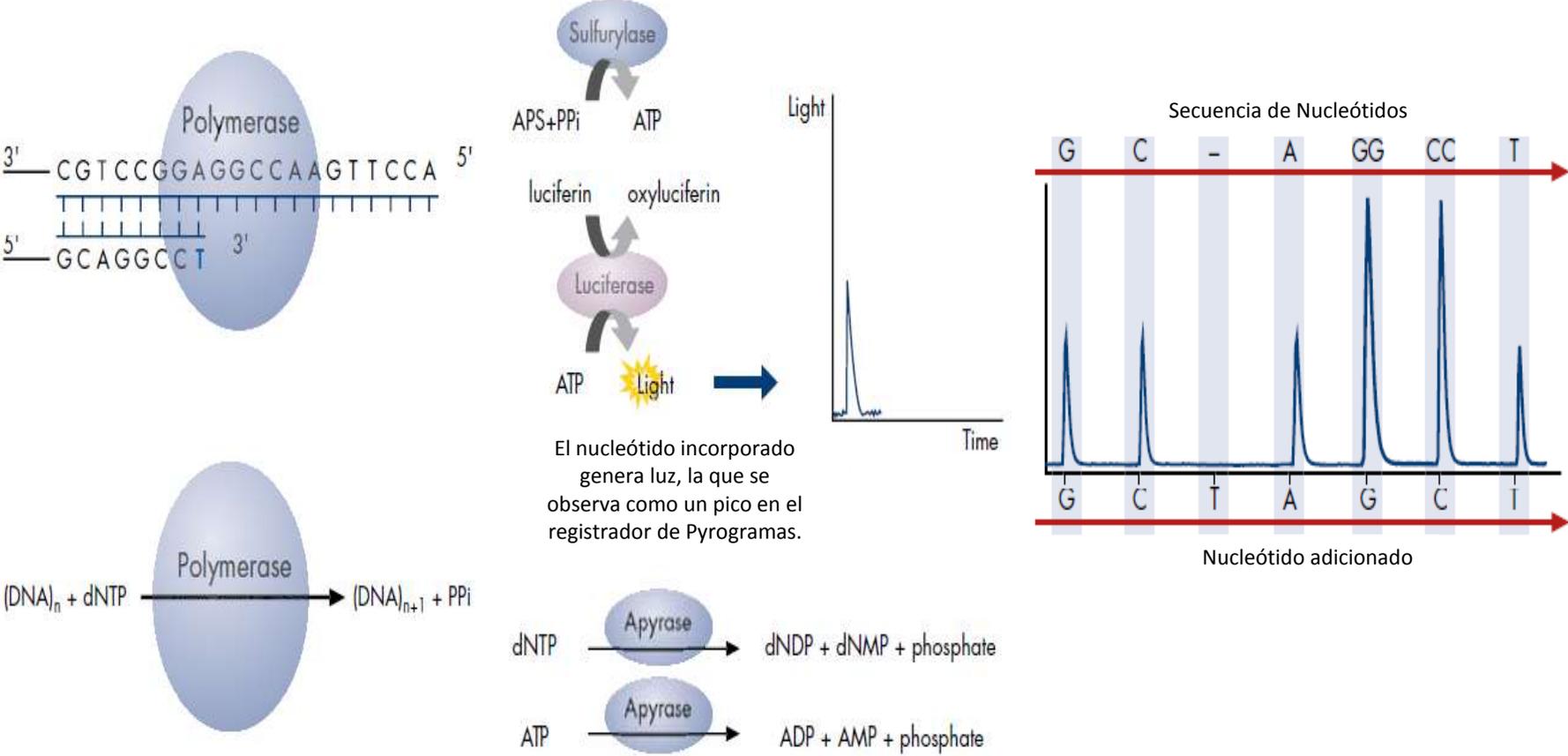


Figura 54. Incorporación de nucleótidos y generación de luz, tal como lo reporta Quiagen® (www.qiagen.com)

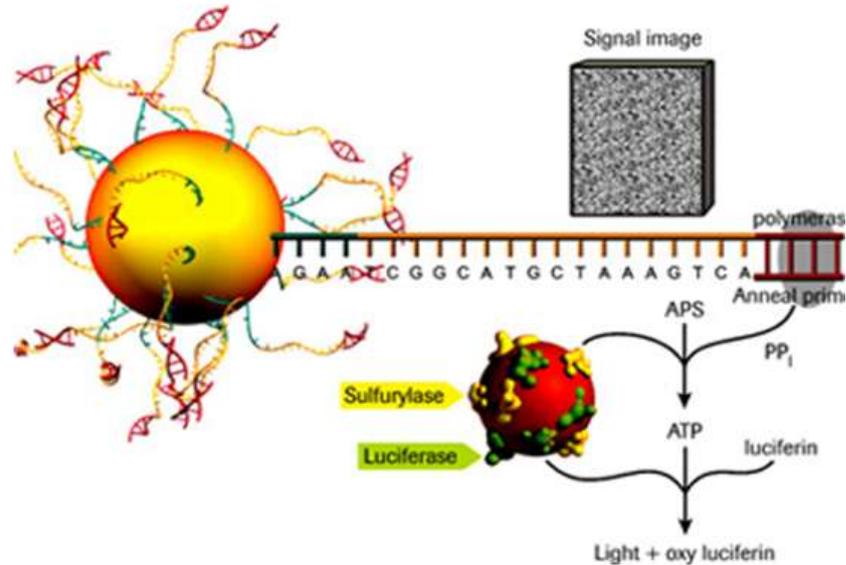


El procedimiento de secuenciación por síntesis, viene siendo automatizado por ROCHE® en su sistema 454 de secuenciación y el procedimiento puede ser descrito de la siguiente manera según (Fibao, 2009): Una vez extraído el ADN, éste es fragmentado de modo que el número de oligonucleótidos de la cadena se encuentren entre 200 a 800 pares de bases. Estos fragmentos son adheridos a la superficie de pequeñísimas esferas “*microesferas*”, por ejemplo mediante fijación con biotina y/o estreptavidina. (Anonimo, 2011).

Posteriormente con un tratamiento con una base por ejemplo, se separan las dos cadenas del ADN y una mono cadena queda adherida a la esfera y lista para reaccionar con la polimerasa para iniciar el proceso de síntesis de la cadena complementaria (pirosecuenciación). Sin embargo se necesita amplificar antes esta mono cadena ya que el sistema no puede detectar como se sintetiza la cadena complementaria, cuando sólo hay una cadena. Este proceso de amplificación en el sistema automatizado de ROCHE® se lleva a cabo por PCR dentro de una emulsión de tipo agua en aceite. Así, en cada una de las gotas de agua, de la emulsión, queda atrapada una sola *microesfera* (Ver Figura 55), junto con todos los ingredientes para que se realice un PCR que amplificará la fracción de monocadena adherida en la esfera. Después de varios termociclos (en la máquina de PCR) se consigue la amplificación, de fracciones idénticas al ADN monocadena adherido inicialmente a la esfera. Sin embargo, al ser la fracción amplificada de doble cadena, se procede a la eliminación de la cadena complementaria con un tratamiento con álcali. El resultado es un gran número de cadenas idénticas simples (monocadena) unidas a la esfera por el extremo 3'. Ver Figura 55. Al tener ahora material suficiente, que permita la visualización y registro del proceso de síntesis de la cadena complementaria, se prosigue con esta etapa, haciendo uso de sensores bioluminiscentes.

Figura 55. Reacciones de secuenciación sobre micro esferas.

Dibujo según ROCHE® donde son millones las copias de un único fragmento de ADN que están adheridos en la superficie de la micro esfera.



Las señales de luminiscencia debido a la síntesis de las cadenas complementarias (Ver Figura 54) de una cantidad suficiente de ADN monocadena, se registran con una cámara. Estas reacciones luminiscentes se llevan a cabo dentro de un dispositivo conocido como “*picotriferplate*”. (Placa de pico pozos para titulación), el cual cuenta con más de un millón de pocillos de aproximadamente 44 micras de diámetro, dónde solo debiera caber dentro del pocillo una micro esfera con sus fragmentos amplificados de ADN y otra micro-esfera con todos las enzimas y reactivos que se necesitan para realizar la secuenciación vía síntesis de acuerdo con el procedimiento ya descrito y que se aprecia en las Figuras 54 y 55. Se puede necesitar de la centrifugación para la introducción del micro-esfera en el “*picotriferplate*”.

De acuerdo con Fibao, (2009) se trabaja la pirosecuenciación, un nucleótido por vez, donde los destellos producidos debido a la bioluminiscencia, son captados por el secuenciador, el cual una vez terminada la reacción luminosa y degradados de los reactivos excedentes con ayuda de enzimas, se procede a inyectar nuevas esferas de reactivos

conteniendo entre otros, la siguiente base de nucleótidos para estudiar el momento en que son incorporados en la cadena molde. Según, Fibao, (2009), la intensidad de la señal luminosa es proporcional al número de nucleótidos para estudiar, incorporados en cada reacción y es monitoreada a través del tiempo por el secuenciador para cada reacción de la polimerasa con un determinado nucleótido. Luego mediante programas informáticos se puede determinar la secuencia, relacionando las intensidades y los tiempos en los que ocurrieron los destellos.

Finalmente, es posible encontrar en la literatura que se vienen desarrollando nuevas tecnologías de secuenciación como las de secuenciación por hibridación, sobre la cual el lector pronto encontrará abundante información sobre ella.

5.1.1.9 Un Microarray de DNA "Microarray Technology".

Consiste en preparar un arreglo serial de miles de puntos microscópicos de ADN (entre 10,000 y 80,000 fragmentos de DNA del orden de los picomoles), estos son colocados generalmente sobre un soporte de vidrio. Solo se coloca una de las cadenas de estos oligonucleótidos o fragmentos de ADN, ya que se espera que si existen los oligonucleótidos complementarios en el ADN extraídos de la muestra; durante el ensayo, se producirá la hibridación (o unión entre cadenas complementarias), por ejemplo, una cadena conteniendo las bases de: adenina, timina, citosina, adenina, timina, guanina se unirá a otra cadena que contenga las bases complementarias por ejemplo es decir, Timina, Adenina, Guanina, Uracilo, Adenina y Citosina (Schulumpberger, 2004). Si se trata de detectar un RNA, la base complementaria de adenina es un Uracilo. (Ver Figura 52).

La hibridación es detectada entonces, mediante la adición de moléculas fluorescentes, plata o sustancias químico luminiscentes en las

secuencias diana o “target” (inclusión de marcador). Ver Figura 52 y 59. En el caso de las lecturas de fluorescencia éstas son interpretadas por un software que logra identificar el origen del ADN. (Biomerieux®, 2004) Estos ensayos se pueden realizar en solo un día.

Los *microarreglos* son sistemas que ahora se están usando para la detección del efecto de sustancias anticancerígenas, utilizando equipos tales como los escáners de “Chips de ADN” en los “*chips*” se diseñan “*arrays*” o *arreglos* (distribución en un espacio físico de diferentes zonas, en donde existen, diferentes fracciones de molécula de ADN con secuencias de nucleótidos distintas) con los que se pueden identificar por hibridación fracciones de ADN o RNA específicos que están relacionados, por conocimientos previos, con diferentes estadios de la progresión de la enfermedad del cáncer. (Affymetrix, 2006). Sin embargo como lo indica Marmiroli y Maestri, (2007) las muestras son sometidas primero a un proceso de amplificación, antes de ser ensayadas en el *microarreglo*, y debido a ello, la cuantificación no es posible en un *microarreglo*, entonces, para cuantificar, se recomienda hacer para los genes ya identificados gracias al microarray, un PCR en tiempo real.

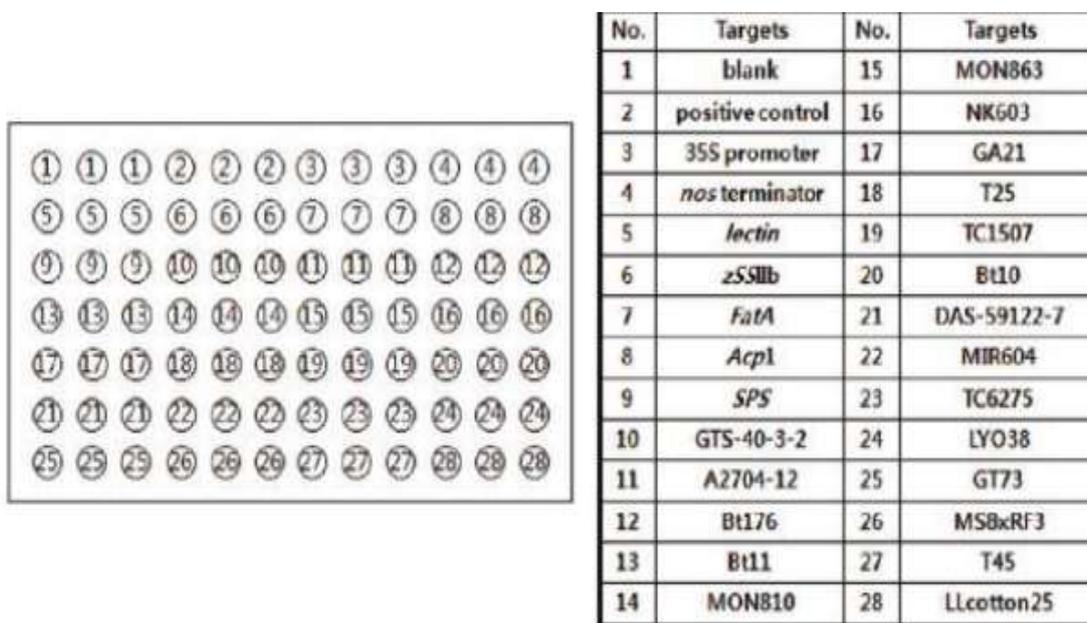
5.1.1.10 Aplicaciones recientes de la tecnología de los microarreglos o “microarrays” en la Industria de los Alimentos.

A. Identificación de un origen transgénico en los alimentos:

Una aplicación muy importante es la identificación de los GMOs (Organismos genéticamente modificados); ésta es necesaria en la cadena alimentaria a diferentes niveles del proceso productivo. La presencia de GMOs es una realidad en muchos mercados. Los productores y los consumidores requieren conocer de las alternativas existentes para la identificación de genes transgénicos en alimentos.

En líneas generales, el procedimiento empieza con la extracción del ADN de los alimentos, al respecto, Pafundo, et al., (2011), compara cuatro diferentes métodos de extracción del ADN en matrices alimentarias vegetales: DNA extraído con CTAB, DNA extraído con CTAB y PVP, DNA extraído con SDS. DNA extraído con GK-resina. Para evaluar la calidad de los extractos obtenidos, se evaluó: i) concentración de ADN, ii) Pureza de ADN ($r = A_{260}/A_{280}$) iii) Posibilidad de amplificación con PCR del ADN extraído utilizando cebadores de tipo 18SR. Según Pafundo, et al., (2011), después de la evaluación estadística de los datos, éstos indicaron que no existió diferencia significativa en lo que respecta a la cantidad extraída y la pureza, cuando se aplicaron los métodos arriba indicados en la extracción de ADN de Tomate, Apio y zanahoria de productos procesados.

Figura 56. Distribución de sensores sobre el chip desarrollado por Kim et al (2010) para el análisis de alimentos procesados.



Kim, et al.,(2010) describen un “microarreglo” para la identificación de GMOs en alimentos procesados, donde después de la extracción del ADN del alimento, concentración por precipitación, y purificación; éste es sometido a una amplificación mediante un sistema *múltiplex* PCR

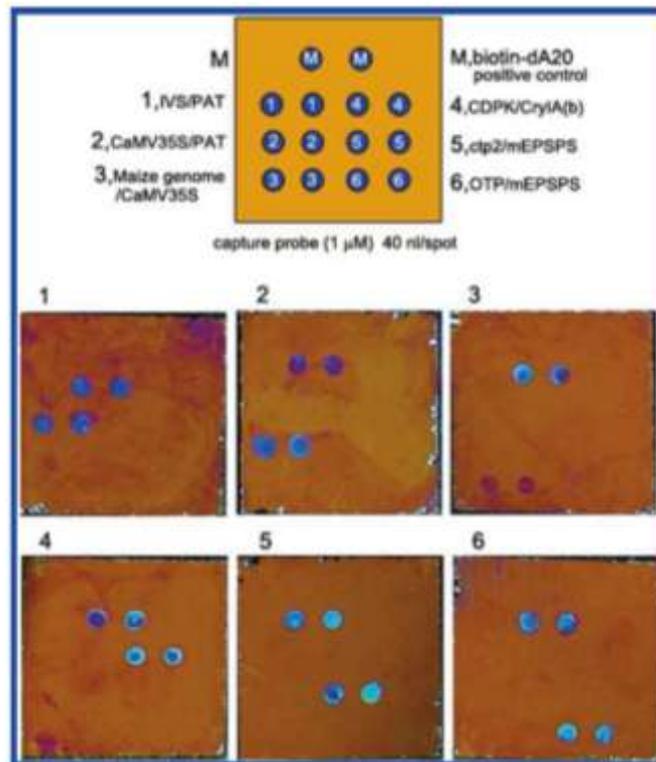
utilizando unos cebadores que permiten la identificación de eventos específicos en el ADN. Es decir estos cebadores buscarán secuencias únicas que suelen estar presentes en los organismos transgénicos en las uniones entre el “*transgen*” y el ADN original del organismo y también cebadores que permiten identificar fracciones específicas en los promotores y *nos* (*enzima nopaline sintetasa*) utilizada con frecuencia en la región de término del gen modificado; para ello utilizaron 27 diferentes cebadores para el análisis de 19 diferentes GMOs. Como en los alimentos procesados es común encontrar ADN fragmentado, los largos de amplificación son relativamente cortos (menores de 200bp). La especificidad de los cebadores es primero comprobada mediante secuenciamiento de las fracciones amplificadas en un PCR “single target”. Estas fracciones son luego clonadas, para obtener los sensores.

En el siguiente ejemplo, tomado del trabajo de Kim, *et al.*, (2010), los sensores obtenidos fueron utilizados en la construcción del “*microarreglo*” de la siguiente manera: unas gotas en forma de puntos de diámetro 100 μm y concentración de 50 μM del sensor (fracciones de ADN amplificado por los cebadores específicos), en solución de hibridación, se colocaron en una placa de vidrio de silano; para ello se utilizó un equipo llamado “arrayer” que permite trabajar con estas sustancias en cantidades muy pequeñas, luego de lo cual se realiza la tinción con la sustancia fluorescente, la que emitirá una señal en los casos en los que se produzca hibridación (Ver Figura 59).

Al final se obtiene un chip en el que se han adherido 27 diferentes sensores en su superficie, ofreciendo bastante flexibilidad para la detección de múltiples variedades de GMO. (Ver Figura 56) Para usar el chip, éste se cubre con una cabina de difusión donde se expone a una solución de hibridación con el producto de la amplificación del PCR *multiplex* realizado con el ADN de la muestra, en forma de monocadena; es en contacto con

ésta solución, que se produce la hibridación a 42°C por 1 hora. Luego de lo cual el chip es escaneado y la imagen analizada mediante un software. Este método probó ser muy exitoso en productos derivados del maíz.

Figura 57. Detección de maíz genéticamente modificado utilizando un chip en películas. Los puntos azules representan los sensores capturados por el ADN de la muestra. Los números indican los sensores utilizados. Son resultados de (Bai, *et al.*, 2010)



Si no se desea construir el “*microarreglo*”, existen kits comerciales como los producidos por la compañía Eurofin Genescan (<http://www.genescan.com>) en donde sería posible la identificación de casi todos los GMOs comúnmente comercializados al día de hoy. Germini *et al.*, (2004) menciona que una mayor afinidad durante la hibridización se puede conseguir no con oligonucleótidos de ADN sino más bien con un producto derivado llamado péptido de ácido nucleico (PNAs) donde el azúcar del ácido nucleico es reemplazado por un pseudopéptido; Germini,

et al.,(2004) también reportan un método por el cual optimizan el tamaño de este péptido para identificar soya genéticamente modificada usando la tecnología del *microarreglo* anteriormente descrita.

Bai, *et al.*, (2010) reportan una versión de bajo costo de estos “*microarreglos*”, como el descrito por su grupo de investigación para la identificación de diferentes tipos de maíz transgénicos; ésta revisión consiste en combinar la tecnología del “*microarray*” o “*microarreglos*” con la mayor visibilidad de los resultados que ofrecen los chips realizados sobre películas “films”; de esta manera los resultados de los marcadores de modificaciones genéticas pueden ser visualizados sin la ayuda de equipos costosos pudiéndose utilizar por ejemplo el ojo humano (Ver Figura 57).

Asimismo, de no optar por la opción de construir el “*microarreglo*”, existen alternativas tales como el uso de kits comerciales como los producidos por la compañía Eurofin Genescan (<http://www.genescan.com>) (Germini, *et al.*, 2004) en donde sería posible la identificación de casi todos los GMOs comúnmente comercializados al día de hoy. Sin embargo, Germini *et al.*, (2004) mencionan que una mayor afinidad durante la hibridización se puede conseguir no con oligonucleótidos de ADN sino más bien con un producto derivado llamado péptido de ácido nucleico (PNAs) donde el azúcar del ácido nucleico es reemplazado por un pseudopéptido. Estos autores reportan un método por el cual, optimizan el tamaño de este péptido, para facilitar la identificación de soya genéticamente modificada usando la tecnología del “*microarreglo*” anteriormente descrita.

B. Aplicaciones en la detección de Adulteraciones:

La secuencia de operaciones presentada en la Figura 58 permite de acuerdo con lo reportado por (Biomerieux®, 2004) el analizar la presencia de adulteraciones en alimentos, es decir cuando se vende cRNAe de una determinada especie y luego se mezcla con otras.

Figura 58. Procedimiento a seguir para la identificación del origen de las especies cárnicas utilizando técnicas moleculares de tipo “microarreglo” . Según (Biomerieux®, 2004)

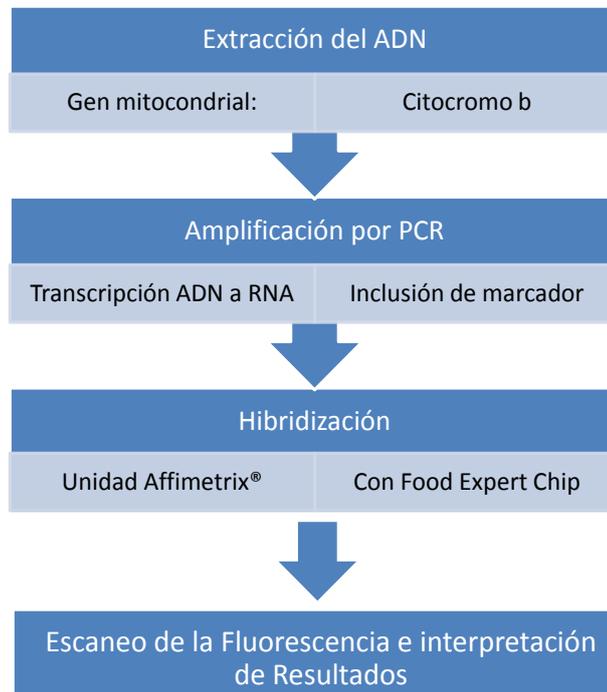
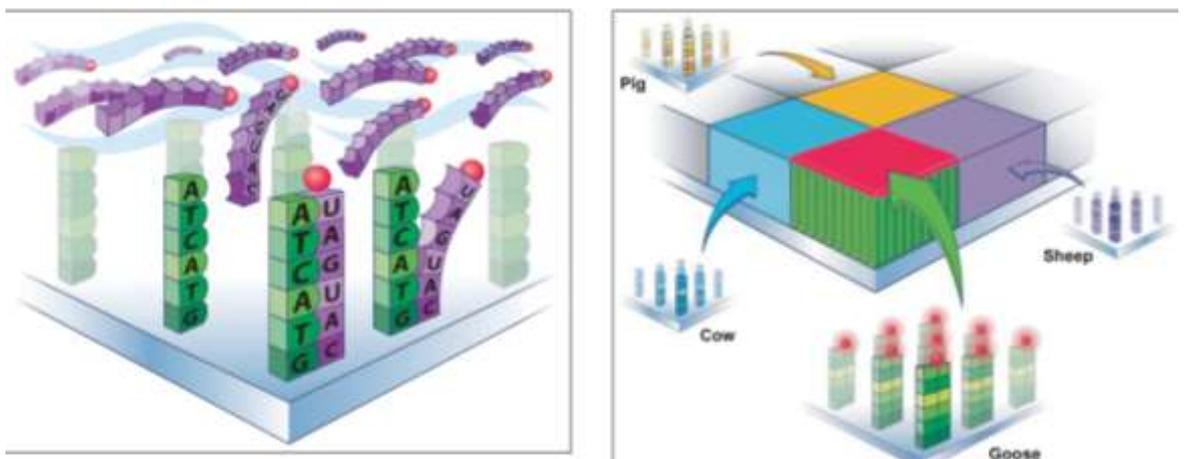


Figura 59. Tecnología de *Microarreglo* e Hibridización según (Schulumpberger, 2004)



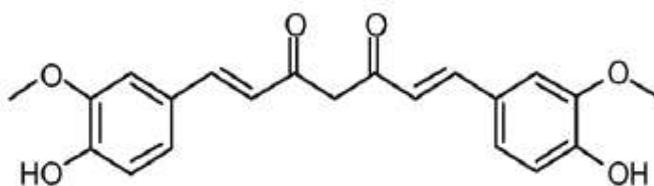
Esto es particularmente importante para algunos consumidores que por motivos religiosos o de salud no puedan consumir un determinado tipo de alimento, reportándose también como metodología útil para el control de raciones animales a fin de evitar casos de canibalismo, situación que

aumenta el riesgo de ciertos tipos de enfermedades tales como las del BSE. (Encefalopatía espongiforme bovina).

C. Aplicaciones en la investigación de los efectos moleculares de los ingredientes bioactivos de los alimentos.

En este sentido Fukasawa, *et al.*, (2007) reporta el uso de “microarreglos” en la investigación de los genes que son expresados en el intestino, cuando están presentes los oligofruktanos en la dieta. Otro trabajo interesante es el reportado por Honda, *et al.*, (2006) donde se aplica la tecnología del microarray para identificar los genes que son alterados en su expresión debido a las propiedades bioactivas del cúrcuma (*Curcuma longa*). Ver Figura 60.

Figura 60. Curcumina.

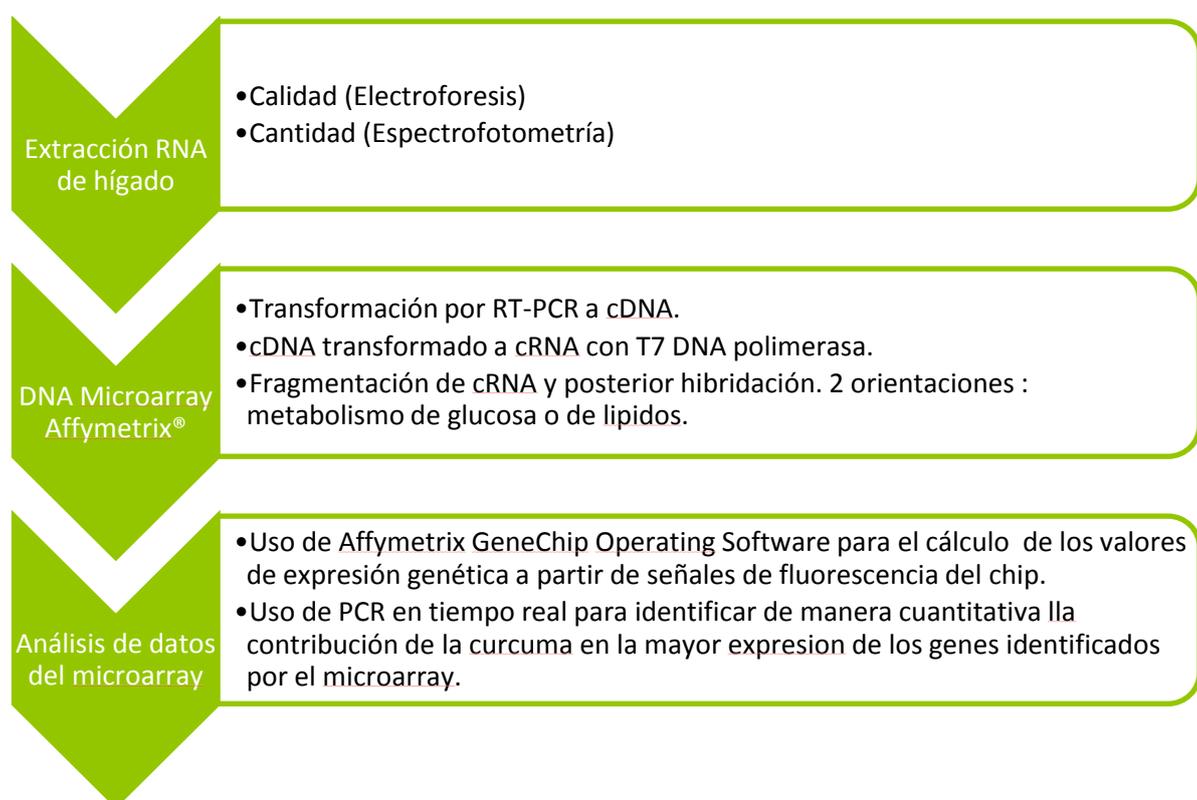


Fuente: (Rudrappa y Bais, 2008)

En la región de la selva del Perú crece una variedad de cúrcuma que se conoce como “palillo” el cual es un ingrediente muy importante en la elaboración de los “juanes” (plato típico de la región amazónica peruana). De acuerdo con Honda, *et al.*, (2006) la ingestión de la oleorresina y el aceite esencial de la cúrcuma por parte de ratas obesas y diabéticas, ocasionó una inhibición del incremento de la glucosa sanguínea y crecimiento de la grasa abdominal en los animales. Con la ayuda de un “microarreglo”, se investigó el cRNA proveniente del hígado de las ratas expuestas ya sea a los curcuminoides o a los aceites esenciales, para ello, se

procedió a la hibridación utilizando un chip comercial cuyo “*microarreglo*”, permitía estudiar 43 000 genes de ratón. Se estudió por separado la expresión de genes específicos del metabolismo de la glucosa versus genes del metabolismo de los lípidos. Ver Figura 61.

Figura 61. Esquema de la metodología seguida por Honda et al (2006) para la identificación del efecto molecular que fundamenta las propiedades bioactivas de la “Cúrcuma”



Después del escaneo de los chips y la identificación de los genes que habían sido modificados, para los cual se usó un software para analizar los datos del *mircoarreglo* y se procedió a verificar los resultados con pruebas cuantitativas de PCR en tiempo real.

D. Aplicaciones en el estudio de los genes de resistencia bacterianos.

Basados en esta tecnología de hibridación de ADN (Delgado, *et al.*, 2011) estudian los genes de resistencia de bacteria a los antibióticos en

productos lácteos como los quesos. Rudrappa y Bais, (2008) logran estudiar gracias a un sistema de “*microarreglo*”, el efecto inhibitorio de los curcuminoides en factores de virulencia identificados en el patógeno llamado *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Un agente patógeno tanto en plantas como en animales. Entre estos factores de virulencia se tienen la formación de bio-filme alrededor de las raíces de las plantas como por ejemplo las del género Arabidopsis. En este interesante trabajo, las células de *pseudomona* previamente tratadas con *curcumina* en cantidades inferiores a la mínima concentración inhibitoria (MIC) y cultivadas en medio LB (Merck®, 2005) fueron evaluadas por su capacidad de formar bio-filme ya que ésta es una característica muy importante que determina su patogenicidad. Esta capacidad fue evaluada primero en superficies abióticas y luego sobre la superficie del arabadopsis.

Las técnicas de la microscopía confocal fueron muy importantes para la evaluación de la formación de los biofilms. Después de identificar mediante evaluaciones de densidad óptica a 600 nm la concentración de curcumina que no inhibe el crecimiento de *Pseudomona*, se trabajó con una de esas concentraciones para identificar el efecto de la curcumina en los factores de patogenicidad, los que para este microorganismo significaba evaluar su capacidad de formar bio-filme, y su capacidad de biosintetizar Piocianina (pigmento con capacidad antibiótica), además de otros factores de patogenicidad tales como actividad elastasa/proteasa y producción de acil-homoserina-lactona (HSL).

Rudrappa y Bais, (2008) identificaron y cuantificaron las diferentes formas de HSL producidas por las pseudomonas tratadas con la ayuda de un HPLC y un espectrómetro de masas con sistema de ionización de electrospray (ESI-MS). Al notar que con el tratamiento con curcumina, efectivamente había una reducción de esta sustancia se podía empezar a predecir un efecto de ella en el “quórum sensing” celular ya que HSL es una sustancia importante para esta función. El “Quorum sensing”

constituye un fenómeno por el cual las células desarrollan un sistema de comunicación extracelular para la conducción de un comportamiento coordinado y para lo cual usan sustancias químicas auto inductoras que ellas mismas segregan. Para confirmar esto último recurrieron a técnicas moleculares como las de los *microarreglos* que se revisa aquí; El tipo de prueba utilizado en este caso fue el de un análisis de *transcriptoma* (análisis del conjunto de genes que se están expresando en un momento dado en la célula) utilizando el RNA de las células de *Pseudomonas* previamente tratadas con 3µg/mL de curcumina y utilizando chips con el material genético de esta especie bacteriana, se procedió a la hibridación y tratamiento de datos respectivos, con lo cual se logró identificar una disminución en la transcripción precisamente de los genes involucrados en el fenómeno de “Quorum sensing” y de inicio de formación de bio-filme. Rudrappa y Bais, 2008 utilizaron un *dChip* software, en las instalaciones de Ambion, Inc (Austin, TX). Este hallazgo de Rudrappa y Bais, (2008) es considerado muy importante ya que cuando se usan antibióticos para combatir las infecciones se genera “resistencia”, porque se ocasiona la muerte de la población predominante, generando un cambio en la constitución genética de dicha población. En cambio cuando se usa curcumina a una dosis inferior a MIC (Mínima concentración inhibitoria de crecimiento microbiano) se consigue un importante efecto de reducción de patogenicidad al inhibir los factores de virulencia del microbio sin que sea la misma curcumina la que genere su muerte de manera directa y se pudiera generar “resistencia” como ocurre con muchos antibióticos.

E. Aplicaciones en la industria cárnica.

Una característica como la capacidad de retención de agua (CRA) de la *cRNAe*, es muy importante en la determinación de su calidad y aceptabilidad para los consumidores. Un mal manejo durante el beneficio de los animales y durante el almacenamiento puede resultar en cambios indeseables; por ejemplo una caída brusca del pH post-mortem cuando la

temperatura es todavía alta produce la desnaturalización de las proteínas y el encogimiento de las fibras y la pérdida de CRA. Ponsuksili *et al.*, (2008) revisa que la carga genética del animal estaría influenciando en su respuesta a estos cambios con el entorno.

Para probar su hipótesis Ponsuksili, *et al.*, (2008) utilizaron un diseño estadístico “Sib-pair” (Gu, *et al.*, 1996) por el cual en 572 animales buscaron los pares discordantes en la característica CRA en *M. longissimus dorsi*, de puerco a fin de encontrar en ellos diferencias en la expresión de genes. Este diseño fue recomendado para evitar sesgos debido al diferente origen familiar de los cerdos (generación F2 del cruce de razas comerciales de Duroc y Pietrain) que podría afectar la expresión de los genes debido a diferencias genéticas y no a los factores medioambientales. En estos días ya que se conocen cuáles son los principales productos de transcripción para la especie *Sus scrofa* o sea cerdo, y en base a datos de secuenciación publicados en bases públicas como *UniGene Build 28* y GenBank® se han diseñado y ya existen en el mercado “arrays” con el genoma del porcino tales como el utilizado por ellos: el Affimetrix Gene Chip®. (Anonimo, 2009a) (Después de pasar el chip por el scanner, ellos pudieron evaluar 20 201 genes del puerco e identificar en cuales un cambio en la transcripción se relacionaba con un cambio en un aumento de CRA. Se logró identificar un aumento en la transcripción de los genes que tienen que ver con las proteínas de membrana, y proteínas de señales de transducción, de señales de comunicación y de respuesta a estímulos en el cito-esqueleto. Por otro lado identificaron una inhibición en la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de la energía tales como los genes que participan en el metabolismo lipídico y el transporte de electrones. Esta información ayuda a comprender todos los cambios biológicos que tienen lugar en el músculo después del beneficio. Los genes identificados con ayuda del micro “array” fueron analizados en pruebas de confirmación con qPCR en tiempo real.

F. Aplicaciones en la industria vitivinícola.

Becatti, *et al.*,(2010) aplican las técnicas moleculares en el estudio post-cosecha de la uva “Treviano” (cosechada a 20.8° Brix) pudiendo reportar los efectos de un cambio en la transcripción de genes y en el contenido de fenólicos después de tratar las uvas con 30kPa de CO₂ durante 3 días y un almacenamiento por 9 días durante el cual ocurre la deshidratación y pérdida de 20% de peso. Becatti, *et al.*,(2010) encontraron un comportamiento diferente si se trataba de la cáscara o de la pulpa de la uva. Observaron por ejemplo un incremento en las concentraciones de (+) catequina y epicatequina pero solo en la cáscara; esto favorecería la conservación de la uva ya que es conocido que estas sustancias son inhibidoras de *B.cinera* (hongo que infecta a las uvas), asimismo las altas concentraciones de CO₂ son inhibidores de varios hongos micotoxigénicos. Para el análisis en uva de los cambios en la transcripción de los genes siguieron un procedimiento similar a los anteriormente descritos usando un *microarreglo* con oligonucleótidos provenientes de *Vitis vinifera* construido por *AROS V1.0 platform* de Eurofins MWG Operon, Alemania, (<http://www.operon.com>) que para este caso cuenta con 14562 sensores que vienen arreglados en placas de 344 micropozos y 600 picomoles de oligonucleótido por sensor. Este microarray le permitió identificar cambios en la respuesta de transcripción, principalmente en las células del pericarpio al final del periodo de incubación. Se observaron los cambios en los genes que codifican para el metabolismo de proteína, stress, hormonas y transcripción a RNA. Con esta información los autores esperan que investigaciones futuras encuentren aplicaciones prácticas para los procesadores de uva tanto de mesa como para vinos.

5.2 Instrumentación Utilizada para las Técnicas Moleculares:

5.2.1. Para la extracción de ADN:

Son variadas las metodologías utilizadas, Algunas requieren de tanques y dosificadores de nitrógeno líquido. En algunos de los artículos por ejemplo Kim, *et al.*,(2010) optan en congelar el alimento con Nitrógeno líquido y luego al solidificarse y quedar quebradizo, lo pulverizan con ayuda de morteros.

Figura 62. Liofilizador modelo *Lyo Alfa* para laboratorios.



Temperatura final del condensador de -80°C , cuenta con bomba de vacío de doble etapa en el interior de la consola. Mayores detalles en: <http://www.telstarifesciences.com/es/tecnologias/equipos+de+liofilizacion/laboratory+freeze+dryers.htm>

En el caso de las muestras alimenticias conteniendo cantidades importantes de agua, es mejor liofilizarlas primero como etapa previa a la pulverización con nitrógeno. Esto se realiza con la finalidad de mejorar la pureza y rendimiento del DNA. Se encuentran en el mercado diferentes liofilizadores, (Ver Figura 62).

Cabinas de Flujo laminar tipo II, (Proporciona protección contra la contaminación al material derivado del alimento del cual se extrae el ADN, protege de la contaminación del medio ambiente y protege al operario). En este tipo de equipos, el aire recircula pasando por un filtro HEPA (filtro

compuesto por mayas de filtros dispuestos al azar), los cuales atrapan agentes biológicos infecciosos y partículas pero no ofrecen protección contra solventes. El aire que sale por el exhausto de la cabina de bioseguridad también pasa primero por los filtros HEPA antes de salir). Ciertas etapas durante la extracción del ADN se recomiendan hacerlas dentro de una cabina de bioseguridad a fin de reducir los problemas de contaminación.

Es común encontrar kits, conteniendo todos los reactivos necesarios y un protocolo ya establecido para acelerar la extracción del ADN. Kim, *et al.*, (2010) por ejemplo reportan el uso del kit Magnético Wizard®, Sistema de purificación de DNA proveniente de alimentos de Promega Corp (Madison WI); donde el uso de la cabina de bioseguridad tipo II (Ver Figura 63) en algunas de las etapas después del uso de los búferes de lisis ayudaría a prevenir contaminaciones en el DNA extraído.

Figura 63. Operador trabajando en una cabina de bioseguridad Tipo II

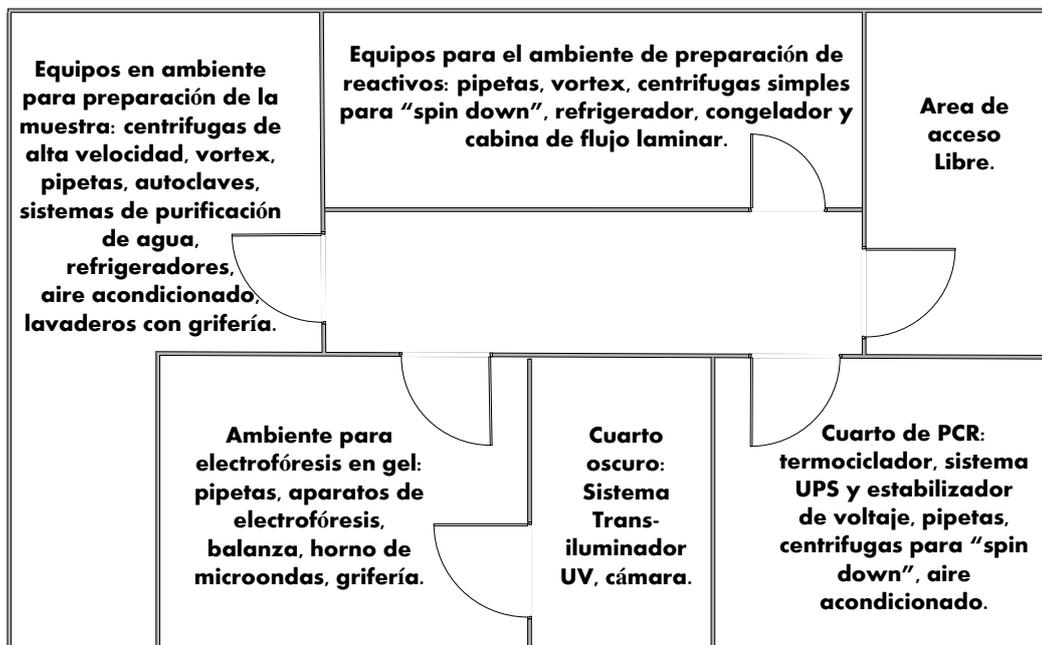


Fukasawa, *et al.*,(2007) reportan para el caso de la extracción del RNA el uso de un Kit llamado “QIAGEN RNeasy Mini Kit”. En ambos casos (los reportados por Fukasawa, *et al.*, 2007 y Kim, *et al.*, 2010) se necesitaron el uso de una centrífuga de laboratorio que permitió trabajar además de tubos con minitubos de 1.5 a 2 cm. Estas centrífugas deben ofrecer además la posibilidad de trabajar entre los -9 °C y 40°C, es decir

deben contar con sistemas de refrigeración. Asimismo son necesarios los sistemas Vortex; como también los incubadores con temperaturas de 22°C a 65°C y si cuentan dispositivos para agitación mejor; las Micropipetas estériles también son recomendables para innumerables aplicaciones. En algunos casos se podría requerir alguna micropipeta de multicanales pero dependiendo del tipo de protocolo a desarrollar.

Una vez extraído el ADN, se procede a la amplificación en los diferentes formatos de PCR existentes, dependiendo del objetivo del investigador. Para la parte de amplificación de material genético se revisan a continuación algunos equipos tales como los Termocicladores, y equipos de PCR en tiempo real. Para la parte de inspección y análisis del material amplificado se revisan los equipos tales como el nanodrop, electroforesis y equipos de blotting.

Figura 64. Diseño de un Laboratorio para Biología Molecular Según Roche ®



Fuente: (Anonimo, 2006b)

Según Roche®, una buena disposición del laboratorio (Ver Figura 64) contribuirá a que la muestra no se contamine, entendiéndose por contaminación a la mezcla o contacto accidental de la muestra con material exógeno a ella (tales como ácidos nucleicos u organismos microbianos), que la tornan impura o corrupta. Indican asimismo que las principales fuentes de contaminación surgen de: a) Contaminaciones cruzadas, con materiales del medio ambiente como aerosoles y otros y b) Contaminación con productos finales de PCRs realizados anteriormente. Tal como se indica en la Figura 64. Se recomienda que las área de extracción de ADN, deben estar separadas de las de amplificación por PCR como también de las de análisis post PCR. Asimismo el número de manipulaciones del ADN se debe mantener al mínimo.

5.2.2 Los Termocicladores.

Estos son equipos capaces de mantener estables un número mínimo de tres temperaturas que se irán intercalando durante las diferentes etapas del experimento de PCR (desnaturalización, acople de los cebadores y elongación de la cebadores) (Anonimo, 2006b) Debe asimismo permitir el cambio de una temperatura hacia la otra en un periodo de tiempo establecido, debe mantener los ciclos térmicos, repetitivos y reproducibles. La Figura 65 presenta alguna de las formas que adoptan las placas de uso común dentro de los termocicladores y en la Figura 67 se aprecian las partes de un equipo con todas las opciones recomendadas.

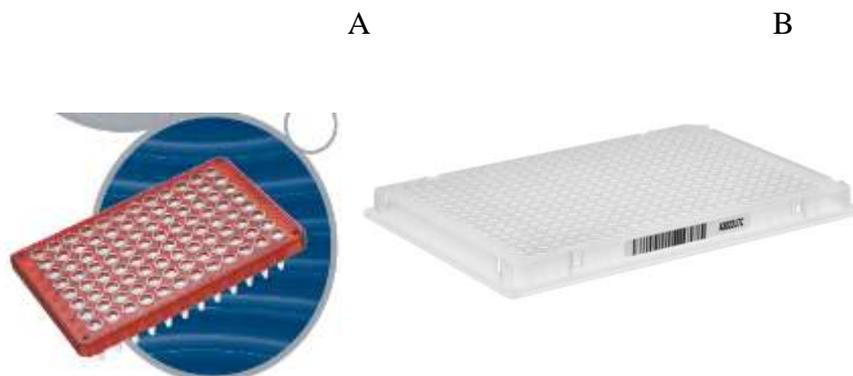
En la Figura 66 se presentan algunos modelos comunes de termocicladores presentes en el mercado. Para más marcas y modelos se sugiere ir al siguiente link:

<http://www.biocompare.com/ProductListings/33/Thermal-Cyclers-Thermocyclers-PCR-Machine.html>

Anonimo, (2006b) menciona los criterios que se deben tener en cuenta para la selección del termociclador, entre ellos los siguientes:

- Tamaño de muestra
- Tipos de soportes de muestra que permite el equipo
- Tipo de sistema de calentamiento: con fluido o con resistencia eléctrica controlada por sistema Peltier
- Tipo de control de la temperatura de la muestra: con tapa con sistema de calentamiento o con aceite mineral
- Tipo de control de las velocidades del calentamiento
- Sistemas a utilizar para el monitoreo de la temperatura
- Si el equipo permite la programación y automatización de estos controles
- Si el equipo cuenta con la posibilidad de optimizar los sistemas de PCR es decir si cuenta con un comando gradiente, que le permita controlar varias temperaturas preseleccionadas dentro de un mismo bloque térmico
- Si el equipo permite monitorear el producto acumulado
- Si el producto obtenido al final puede ser almacenado y si el equipo cuenta con un sistema de refrigeración para un corto periodo de almacenamiento.

Figura 65. Placas usadas en los termocicladores: A: Placa para 96 muestras modelo de Eppendorf B: Placa para 384 muestras MicroAmp® para trabajar en equipos de Applied Biosystems Real-Time PCR Systems



Un buen termociclador debe poder asegurar los parámetros térmicos en los ciclos de PCR que son importantes cuando se trabaja con Taq DNA Polimerasa para conseguir una buena amplificación según (Anonimo, 2006b):

1. Durante las etapas de desnaturalización inicial, temperaturas mayores a 94°C por dos minutos podrían ocasionar la desnaturalización prematura de la polimerasa inhibiendo la producción del amplificado de la PCR.
2. Temperaturas o tiempos de desnaturalización mayores a 94°C entre los 15 y 30 s una vez ya iniciadas las operaciones cíclicas podrían ocasionar una reducción en los rendimientos.
3. Temperaturas o tiempos mayores de 50 – 65°C (30 – 60s) durante el ciclo de alineamiento y acople a los cebadores, podrían ocasionar formación de productos no específicos. En realidad las temperaturas específicas dependerán de las temperaturas de fusión de los cebadores.
4. Temperaturas mayores a 72°C (45 s a 2 min) podrían ocasionar reducción del rendimiento e incremento de la tasa de errores.
5. Número total de ciclos recomendados: entre 25 -30, un número mayor de ellos se asocia a formación de productos no específicos.
6. Durante la etapa de la elongación final, temperaturas y tiempos mayores a 72°C por 7 minutos, ocasionan la formación de productos no específicos. Ver Figura 67.

Igualmente inconvenientes para los rendimientos son las temperaturas por debajo de los rangos óptimos; debido a ello en la elección del termociclador hay que prestar atención en que los sistemas que se empleen para el control de la temperatura sean exactos y confiables.

Figura 66. Algunos modelos de Termocicladores “máquinas para PCR” existentes en el mercado (Anonimo, 2008b)

MODELO DE INSTRUMENTO	Tipo de arreglo en placa para PCR	
Applied Biosystems	ABI 7000	A
	ABI 7300	A
	ABI 7500 Standard 96-well Block	A
	ABI 7500 FAST 96-well Block	C
	ABI 7900HT Standard 96-well Block	A
	ABI 7900HT FAST 96-well Block	C
	ABI 7900HT 384-well Block	E
	ABI 5700 (Perkin Elmer)	A
Bio-Rad	iCycler	A
	iQ5	A
	MyiQ	A
	CFX96	D
	Chromo 4 (MJ Research)	A
	Opticon (2) (MJ Research)	D
Stratagene	Mx3005p	A
	Mx3000p	A
	Mx4000	D
Roche	LightCycler 480 96-well Block	F
	LightCycler 480 384-well Block	G
Eppendorf	Mastercycler ep realplex	A

Tipo de arreglo en Placa para PCR. A, C, D o F: Se refiere a un arreglo en placa para 96 muestras entre genes en estudio y controles. E o G: Se refiere a un arreglo en placa para 384 muestras entre genes en estudio y controles, o 96 muestras entre genes en estudio y controles (con cuatro repeticiones)

5.2.3. Equipo de PCR en tiempo real.

Los equipos PCR en tiempo real, permiten visualizar la acumulación de producto amplificado con la ayuda de tintes fluorescentes u otros. Se le ha llamado a este sistema también “*PCR homogéneo*” ya que ocurre en un mismo tubo de reacción la amplificación y la detección. (Anonimo, 2006c).

Se ha observado la formación de un *plateau* cuando se grafica para cada ciclo de amplificación los productos de ésta (Ver Figura 68), siendo solo la cuantificación posible en la zona de la fase exponencial.

En general los sistemas de PCR en tiempo real detectan la fluorescencia generada por los sensores de amplificación de la región *diana*, etiquetados con algún tipo de molécula fluorescente (Ver Figura 50), los que son introducidos junto con todos los otros reactivos de la reacción y a través de ella correlacionan este valor con la cantidad de ADN amplificado. La Figura 68 muestra una curva típica en la que se observa una zona base o “background” y luego la zona exponencial que limitan los límites de detección inferior y superior seguida de la zona plana. Una vez identificada la zona exponencial, se puede extrapolar la concentración en esta zona partiendo de la cantidad inicial que sirvió de molde en cada reacción, con la ayuda del software del equipo.

Figura 67. Principales partes de un Termociclador: Tomado de Modelo Mastercycler de Eppendorf®



Fuente: (Eppendorf, 2008)

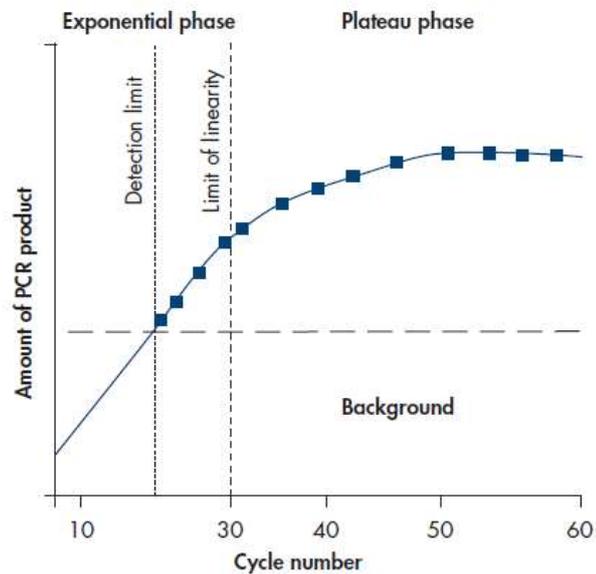
Son variados los modelos existentes en el mercado y además de las marcas reportadas en la Figura 66 se tiene modelos como el Rotor-Gene Q® de Quiagen conocido como muy robusto (Anonimo, 2010) para el cual existen en el comercio Kits, que trabajan con el colorante fluorescente verde SYBR (Ver glosario); Son notables también los modelos LightCycler® de Roche, (Anonimo, 2006c) donde se han reportado una serie de posibilidades para hacer investigación en base a sus capacidades de realizar determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos, estudios de polimorfismo de nucleótidos singulares, estudios de genotipado y validación en los estudios de microarray. Aquí se utiliza el modelo de la Figura 67 como ejemplo para estudiar las partes del equipo. El sistema consta de cuatro elementos principales, el instrumento, los materiales descartables tales como las placas de multipozos (las que cuentan con material para sellar los pozos después de llenados y evitar así evaporaciones sin necesidad de cubrir con aceite), el software y Reactivos específicos para las aplicaciones mencionadas.

Partes de un PCR en tiempo real.

Tomando como modelo el LightCycler® de Roche:

1. La fuente de poder
2. La ranura de carga de placas multipozos.
3. El sistema óptico que incluye una serie de filtros y espejos.
4. El termociclador
5. La unidad de la lámpara de Xenon.
6. La cámara

Figura 68. Cinética típica de los productos de amplificación vs número de ciclos en PCR. Tomado de (Anonimo, 2010)

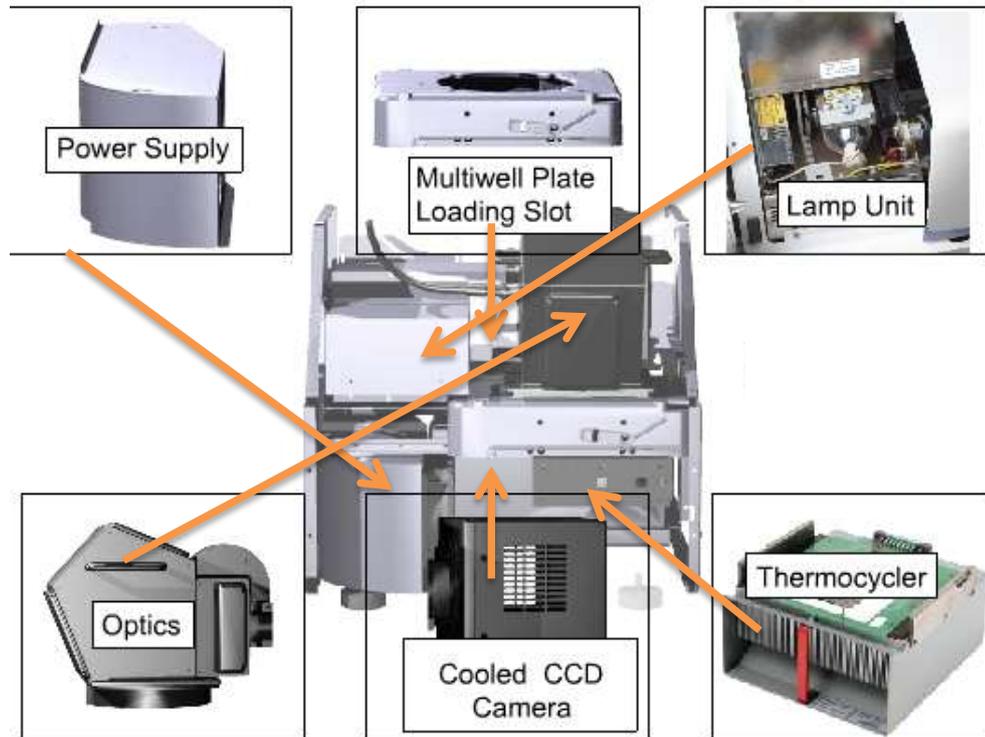


El termociclador en un equipo de PCR tiempo real:

Consiste en un bloque térmico que se ha diseñado para mantener la homogeneidad en la transferencia de temperatura en cada uno de los pozos de la placa. Esto último es importante para conseguir que los ciclos térmicos del termociclador, sean reproducibles. El sistema es un Peltiere consistente en dos placas de cerámica en medio de las cuales se encuentra un semiconductor. Mediante el paso de la corriente se genera el calor en una de las superficies y frío en la otra pero también se puede invertir la corriente para bajar la temperatura.

Figura 69. Partes de un Equipo de PCR en Tiempo real.

(Modelo LightCycler® de Roche) según: (<https://www.roche-applied-science.com/publications/multimedia/htc/presentation/wbt.htm>)



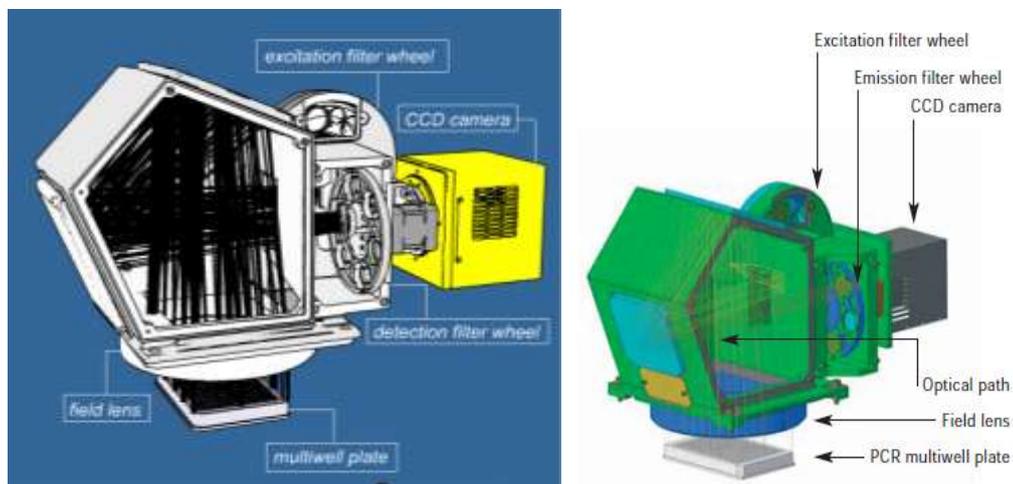
Debajo del sistema Peltier se encuentra una base térmica la cual está conformada de un espacio con vacío y con un fluido que al evaporarse y condensarse ayudan a disipar el calor y reduce el tiempo de enfriado y la duración de cada uno de los ciclos. Para cada una de las placas con la que trabaja el equipo: ya sea de 96 o 384 pozos, hay una tapa especial y termociclador que se cambia de acuerdo con el tipo de placa con la que se va a trabajar. La tapa tiene la función de prevenir la evaporación. Es capaz de calentarse hasta 100°C y de permitir las determinaciones de fluorescencia (Anonimo, 2008a).

El sistema óptico. Tiene entre sus funciones principales la recolección de los datos de fluorescencia de la placa, para lo cual la altura

de la fuente luminosa debe ser lo suficiente grande para permitir que la fluorescencia de los bordes de la placa como la fluorescencia de las partes centrales se pueda detectar con la misma intensidad. Los filtros son variados para permitir la excitación y determinaciones de emisión en las siguientes longitudes de onda: Excitación (nm): 440, 465, 498, 533, 618; Detección (nm): 488, 510, 580, 610, 640, 660.

La Lámpara. Por ejemplo, para el caso del sistema LightCycler® 480 de Roche, mostrado como ejemplo, se utiliza una lámpara de Xenon (430 - 630 nm). *La cámara.* Es una CCD (Ver Glosario) video cámara monocromática con sistema de enfriamiento Peltier, diseñado para eliminar el ruido causado por corrientes oscuras que se acumulan durante periodos de integración extendidos.

Figura 70. Partes del sistema óptico del LightCycler® 480 según Roche (Anonimo, 2008a)



Modelos adicionales de máquinas para PCR en tiempo real se pueden apreciar en la siguiente página:
http://www.eurofindna.com/fileadmin/PDFs/product_services/flyer_qpcr_instruments_probes.pdf. Donde además se observan los diversos sensores

de posible uso y los diferentes tintes con los que se puede trabajar encada uno de esos equipos.

5.2.4. Equipos utilizados para evaluar la calidad del ADN amplificado.

Entre estos equipos se tienen el Nanodrop (Figura 71), el equipo de electroforesis y los equipos para trabajar con membranas en diferentes formatos de blotting.

5.2.4.1 El equipo del Nanodrop™.

Es un tipo especial de espectrofotómetro que permite trabajar con cantidades muy pequeñas del orden de 1 μ l, directamente sin necesidad de diluirlas y con las cuales se suele por ejemplo medir a 260 nm las concentraciones de ADN y RNA purificado. Este equipo tiene la ventaja de que no requiere ni de cubetas ni de capilares que después se tengan que limpiar y es sumamente rápido; se pueden analizar 96 muestras en 6 minutos (Anonimo, 2009c). Puede hacer mediciones en el espectro UV/Vis 220 nm – 750 nm; y están diseñados de modo que pueden hacer determinaciones en paralelo de hasta 8 muestras. Estos equipos por lo general cuentan con software que les permite realizar un número variado de aplicaciones. Thermo Scientific® reporta un modelo en el cual también se pueden hacer estimaciones de fluorescencia (Desjardins y Conklin, 2010)

5.2.4.2 Técnicas de electroforesis y “blotting”.

Son dos técnicas muy utilizadas: la primera, la electroforesis, usada para separar fragmentos de ADN por lo general mediante tamaño o pesos

moleculares y la segunda, el “blotting” para caracterizar las fracciones previamente separadas, por electroforesis, identificando en ellas secuencias específicas de ADN. Para esto último se requiere transferir lo separado por electroforesis a membranas u otros soportes donde se realizan las técnicas de “blotting”.

Figura 71. Dispositivos claves en el equipo del NanoDrop™. Adaptado de (Anonimo, 2009c; Desjardins y Conklin, 2010)



Las técnicas de *blotting* han sido muy utilizadas en la caracterización por ejemplo de RNA y proteínas que surgen de la expresión de genes en estudio. Por ejemplo para estudiar en extractos de células lisadas, la mayor expresión o inhibición referencial de información genética con respecto a un control. Esta información es colectada para explicar otros fenómenos observados en respuesta a una serie de cambios medioambientales tales como cambios en la alimentación, ejercicio, etc; Una posibilidad de identificación que se usa en los “blotting”s consisten en exponer la

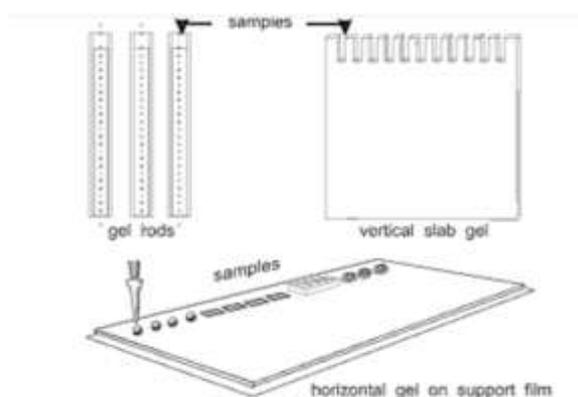
sustancia a identificar expuesta a un sensor el cual puede ser una secuencia de nucleótidos que hibridarían frente a una secuencia específica de RNA en dicha fracción separada o puede ser un anticuerpo que reconoce una determinada proteína y en cualquiera de los dos casos este “sensor” estaría etiquetado con alguna sustancia fluorescente o bio-luminiscente en la que posteriormente se detecta el efecto luminoso que queda registrado en un sistema de captura de imágenes. (Anonimo, 2009b)

Los avances de instrumentación en esta área han sido bastante acelerados en los últimos años, donde como se explicará en las siguientes secciones, se han diseñado equipos cada vez más pequeños y más rápidos tanto para la parte de la electroforesis en gel y la parte de caracterización por blotting. Se observa hoy que algunas compañías comercializan equipos tipo “chip” dentro del cual se realizan de manera simultánea la separación via electrophoresis y la caracterización via identificación con tecnología láser; como se explicará más adelante para el sistema *Experion*TM de: <http://www.biocompare.com/> (Figura 77)

5.2.4.2.1 Electroforesis en gel.

Se caracteriza por ser una técnica en la cual se hace uso de la fuerza eléctrica dentro de un campo eléctrico para mover las moléculas sobre un soporte de gel. Ver Figura 72. La muestra a separar se coloca en una especie de pocillos formados en uno de los extremos del gel y luego este se coloca en unos soportes donde es posible conectarlo al campo eléctrico, de esta manera se monitorea el movimiento de los diferentes componentes de la muestra debido a ese campo eléctrico (esto es lo que ocasiona la separación).

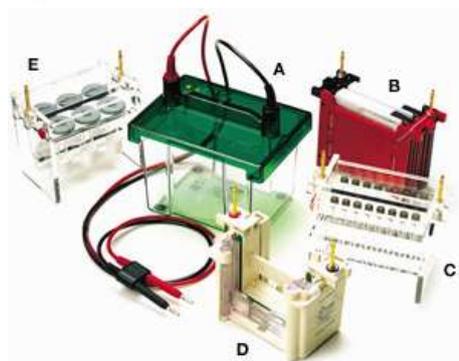
Figura 72. Sistema clásico para una separación electroforética.



En la figura el gel horizontal se introduce en la cubeta aquí abajo, la que se conecta al transformador de corriente.



Este es un mini-sistema para geles verticales de Bio-Rad®



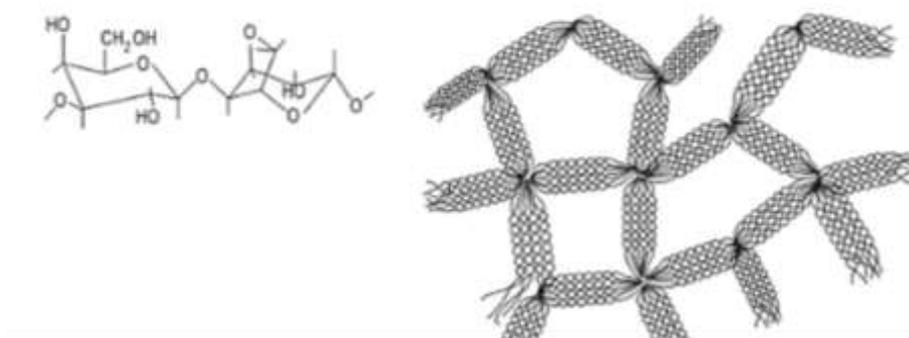
Fuente: (Westermeier, 2005; Anonimo, 2009b)

Los geles presentan la ventaja de tener tamaños uniformes y ajustables de poro. Los geles más usados en los métodos clásicos de electroforesis son los de Agarosa y poliacrilamida. La agarosa, Figura 73 es muy usada para el análisis de moléculas grandes (> 10 nm), siendo el tamaño final de los poros de agarosa controlados por la concentración de agarosa usada en la preparación del gel. En la Figura 73, según (Westermeier, 2005) se observa la formación de una doble hélix de agarosa durante el enfriamiento resultando en filamentos relativamente gruesos.

Para separaciones de ADN se recomiendan geles de agarosa en espesores entre los 1 y 10 mm; por el contrario para separaciones de proteínas (Westermeier, 2005) recomienda geles de espesores entre 1 y 2 mm. Por otro lado, la Acrilamida Figura 74 también es usada para la

preparación de geles para separaciones electroforéticas. Esta sustancia es químicamente inerte y mecánicamente estable. Se necesita aquí la adición de un agente reticulante como la bi-acrilamida metilada para la formación del gel. El tamaño de poro se controla con bastante exactitud controlando la cantidad de acrilamida utilizada.

Figura 73. Estructura formación de poros de un gel de Agarosa durante el enfriamiento. Según (Westermeier, 2005)

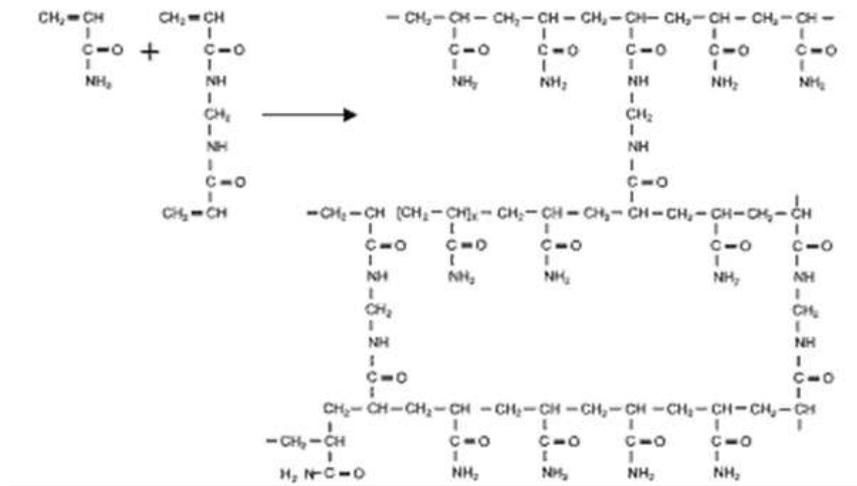


Una desventaja de estas técnicas es que las moléculas una vez separadas deben ser teñidas para poder ser visualizadas dentro del gel. Luego la imagen es capturada por una cámara bajo un sistema de luz UV/VIS. Según (Westermeier, 2005) entre las ventajas de usar los sistemas horizontales se tienen una mayor seguridad, la posibilidad de usar láminas de gel más delgadas y su mayor facilidad para la limpieza y uso que la hacen práctica para los trabajos cotidianos. Mientras que los sistemas verticales ofrecen la ventaja de poder usar geles más gruesos, que podrían por ejemplo permitir una mayor carga de proteína, además en los sistemas verticales se permite la posibilidad de correr más de un gel al mismo tiempo en el sistema, lo que no es posible en los sistemas horizontales. Sin embargo en los sistemas verticales es complicada la preparación de geles delgados y en general la limpieza es más complicada.

La electroforesis en gel se adapta a diferentes formatos, como por ejemplo la electroforesis por afinidad donde se hace uso de capacidad de algunas moléculas para unirse a las macromoléculas, por ejemplo los

diferentes tipo de lectina se unen de manera específica a las macromoléculas en función a los tipos de azúcares que ellas porten; es así que, esta unión modifica las propiedades electroforéticas permitiendo una mayor distinción de las bandas y su fácil identificación.

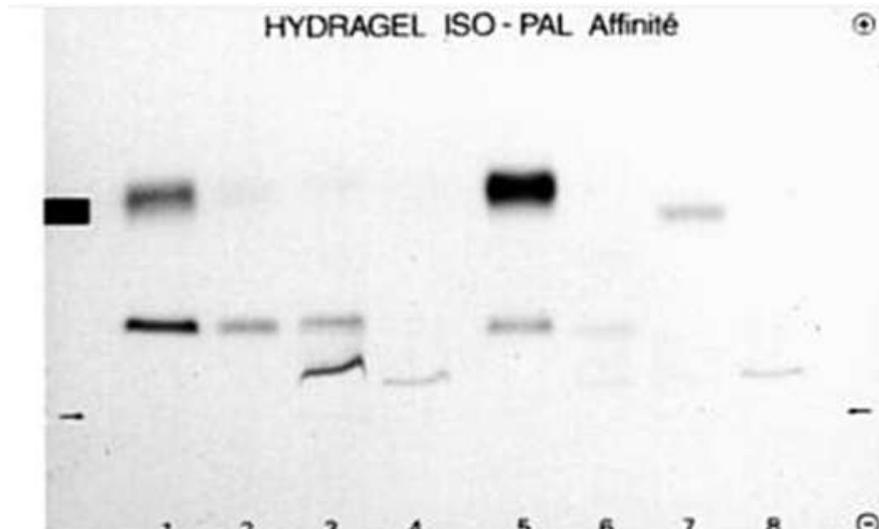
Figura 74. Reticulación de acrilamida formando poro.



Fuente: (Westermeier, 2005)

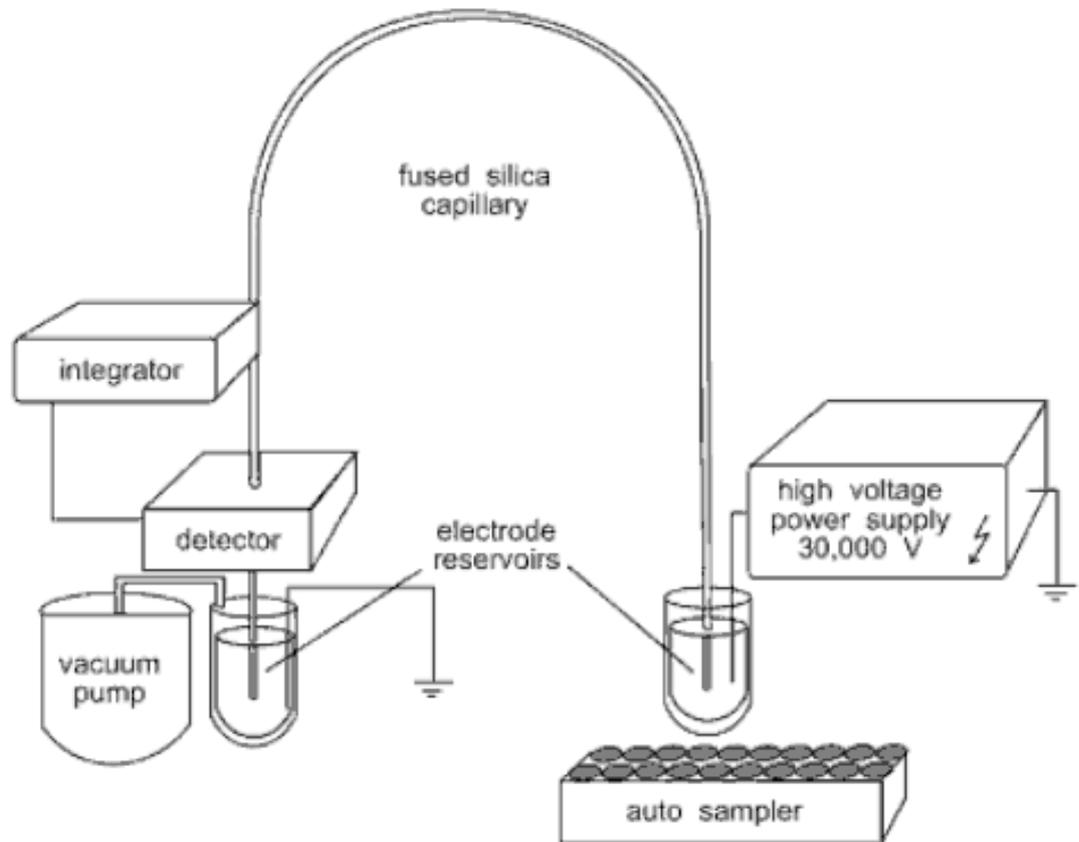
Otro formato de electroforesis en gel, que permite la separación de fracciones de ADN de alto peso molecular, es el de la electroforesis utilizando pulsos eléctricos (PFGE: Electroforesis en campo pulsado o pulsante). Durante la cual, se producen constantes cambios en los campos eléctricos que generan que las moléculas se estiren y luego se encojan tratando de adaptarse a esos cambios que son dados en un formato de pulsos. Las moléculas de diferentes pesos moleculares tendrán diferentes propiedades viscoelásticas y tomaran tiempos diferentes en reorientarse. Debido a ello algunas moléculas tendrán más tiempo que otras para migrar durante la duración de un pulso por lo que una separación entre ellas es más evidente (Westermeier, 2005).

Figura 75. Electroforesis de afinidad. Aquí, se logra separar la fosfatasa alcalina de hueso de la de hígado mediante la propiedad de la aglutinina de trigo por unirse a la fosfatasa alcalina de hueso y formar un complejo que queda típicamente en la parte de arriba del gel según lo reporta (Westermeier, 2005)



Una variante de la electroforesis que no necesita gel es la de la cromatografía de capilares HPCE (Electroforesis de capilares de alta performance). En este caso la separación se lleva a cabo en capilares de sílica (20 – 30 cm de longitud, con un diámetro interno de 50 a 100 μm) cuyos extremos están en contacto con las soluciones tampón conectadas a las fuentes de poder; los volúmenes de inyección son de dos a cuatro nL. En estos sistemas se usan voltajes de campo de 1kV/cm, que se consiguen con corrientes de 10 a 20 mA y voltajes de hasta 30 kW. (Westermeier, 2005). Se menciona asimismo que los detectores pueden ser de diferentes tipos tales como los detectores de absorbancia UV/VIS, fluorescencia, conductividad, electroquímica y otros. Los resultados son integrados y procesados por computadores. Ver Figura 76.

Figura 76. Sistema de Electrophoresis de capilares.

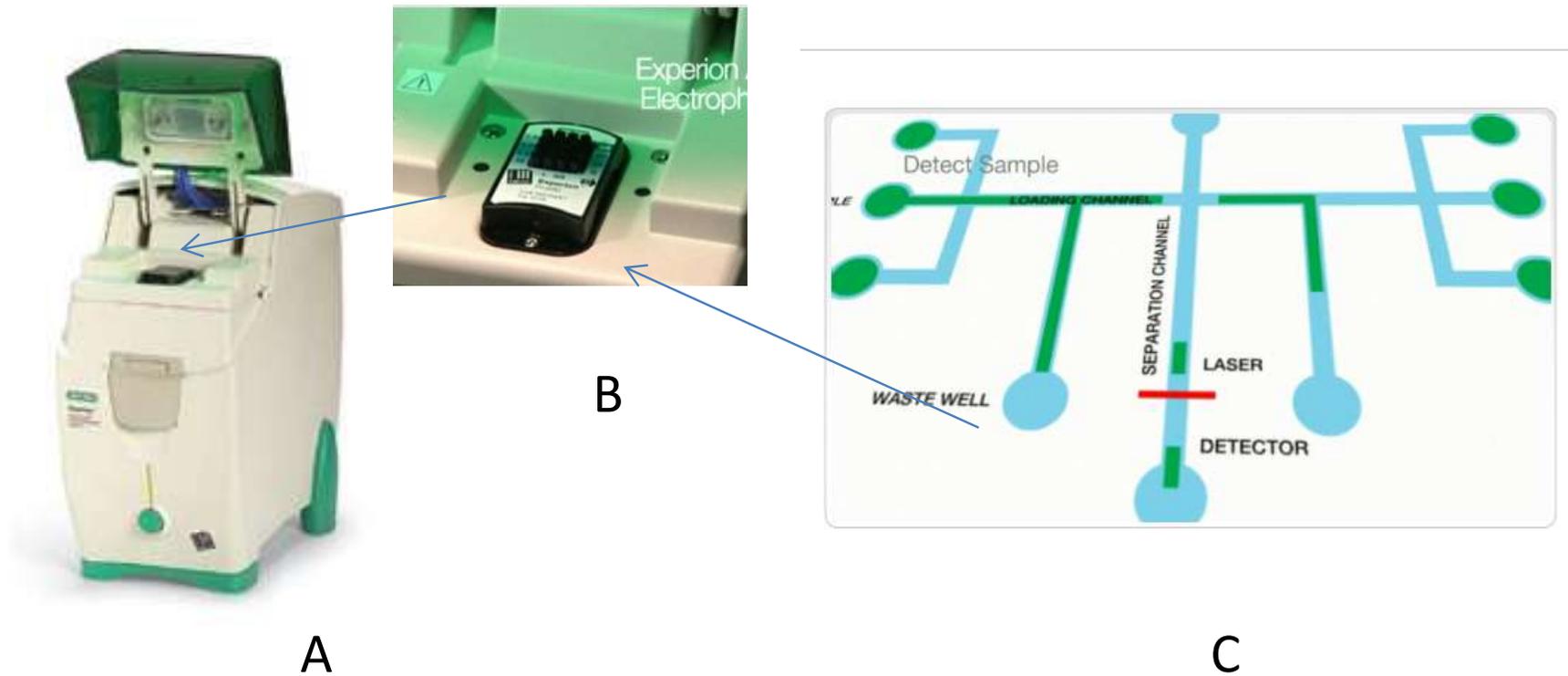


Fuente: (Westermeyer, 2005)

Un nuevo equipo de Bio-Rad® para el análisis de proteínas y RNA consiste en un sistema que integra las diferentes etapas de la electroforesis, separación, tinción, análisis y otros en su solo chip, conocido como el chip Experion Pro 260. Este sistema llama la atención porque puede determinar hasta 12 muestras en 30 minutos. Usa tecnología de microfluidos. Los reactivos y el gel son introducidos en un sistema de micro-canales construido con técnicas litográficas, y en donde se aplica la tecnología de los microfluidos para que al pasar por el micro-canal relleno de gel, las muestras se separen en función a un movimiento electroforético. Este chip se hace funcionar dentro de una máquina llamada estación de electroforesis automatizada Experion™, en la cual mediante un rayo láser aplicado en el

microcanal de cuantificación del chip, se logra cuantificar la fluorescencia de la partícula que se encuentra pasando en ese momento. (Figura 77). De esta manera se puede determinar la integridad de la molécula de RNA y su cantidad. Los resultados son analizados por una computadora y también se pueden presentar los resultados usando las manchas tradicionales como si se hubiera utilizado un gel, ya que la computadora es capaz de hacer esta simulación. Con esta metodología se pueden analizar cantidades muy pequeñas de muestra del orden del pico-gramo.

Figura 77. Sistema Experion™ para electroforesis de Bio-Rad. A: Estación electroforética automatizada. B: Chip, C: sistema de microcanales dentro del chip.



Fuente:

Tomado de: <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/adirect/biorad?ts=1&cmd=BRCatgProductDetail&productID=224301&vertical=LSR>

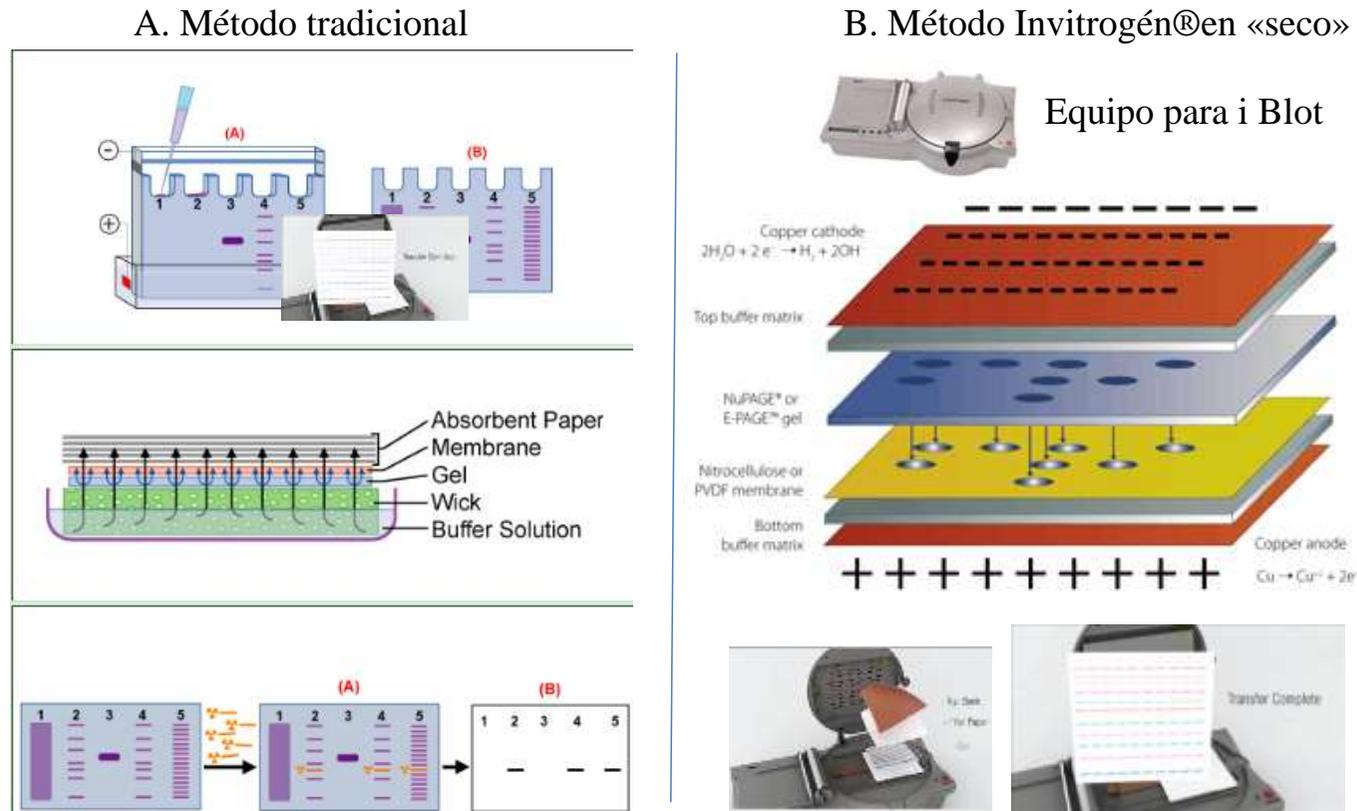
5.2.4.2.2. Técnicas de Blotting.

El “blot” es una técnica muy utilizada para caracterizar el ADN, RNA y proteínas, las que inicialmente se separan por técnicas electroforéticas y luego son transferidas del gel a un soporte el cual es por lo general una membrana de nitrocelulosa, PVDF o nylon. En dicho soporte las bio-moléculas son visualizadas mediante la adición de un colorante, un sensor radioactivo, un sensor de hibridación o con anticuerpos etiquetados con enzimas que desencadenan posteriormente una reacción bioluminiscente, la cual se registra en un sistema de registro de imágenes. (Ver Figura 78). Estas técnicas reciben diferentes nombres, por ejemplo si el diseño permite identificar proteínas se conoce como Western blotting; si permite la identificación de secuencias específicas de ADN por hibridación, se conoce como Southern blot; si lo que se investiga son secuencias específicas de RNA se conoce como Northern blot. Una reciente innovación en los equipos para realizar el blotting consiste en la presentada por la corporación Invitrogén® con su sistema “dry blotting” mediante el cual ya no es necesario utilizar tanques con soluciones tampón ni papel de filtro en capas. En vez de ellos en la parte superior e inferior del gel de donde se va a transferir el material a estudiar, se colocan unas colchonetas que vienen en sachet y que ya contienen todas las soluciones tampón necesarias y en la cual, la de la parte inferior cuenta con una membrana de nitrocelulosa o PVDF de 0.2 μm . (Ver Figura 78). El sistema asegura completar el blotting en sólo 7 minutos sin comprometer la calidad de la transferencia. El equipo que aparece en la pantalla aplica un voltaje el cual es dependiente del tamaño de la proteína para asegurar una transferencia total.

5.2.4.2.3. Lectores de Microarray “scanners”.

Estos equipos son definidos por algunos investigadores como microscopios confocales con barrido de fluorescencia invertido y controlado por computadora. Según (Xiang y Chen, 2000) basados en este principio son los modelos ScanArrayer 5000 de Watertown, MA, USA y el ScanArray 5000 de Packard.

Figura 78. Comparación de esquema de Blotting tradicional y Blotting en seco.



Fuente: <http://www.ehu.es/biomoleculas/isotopos/blot.htm>;
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Global/videoroom.html?vidNumber=6>

Otros modelos incluyen una CCD cámara para la captura de la imagen del microarray, después de que este es iluminado con luz láser en un sistema con enfriamiento. Diferentes marcas de “*Scanners*” para microchips, se pueden apreciar en la siguiente página web:

<http://www.images.technologynetworks.net/resources/mascanner.pdf>. Son notables los scanners modelos GenePix 4000B de Molecular Devices® que permite adquirir datos en dos longitudes de onda diferentes y de manera simultánea lo que le permite adquirir los datos de manera muy rápida, proporcionando acceso a los datos en tiempo real. Permite asimismo trabajar con diferentes superficies de microarrays.

BIBLIOGRAFÍA DEL CAPITULO 5

- Abdel-Rahman SM & Ahmed MMM. 2007. Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. *Food Control* 18(10):1246-1249.
- Abdullah T, Radu S, Hassan Z & Hashim JK. 2006. Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. *Food Chemistry* 98(3):575-579.
- AFFYMETRIX. 2006. GeneChip® System 3000Dx. Santa Clara, CA 95051 USA: AFFYMETRIX, INC.
- Alary R, Serin A, Maury D, Ben Jouira H, Sirven J-P, Gautier M-F & Joudrier P. 2002. Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. *Food Control* 13(4-5):235-244.
- Anonimo. 2001. Guidelines for RT-PCR. In: Quiagen, editor. *Benche Guide* p. 66 - 67.
- Anonimo. 2006a. Basic RT- PCR method. In: Roche®, editor. *PCR applications Manual*. p. Published Examples of Applications for the Light Cycler® Systems.
- Anonimo. 2006b. General Guidelines. In: Roche®, editor. *PCR applications Manual*. p. Published Examples of Applications for the Light Cycler® Systems.
- Anonimo. 2006c. Real Time PCR methods. In: Roche®, editor. *PCR applications Manual*. p. Published Examples of Applications for the Light Cycler® Systems.
- Anonimo. 2007. HotStarTaq® Plus PCR Handbook. In. *Handbooks & Protocols*. © 2007–2008 QIAGEN. <http://www.qiagen.com/literature/default.aspx?Term=semi+nested&Language=EN&LiteratureType=1+2+3+4+53&ProductCategory=0>.
- Anonimo. 2008a. The LightCycler® 480 System. Unleash the Potential of Real-Time PCR. In: *Diagnostics, R.*, editor. Roche Applied Science. Mannheim, Germany: Roche Diagnostics GmbH.
- Anonimo. 2008b. RT2 Profiler™ PCR Array Buyer's Guide. In: *Corporation, S.*, editor. *Focus on Your Pathway using qRT-PCR*. Frederick, MD 21703: SABiosciences Corporation.

- Anonimo. 2009a. GeneChip® Expression Analysis Technical Manual. In: Inc., A., editor.
- Anonimo. 2009b. Life Science Research. In: Bio-Rad, editor. Product Catalog. Hercules, CA: Bio-Rad.
- Anonimo. 2009c. NanoDrop™ Spektralphotometer. In: Ltd., P., editor.
- Anonimo. 2010. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. In: Quiagen, editor. Real-Time PCR Brochure. Hilden, Germany: Quiagen®. p. 5 - 6.
- Anonimo. 2011. Automated Sample and Assay Technologies: New PyroMark® Systems. In: Quiagen, editor. Product Guide 2010–11. p. 72 -74.
- Bai S, Zhang J, Li S, Chen H, Terzaghi W, Zhang X, Chi X, Tian J, Luo H, Huang W, Chen Y & Zhang Y. 2010. Detection of Six Genetically Modified Maize Lines Using Optical Thin-Film Biosensor Chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(15):8490-8494.
- Bai W, Xu W, Huang K, Yuan Y, Cao S & Luo Y. 2009. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. *Food Control* 20(4):366-370.
- Becatti E, Chkaiban L, Tonutti P, Forcato C, Bonghi C & Ranieri AM. 2010. Short-Term Postharvest Carbon Dioxide Treatments Induce Selective Molecular and Metabolic Changes in Grape Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(13):8012-8020.
- bioMerieux®. 2004. FoodExpert-ID®. Press Release. Marcy l'Etoile, France. p. 1 - 12.
- Cultek. 2011. PCR en Tiempo Real Introducción In. http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?P=Aplicacion_QPCR&opc=introduccion.
- Delgado S, Fracchetti F, Mayo B & Torriani S. 2011. Development and validation of a multiplex PCR-based DNA microarray hybridisation method for detecting bacterial antibiotic resistance genes in cheese. *International Dairy Journal* 21(3):149-157.
- Desjardins P & Conklin D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J Vis Exp* (45):e2565.
- Eppendorf. 2008. There's no way out! Mastercycler® pro with vapo.protect™. In: AG, E., editor. Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany.

- FIBAO. 2009. Pirosecuenciación. In. Medicina molecular de FIBAO. Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria de la Andalucía Oriental. <http://www.medmol.es/tecnicas/85/>.
- Fukasawa T, Murashima K, Matsumoto I, Hosono A, Ohara H, Nojiri C, Koga J, Kubota H, Kanegae M, Kaminogawa S, Abe K & Kono T. 2007. Identification of Marker Genes for Intestinal Immunomodulating Effect of a Fructooligosaccharide by DNA Microarray Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(8):3174-3179.
- Germini A, Mezzelani A, Lesignoli F, Corradini R, Marchelli R, Bordoni R, Consolandi C & De Bellis G. 2004. Detection of Genetically Modified Soybean Using Peptide Nucleic Acids (PNAs) and Microarray Technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(14):4535-4540.
- Gu C, Todorov A & Rao D. 1996. Combining extremely concordant sibpairs with extremely discordant sibpairs provides a cost effective way to linkage analysis of quantitative trait loci. *Genetic epidemiology* 13(6):513-533.
- Honda S, Aoki F, Tanaka H, Kishida H, Nishiyama T, Okada S, Matsumoto I, Abe K & Mae T. 2006. Effects of Ingested Turmeric Oleoresin on Glucose and Lipid Metabolisms in Obese Diabetic Mice: A DNA Microarray Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(24):9055-9062.
- Kim J-H, Kim S-Y, Lee H, Kim Y-R & Kim H-Y. 2010. An Event-Specific DNA Microarray To Identify Genetically Modified Organisms in Processed Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(10):6018-6026.
- Kong CS, Yu J, Minion FC y Rajan K. 2011. Identification of Biologically Significant Genes from Combinatorial Microarray Data. *ACS Combinatorial Science* 13(5):562-571.
- Lee MH, Cheon D-S & Choi C. 2009. Molecular genotyping of Anisakis species from Korean sea fish by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Food Control* 20(7):623-626.
- Lin W-F & Hwang D-F. 2007. Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control* 18(9):1050-1057.

- Mane BG, Mendiratta SK & Tiwari AK. 2009. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chemistry* 116(3):806-810.
- Marmiroli N & Maestri E. 2007. Polymerase chain reaction (PCR). In: Picó, Y., editor. *Food Toxicants Analysis*. Elsevier B.V. p. 147-187.
- Martín B. 2005. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. . Ingeniería Química Agraria tecnología Agroalimentaria (EQATA). Girona España: Universitat de Girona.
- Merck®. 2005. *Microbiology Manual*. 12 ed. Darmstadt Germany.
- Nordentoft I, Jeppesen PB, Hong J, Abudula R & Hermansen K. 2008. Increased Insulin Sensitivity and Changes in the Expression Profile of Key Insulin Regulatory Genes and Beta Cell Transcription Factors in Diabetic KKAY-Mice after Feeding with a Soy Bean Protein Rich Diet High in Isoflavone Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(12):4377-4385.
- Pafundo S, Gullì M y Marmiroli N. 2011. Comparison of DNA Extraction Methods and Development of Duplex PCR and Real-Time PCR To Detect Tomato, Carrot, and Celery in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(19):10414-10424.
- Pemov A, Modi H, Chandler DP & Bavykin S. 2005. DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. *Nucleic Acids Research* 33(2):e11.
- Ponsuksili S, Murani E, Phatsara C, Jonas E, Walz C, Schwerin M, Schellander K & Wimmers K. 2008. Expression Profiling of Muscle Reveals Transcripts Differentially Expressed in Muscle That Affect Water-Holding Capacity of Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(21):10311-10317.
- Purves W. K., Sadava D., Orians G. H. & C. HH. 2001. *Life: the science of biology*. In: Sunderland, M. S., editor.
- Rudrappa T & Bais HP. 2008. Curcumin, a Known Phenolic from *Curcuma longa*, Attenuates the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in Whole Plant and Animal Pathogenicity Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(6):1955-1962.

- Schmidt A-m, Sahota R, Pope DS, Lawrence TS, Belton MP & Rott ME. 2008. Detection of Genetically Modified Canola Using Multiplex PCR Coupled with Oligonucleotide Microarray Hybridization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(16):6791-6800.
- Schulumpberger T. 2004. DNA Test Identifies Animal Species in Food Products. *Food Technology* 58(8):44 - 49.
- Twyman R. 2003. DNA SEQUENCING How to determine the sequence of bases in a DNA molecule. . In. Euston Road, London http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD021036.html.
- Westermeier R. 2005. Electrophoresis in practice. ,4 ed. Freiburg-Germany: Wiley-VCH.
- Xiang CC & Chen Y. 2000. cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnology Advances* 18(1):35-46.
- Zhang J, Huang H, Cai Z & Huang L. 2006. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Control* 17(7):557-563.
- Zhang J, Huang H, Cai Z & Huang L. 2007a. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Control* 18(11):1331-1336.
- Zhang M, Gao X, Yu Y, Ao J, Qin J, Yao Y & Li Q. 2007b. Detection of Roundup Ready soy in highly processed products by triplex nested PCR. *Food Control* 18(10):1277-1281.

CAPÍTULO VI

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA INVESTIGACIÓN DE INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS. (Aplicaciones Prácticas)

La cantidad y el tipo de microorganismos presentes en un alimento es un aspecto importante de su inocuidad. La Red de Sub-tipificación Molecular para Vigilancia de Enfermedades, “Pulse Net” América Latina, reporta que de acuerdo con la OMS el 70% del origen de las enfermedades diarreicas agudas en la región se debió al consumo de alimentos infectados. De entre aquellos que pudieron llegar a un laboratorio para ser analizados, se pudo atribuir la causa a: bacterias, 45%, virus, 21% y toxinas marinas 20% y el 14% restante atribuido a parásitos, químicos y toxinas de origen vegetal.

(<http://fos.panalimentos.org/Default.aspx?alias=fos.panalimentos.org/pulsenet>)

6.1 Principales métodos de identificación de agentes causantes de ETAS.

Para analizar la carga microbiana de un alimentos, se han establecido a través del tiempo diferentes procedimientos: los basados en reacciones bioquímicas utilizando medios de cultivo (Ver Capítulo II); los basados en reacciones inmunológicas o enzimáticas (métodos rápidos), donde los formatos de ELISA (usando los lectores de micropozos) son frecuentes Ver Capítulo VII; y ,los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos (muy usados de manera complementaria) como los métodos moleculares con PCR (Downes y Ito, 2001) Ver Tabla 4. Como lo recuerda Michanie, (2005) se deben distinguir entre todas las posibilidades de análisis, las basadas en los “métodos de referencia”; éstos últimos consisten en procedimientos que son aceptados internacionalmente y se encuentran publicados por instituciones tales como: American Public Health

Association (APHA), autores del “Compendio de métodos para el examen microbiológico de los alimentos”, y de los Métodos estándares para productos lácteos. (<http://www.fda.gov/downloads/ICECI/UCM280461.pdf>)

Tabla 3. Comparación de las principales ventajas y desventajas de los diferentes métodos de identificación de agentes causantes de ETAS según los conceptos de Marmiroli y Maestri, (2007)

Métodos de Identificación	Ventajas	Desventajas
Los basados en reacciones bioquímicas utilizando medios de cultivo (Ver Capítulo II)	Convenientes por su bajo costo, reproducibilidad y confiabilidad.	No se puede determinar el subtipo. Intensivos en mano de obra. Consumen mucho tiempo. No permiten automatización, ni la detección de células muertas.
Los basados en reacciones inmunológicas o enzimáticas (métodos rápidos), muchas veces en formatos de ELISA (Ver Capítulo VII).	Rapidez, posibilidades de automatización. Efectivos con respecto al costo. Alto rendimiento en análisis.	Posibilidades muy limitadas para determinar el subtipo.
Los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos (muy usados de manera complementaria) como los métodos moleculares con PCR.	Alto poder de discriminación, con posibilidades para determinar el subtipo. Robustos, reproducibles y confiables, son rápidos y se pueden estandarizar, permiten la alta exactitud, automatización, y rápida detección posibilitando los ensayos cuantitativos.	Requiere de equipos especializados, reactivos costosos, personal altamente entrenado. Los métodos son considerados indirectos y todavía de limitada aprobación por las entidades regulatorias.

Una variedad de métodos estandarizados se pueden encontrar en las páginas web de Environmental Protection Agency de los EE.UU; Food Safety Inspection Service, Departamento de Agricultura de los EE.UU; International Commission of Microbiological Specification of Foods (ICMSF); Organización Internacional de Normalización (ISO); Codex Alimentarius (http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es) y American Association of Cereal Chemists (AACC); Son notables: AOAC International con los “Métodos Oficiales de Análisis”; y también, Food &

Drug Administration de los EE.UU con su “Bacteriological Analytical Manual” el cual se puede consultar fácilmente por la web. (<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>)

Es recomendable que antes de optar por un determinado método, en los casos donde los resultados serán compilados para solicitar algún tipo de autorización comercial, como en los casos de solicitud de registros sanitarios de alimentos se consulten las normas publicadas por las agencias reguladoras sanitarias de alimentos que en el caso de Perú son DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental). Dentro de esta institución, se cuenta con la Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis (DHAZ) quien norma los aspectos técnico sanitario en materia de alimentos, bebidas y prevención de las zoonosis controlando la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos y bebidas industrializados destinados al consumo humano interno y a la exportación. (<http://www.digesa.minsa.gob.pe/>).

6.2. Métodos moleculares utilizados en la identificación de agentes de ETAS.

Para los trabajos rutinarios de control de calidad durante el proceso y en los ámbitos de comercialización, son cada vez más usados los métodos rápidos. Dentro de éste grupo, son considerados como resultados definitivos, los basados en analizar la secuencia, de bases de nucleótidos, del ADN del microorganismo contaminante en los alimentos (Downes y Ito, 2001). En estos métodos, analizan una parte muy pequeña del ADN (una región génica). Scheu, *et al.*, (1998) hacen una revisión de las principales regiones génicas, usadas para amplificación, que son característica en de los principales microbios y virus transmitidos por los alimentos; esta región génica, se convierte en la región “*diana*” o “*target*” en todos los análisis subsiguientes. Dos de las técnicas moleculares más utilizadas para estos

objetivos son la “hibridación” y qPCR (PCR cuantitativa). Como ya se ha descrito en el Capítulo V, la hibridación, consiste en que un “*sensor*” formado por una secuencia de nucleótidos (monocadena) característica del ADN del microbio que se investiga; “*secuencia target o diana*” [que además, no es muy larga (20 a 2000 bases de nucleótidos)] se acopla a una secuencia complementaria, que se presentaría en el ADN del genoma microbiano extraído de la muestra (expuesto en forma de monocadena). Esto ocurre si en la muestra hay presencia positiva del microbio investigado; es decir si existe el ADN característico de ese microorganismo en la muestra, se producirá la hibridación de lo contrario no ocurrirá ya que la secuencia del ADN microbiano extraído del alimento, no presentará la secuencia correcta que permita un acople estable a los sensores. Según Downes y Ito, (2001) estos sensores, pueden identificar genes específicos como los de producción de toxina o secuencias en rRNA y ADN que son comunes a determinados grupos microbianos. La hibridación mencionada se puede realizar en fase sólida y en fase líquida. En la Tabla 4, se presentan algunas de las ventajas y desventajas reportadas para estas técnicas moleculares de identificación para agentes de ETAS. Una forma común de hibridación en fase sólida es la llamada hibridación con blotting de colonias; mediante este método las colonias son transferidas de los medios de cultivo a las membranas donde con la adición de algunos reactivos se lisan las células y se desnaturaliza el ADN de modo que se presente en su forma de *monocadena*; es entonces, cuando se adicionan los sensores y se observa la presencia de los marcadores que indicarían una hibridación positiva. Los kits comerciales de identificación, explotan los métodos de hibridación en líquido.

6.2.1 Ventajas y desventajas del análisis de microorganismos mediante técnicas de PCR.

Ver Capítulo II y Capítulo V para la descripción de la técnica de PCR. En esta sección, en la Tabla 4, se señalan los principales aspectos favorables y desfavorables de los métodos moleculares utilizados en la identificación de microorganismos. En la Figura 79, se muestran de manera comparativa diferentes combinaciones de técnicas de identificación y técnicas complementarias. En la Tabla 5 Se Describen las principales ventajas y desventajas de manera más extensa.

Tabla 4. Ventajas y Desventajas de las principales técnicas de identificación de material génico por PCR, según los conceptos de Marmiroli y Maestri (2007) Los Fundamentos de estas técnicas se describen en el Capítulo V.

Técnica de identificación	Ventajas	Desventajas
PCR - Cualitativa	Uso de equipos poco costosos, posibilidad de hacer ensayos tipo Multiplex PCR, Alta especificidad.	Consumen mano de obra y tiempo. Requiere de algunos análisis posteriores a la corrida del PCR. Difícil de automatizar. Requiere de procedimientos de enriquecimiento. Posibilidad de falsos positivos en los resultados.
PCR – Tiempo Real (PCR homogénea, PCR cuantitativa: qPCR)	Las reacciones son rápidas y tienen menos dificultad para contaminarse en la etapa post-PCR. Alta especificidad y sensibilidad, con posibilidad para automatizarse. Cuantificaciones en un rango dinámico.	Aparatos caros. Realizan multiplex, todavía con dificultad.
“Microarray” o Microarreglos (hibridación en arreglos predeterminados ya sea en medios sólidos o líquidos).	Detecta simultáneamente diferentes zonas génicas en los productos amplificados de tipo PCR. Sensibilidad y especificidad similar a la encontrada para ensayos PCR. Evita reacciones no específicas. Identificación basada en múltiples características. Posibilidad de análisis de muestras múltiples.	Desarrollo costoso de los “microarreglos” y requiere aparatos caros. Sesgo debido a reacciones de tipo multiplex para diferentes regiones “diana”. No permite cuantificaciones.

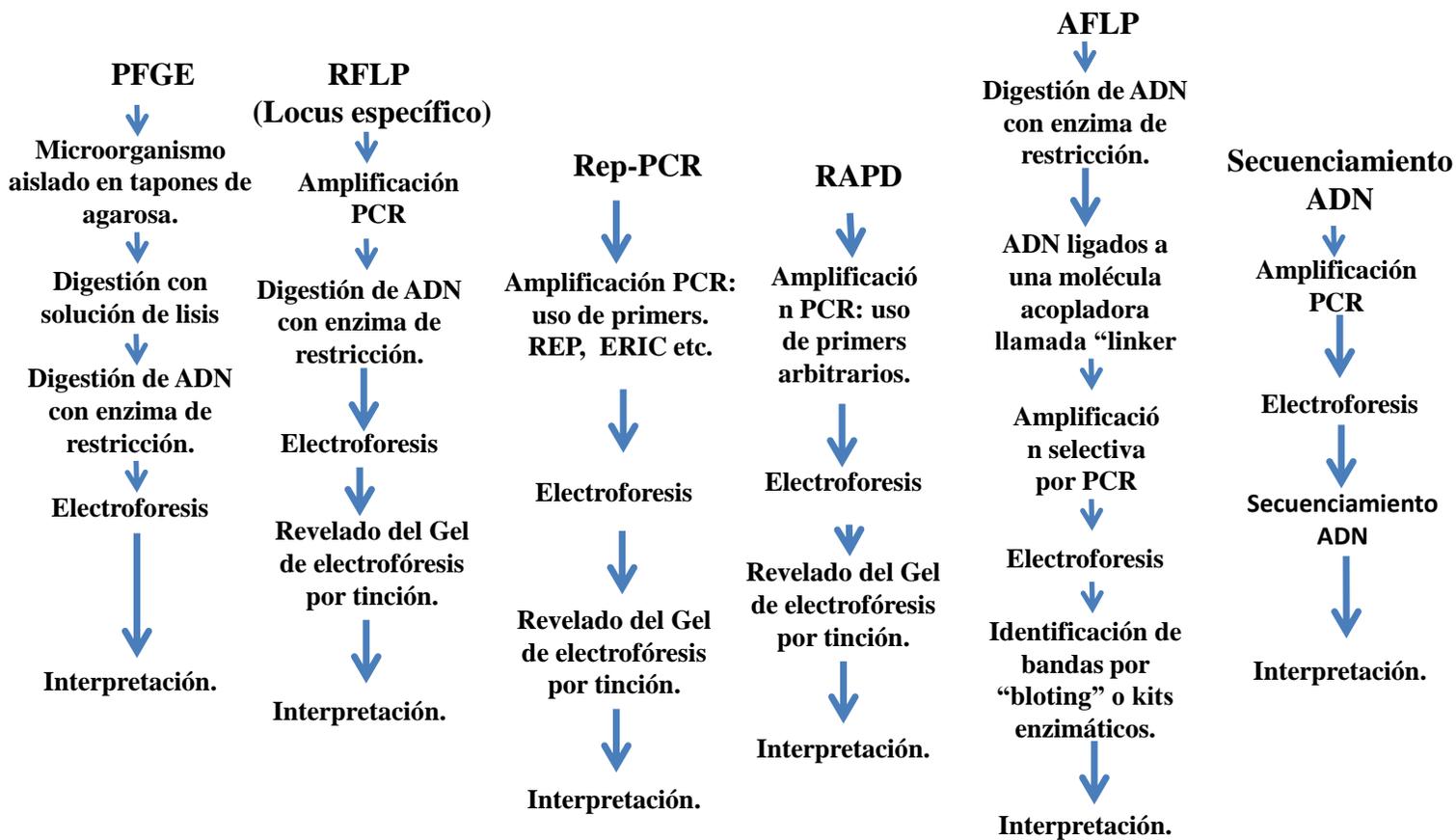
Tabla 5. Ventajas y Desventajas del análisis de microorganismos con uso de técnicas de PCR según Scheuet *al.* (1998)

<i>Ventajas.</i>	<i>Desventajas.</i>
<p>Identificación de los microorganismos con mayor rapidez, sensibilidad y especificidad.</p> <p>A diferencia de los métodos bioquímicos e inmunológicos (fenotipo), los métodos basados en el genotipado no son dependientes de la etapa de crecimiento del microbio ni de las condiciones medioambientales durante el desarrollo. Son así; más precisos y reproducibles (Fernández-Cuenca, 2004).</p> <p>Las técnicas moleculares de PCR amplifican una región muy selectiva del ADN, utilizando cebadores en diferentes formatos, permitiendo la identificación microbiana en una variedad de matrices alimenticias.</p> <p>De contar con ADN de la región “target” o Diana en cantidades suficientes se puede lograr una identificación instantánea PCR (tiempo real); o posterior, con el uso de técnicas adicionales, tales como las de electroforesis, hibridación y blotting.</p>	<p>Las principales desventajas para el análisis microbiológicos con técnicas de PCR reportadas son las siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. La sensibilidad es afectada por los métodos de extracción del ADN y la matriz del alimento. Esto es explicado por la presencia de sustancias en los alimentos que son “Inhibidoras” para la reacción de PCR lo que posibilita la aparición de falsos negativos. 2. La imposibilidad de la reacción de PCR para discriminar las amplificaciones de secciones de ADN proveniente de microorganismos vivos vs microorganismos muertos.

Tabla 5. Ventajas y Desventajas del análisis de microorganismos con uso de técnicas de PCR según Scheuet *al.* (1998)...Continuación.

<i>Ventajas.</i>	<i>Desventajas.</i>
<p>Es ventajoso el poder trabajar con los productos amplificados cuando el microorganismo no se puede cultivar artificialmente. Ejemplo: algunos microorganismos que viven en el fondo de los mares, no se pueden cultivar en medios artificiales a presión atmosférica. En este y otros casos, la posibilidad de amplificar el ADN y poder contar con cantidades suficientes para posteriores análisis es una gran ventaja. Las técnicas de hibridación con sensores fluorescentes, que son leídos posteriormente en una placa de micropozos han mostrado por ser de variada utilidad tanto para la identificación de patógenos como para la identificación de microorganismos fermentativos. El tener la posibilidad de seleccionar el tipo de cebador para la amplificación por PCR, tiene la ventaja de poder decidir a qué nivel se llegará con la identificación: género, especie o cepa.</p>	<p>3. Los mínimos niveles de detección son altos, (10^5 a 10^6 micro-organismos/ml) en los métodos de hibridación directa (sin amplificar) tales como los de Gene-Trak®, donde se llegan a estos niveles de detección a pesar de que se seleccionan para sus sensores de hibridación, zonas muy bien expresadas en los microorganismos tales como las de 16S and 23S rRNA .</p>

Figura 79. Cuadro comparativo de las diferentes técnicas moleculares utilizadas en la identificación de agentes ETAS en alimentos. Adaptado de (Olive y Bean, 1999)



6.2.2 Alternativas adoptadas, para vencer las desventajas mencionadas anteriormente.

La adopción de alternativas de solución a las desventajas que conlleva un análisis molecular en matrices alimentarias, ha permitido la reciente y amplia difusión de estos métodos en diversos mercados. Entre estas alternativas que se ha adoptado se tienen:

- Introducir controles de amplificación.
- La eliminación de las sustancias inhibidoras en la medida que esto sea posible. (Entre las principales sustancias inhibidoras se encuentran: los agentes formadores de quelatos, que acomplejan al magnesio divalente); la eliminación, de las enzimas nucleasas quienes dañarían los “*cebadores*” y la eliminación de los inhibidores directos de la enzima Polimerasa del ADN. Entre los inhibidores directos, se encuentran los hidrolizados de caseína en concentraciones de 0.1% w/v y el calcio; se atribuye este efecto inhibitor a la coagulación de la proteína. Se han observado problemas de inhibición en los análisis de muestras de queso blando. También son inhibidores (a menos que se encuentren diluidos de 10 a 50 veces) algunos componentes de medios de cultivo microbiano; tales como la esculina (6-(β -D-Glucopiranosiloxi)-7-Hidroxi-2H-1-Benzopirano-2-Uno), el citrato de amonio férrico, la acriflavina (3,6-Diamino-10-methylacridinium chloridehydrochloride) y las sales biliares. También son inhibidores, el ADN contaminante o no específico y los detergentes iónicos: como el desoxicolato de sodio o SDS. Martín, (2005) recuerda que una fuente muy común de ADN contaminante, es el ADN residual de una amplificación previa que utilizó los mismos cebadores, por lo que se recomienda la separación física de puestos de trabajos de la fase pre-PCR y post-PCR. Entre las técnicas bioquímicas que menciona la literatura para la

eliminación del ADN contaminante se encuentran la centrifugación diferencial; separaciones inmunomagnéticas; captura de microorganismos utilizando anticuerpos adheridos a billas magnéticas; uso de filtración en gel para purificar ADN y adición de BSA para evitar la actividad de las proteasas. El aceite, la sal, los carbohidratos y los aminoácidos no afectan las reacciones de PCR. A fin de evitar las sustancias inhibidoras, se puede realizar un subcultivo microbiano, el que permite al mismo tiempo seleccionar a las células viables; ésta selección también es posible cuando se analizan fracciones diferentes a las del ADN, tales como: usar RT-PCR (PCR de transcripción reversa) que permite el análisis del mRNA, una fracción generalmente intacta solo en los organismos vivos; también se puede optar por analizar el rRNA, fracción más estable.

- Utilizar métodos de detección del producto amplificado de alta sensibilidad. Son conocidos como menos sensibles los dependientes de la aparición de una banda sobre un gel de agarosa. Los métodos que dependen de sensores con bioluminiscencia son considerados más sensibles. Asimismo son más sensibles los que amplifican utilizando nested-PCR y los que dependen de copias múltiples de genes.

6.3 Descripción de los métodos moleculares usados en la identificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas.

6.3.1 Electroforesis en campo pulsado o pulsante (PFGE).

Es una técnica de referencia en bacterias y hongos “Golden estándar”, de mucha utilidad en el estudio de los brotes epidemiológicos. Permite determinar si un determinado microbio proviene de un mismo clon

o cepa original (microbios que comparten la misma huella genética; “*genetic fingerprint*”) y de esta manera poder tener información para llegar a la fuente original de contaminación (Fey, 2008). El procedimiento para un PFGE parte de aislados bacterianos ya sean en caldo o en medio sólido, los que se funden con agarosa y se colocan en moldes. Se obtienen unas formas sólidas en forma de taponcillos, conteniendo las bacterias enteras. Éstas son lisadas con una solución de lisis: una mezcla de enzimas con detergentes, luego el ADN es sometido a la acción de una enzima de restricción. Como resultado de ello el ADN cromosómico del microbio será cortado por la enzima en sitios específicos para su la acción. De esta manera el ADN se transformará en fragmentos, cuya longitud dependerá de la distancia entre los puntos sobre los cuales puede actuar la enzima y esto es único para una determinada cepa de microorganismo. De esta manera cuando los tapones son colocados en gel de Agarosa, se logran separar por electroforesis estos fragmentos y el patrón de bandas formadas tipifica la cepa microbiana. Ahora bien, como la diferencia entre los tamaños de los diversos fragmentos de ADN obtenidos no es muy grande, no se optan por los métodos convencionales de electroforesis, los cuales no separa tan bien estos fragmentos de alto peso molecular (> 600 kb), sin embargo, con electroforesis de pulsos, se obtienen buenos resultados. La electroforesis de pulsos ocurre en un campo eléctrico en el cual la orientación es cambiada en intervalos predeterminados y constantes, generalmente el voltaje va cambiando en tres direcciones: a lo largo el eje central (una dirección) y las otras dos direcciones, formando 120° con el eje a ambos lados. Los fragmentos son separados debido a que el ADN de diferentes tamaños reacciona diferente a los cambios de voltaje, requiriendo en algunos casos, sobre todo en los de mayor tamaño, mayor tiempo para resolver su trayectoria y alinearse a una nueva dirección y de esta manera se van separando. Las diferentes bandas formadas en el gel se pueden visualizar con tintes y fotografiadas para su análisis (Olive y Bean, 1999). Sin embargo el análisis requiere de algún software ya que el ADN no se mueve

en línea recta en el gel. Ventajas del método: Los resultados de diferentes laboratorios se pueden comparar si se usa un método y software estandarizado. Se puede acceder a bases de datos por internet en: Pulse Net (<http://www.pulsenetinternational.org>) en busca de un protocolo estandarizado, donde existe colaboración para los casos de brotes infecciosos donde es importante una identificación oportuna. Según Pulse Net Latinoamérica, en el año 2006, el Perú contaba a través de INS (www.ins.gob.pe) sistemas de PFGE implementados faltando sin embargo software para ayudar en la interpretación.

Desventajas del método: Según (Fernández-Cuenca, 2004) toma en promedio 4 días para la mayoría de los protocolos de obtención y análisis de pulstipos; según Clark, (2009) sin embargo se requiere un mínimo de 24 horas para la obtención de los resultados pero con uso intensivo de mano de obra. Comparar los patrones de un laboratorio a otro suele ser complicado, no es recomendado de realizarlo visualmente y se requiere de programas informáticos con los que se elaboran agrupaciones de tipo Clúster; la presencia de alguna mutación puede originar diferencias en varios fragmentos y el método depende de que la bacteria pueda ser aislada.

6.3.2 Análisis del número variable de tándems repetidos en locus múltiples (MLVA).

Un tándem consiste en secuencias de oligonucleótidos de ADN que se repiten varias veces a lo largo del genoma y es frecuentemente encontrado en las regiones intergénicas o extragénicas del ADN; estas repeticiones se ordenan de manera consecutiva, es decir, una detrás de otra; las regiones del ADN en tándem se llaman *satélite*. Cuando la unidad básica del tándem que se repite es pequeña (< 25 nucleótidos) se llama mini satélite, los que

son asociados por algunos investigadores a los procesos de regulación de la expresión génica. Algunos mini satélites presentan gran variabilidad en el número de tándems que se repiten en individuos distintos; éstos se conocen como VNTR (Número variable de tándems repetidos) y son una huella genética para el individuo. Los VNTR muestran variaciones en longitud entre individuos y cada variación representa un alelo heredado (son considerados resultado de polimorfismos multialelico); de esta manera, VNTR dependerá de la cepa microbiana. MLVA (“*Multiple-locus variable number tandem repeat analysis*”) analiza las variaciones en VNTR en diferentes puntos del genoma y es una técnica de sub-tipificado para bacterias (Clark, 2009). Para diferentes especies bacterianas ya existen datos de secuenciamiento del ADN que permiten identificar y seleccionar los VNTR a utilizar en el análisis. Se eligen VNTR pequeños del orden de 3 a 21 bases de pares y este método es ahora posible porque ya se conoce el genoma de la mayoría de microorganismos. Según (Clark, 2009), ésta técnica está incluida dentro de las metodologías utilizadas en Pulse Net para diferenciar cepas de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*, con el mismo patrón de PFGE. Brevemente el procedimiento incluye diseñar “primers” o cebadores que amplifiquen una región que incluya; VNTR mas una región conservada del DNA de la bacteria fuera de la región VNTR. Luego de extraído el ADN de la bacteria, éste es sometido a reacción de PCR con cebadores para realizar una amplificación de estas regiones. Luego se analiza el tamaño de los fragmentos por electroforesis ya sea en gel o en capilares; el tamaño de los fragmentos, dependerá del número de fracciones repetidas que tenga la muestra. Se han reportado buenos resultados con éste método para el “*sub-tipificado*” de los siguientes patógenos de alimentos: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*.

Otra técnica utilizada en la tipificación de bacterias, que también se relaciona con secuencias de oligonucleótidos que se repiten en el ADN es la

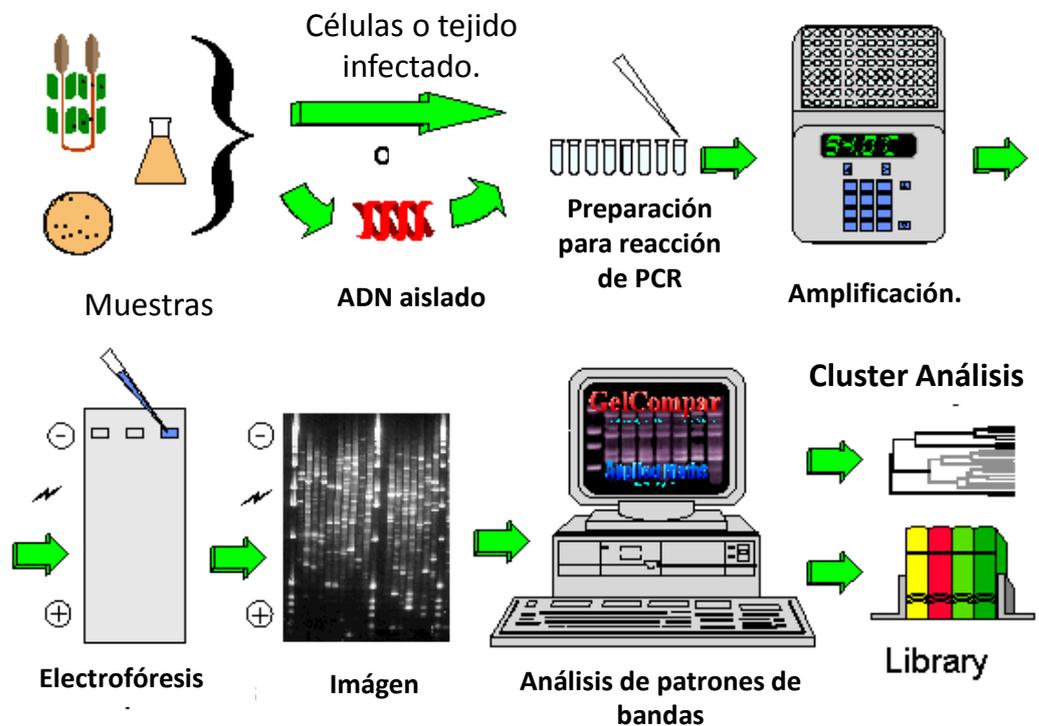
llamada Rep- PCR. Fernández-Cuenca, (2004) y Olive y Bean, (1999) describen el análisis de los patrones en gel de los amplificadores de las regiones repetidas palindrómicas extragénicas para la tipificación de enterobacterias, algunas bacterias *gram* positivas y hongos. Como nota aclaratoria, y tal como lo revisa Luque, (2001), una región palíndromica se refiere a una región del ADN en donde se observa que la secuencia de nucleótidos de una hebra, leída de izquierda a derecha, es igual que la de la otra hebra, leída de derecha a izquierda. En este caso se refieren a estas regiones con el nombre de “regiones *rep*” y con el nombre de Rep-PCR a la amplificación por PCR de las regiones delimitadas por cebadores que hibridan con las regiones *rep*. A diferencia del método anterior, aquí los cebadores hibridan en las regiones *rep* y lo que se amplifica son las regiones genómicas ubicadas entre estos fragmentos repetitivos. Según Fernández-Cuenca, (2004), la técnica Rep-PCR (Ver Figura 80) amplifica las regiones que separan las secuencias de nucleótidos *rep*, de modo que el polimorfismo encontrado se evidencia por la repetición variable de dichas secuencias y la distancia entre copias contiguas.

Es de notar como lo revisa (Martín, 2005), que las secuencias repetitivas del genoma se puede agrupar en tres grandes familias, donde las secuencias *rep* son sólo una de ellas siendo las otras dos las secuencias ERIC (Secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias) y las secuencias BOX también en regiones intergénicas a lo largo de todo el genoma.

Clark, (2009) señala para los métodos MLVA como:

Ventajas del método: Rápido, alrededor de 5 horas, poco costoso, no requiere muchos equipos. El número de “loci” a investigar se puede ajustar en función a la diversidad. Fernández-Cuenca, (2004) menciona como una ventaja de las técnicas Rep-PCR , su bajo costo, simplicidad (patrones de bandas sencillos) y rapidez (24 horas).

Figura 80. Esquema tomado de (Bruijn, 1997) para la metodología de ampliación de elementos repetitivos Rep-PCR “fingerprinting” y comparación de la resolución de Rep-PCR.



Comparación relativa:

Family	Genus	Species	Subspecies	Strain
				DNA sequencing
				16 S rDNA sequencing
				ARDRA
				DNA-DNA reassociation
				tRNA-PCR
				ITS-PCR
				RFLP LFRFA PFGE
				Multilocus Isozyme
				Whole cell protein profiling
				AFLP
				RAPD's APPCR
				rep-PCR

Desventajas del método: Toma tiempo la creación de cada sistema MLVA para una determinada situación de identificación microbiana. Se necesita examinar el secuenciamiento del ADN para identificar una región como candidata posible a VNTR. Los secuenciadores no están disponibles

en muchos laboratorios. Fernández-Cuenca, (2004) menciona como una desventajas de los métodos de Rep-PCR al hecho que a un mayor número de fragmentos de diferentes tamaños, también se generan un número de bandas mayor por lo que algunas de estas bandas estarían muy próximas y también señala que para algunos microorganismos el poder de discriminación y reproducibilidad son inferiores a las de PFGE.

6.3.3 Técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) y PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR).

Basadas en amplificaciones, usando uno (RAPD) o más (AP-PCR) cebadores pequeños (8-10 bases), los que hibridan con secuencias de ADN cromosómico a baja temperatura (Olive y Bean, 1999). Para una cepa bacteriana particular, los cebadores o “primers” arbitrarios usados permitirán que se amplifiquen fragmentos de una longitud característica para la cepa; estos fragmentos son separados por electroforesis y el patrón de bandas es característico para la cepa. Sin embargo se debe trabajar en la selección de los cebadores arbitrarios que funcionen para dicho microbio o usar un cebador estándar como el M13DNA. Fernández-Cuenca, (2004) menciona que si bien son métodos rápidos, son de baja reproducibilidad entre laboratorios y con poder de discriminación inferior al PFGE. En general las técnicas de AP-PCR son más complicadas que las de RAPD; Trevanich, *et al.*,(2010) incluye además que es una técnica más económica que RFLP y el ribotipado.

6.3.4 Ribotipado.

Se basa en que la mayoría de las bacterias contienen regiones bien conservadas del ADN que codifican para RNA ribosomal, la célula bacteriana típica contiene tres formas de RNAr, las que según (Martín,

2005) son: 23S, 16S y 5S. Se puede realizar entonces la amplificación de las regiones espaciadoras que separan los genes 23S y 16S (Fernández-Cuenca, 2004) obteniéndose un patrón de bandas típico para el microbio (bajo poder de discriminación). Martín, (2005) señala un procedimiento con el uso de enzimas de restricción (Mayor poder de discriminación) ANDRA (“Amplified ribosomal DNA restriction analysis”) donde los fragmentos obtenidos son separados por electroforesis y luego transferidos a una membrana de celulosa u otro donde se realiza un blotting; aquí se usan sensores que hibridan con las bandas que presentan las secuencias de los genes rRNA mencionados, y luego del revelado, estas podrán ser visualizadas (generalmente se obtendrán de 1 a 15 bandas); éstas bandas son comparadas para los diferentes microorganismos.

6.3.5 Polimorfismo singular de nucleótidos (SNP) “snip”.

Este método también según (Clark, 2009) surgió del conocimiento, generado a través del tiempo, de la secuencia de nucleótidos del genoma de un número variado de microorganismos dentro de una misma especie. En estas secuencias se detectaron que se presentaban mutaciones que cambiaban un solo nucleótido del genoma (SNP). Posteriormente se encontró que el análisis de múltiples SNP puede ser utilizado para diferenciar una bacteria. Asimismo las combinaciones de múltiples SNPs se pueden comparar y usar para determinar la relación evolutiva entre organismos.

Ventajas del método: Para identificar SNPs sólo se necesita hacer secuenciamientos de cadenas pequeñas que con métodos tales como la pirosecuenciación se pueden analizar un número grande de muestras y el sistema puede ser automatizado; permite el estudio de relaciones evolutivas; compartir información entre laboratorios y analizar hongos, bacterias y virus.

Desventajas del método: Conocimiento previo de datos de secuenciamiento para el microbio a estudiar; para dar una mayor información respecto a la diversidad se necesitará estudiar un número mayor de SNPs; requiere de secuenciadores automáticos.

6.3.6 Secuenciamiento de ácidos nucleicos en uno o varios loci.

Es una técnica que se puede utilizar para la identificación de bacterias dentro de una misma especie. Lo que hace esta técnica es secuenciar uno o varios “loci” (posiciones de los genes en un cromosoma) de un organismo. Un secuenciamiento “monolocus” es utilizado para la identificación de norovirus y hepatitis. La técnica conocida como tipificado por secuenciamiento en múltiple loci (MLST) se ha aplicado a bacterias y ha permitido una mayor información sobre la evolución histórica de las cepas. Generalmente los genes que son seleccionados para secuenciamiento son aquellos conocidos por ser de importancia para la supervivencia del microorganismo “housekeeping genes” y por lo tanto no son muy diversos. Las metodologías MLST ya están creadas para microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, o *Campylobacter jejuni* entre otros. Existe también otras metodologías que secuencian regiones de genes más diversos la cual se llama MVLST (Tipificado por secuenciamiento de múltiples locus de virulencia) donde Clark, (2009) reporta que se vienen usando para el tipificado de *Listeria monocytogenes*. Ventajas del método: Es usado para bacterias, virus y hongos; investiga relaciones evolutivas, puede ser automatizado. Desventajas del método: Se requiere tener conocimiento del secuenciamiento de ADN de los microbios a identificar, es trabajoso y algunas especies no son identificadas especialmente con MLST (Clark, 2009). Se necesitarían estudiar un número mayor de SNPs y se necesita de equipos especializados como los secuenciadores.

6.3.7 Técnicas de AFLP.

Según lo revisa Fernández-Cuenca, (2004), las técnicas utilizadas para la *tipificación basadas en amplificación de ácidos nucleicos*, tales como la PCR- RFLP (Descrita en el capítulo V, Ver Figura 49, Figura 79) donde se estudia la digestión realizada por enzimas de restricción en fracciones amplificadas del genoma o de secuencias polimórficas de ADN; no serían de un poder de discriminación mayor que técnicas tales como las de PFGE (dependiendo del microorganismo); sin embargo reporta también que para el caso de Salmonella, técnicas tales como AFLP (Estudio de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados), el poder discriminatorio habría sido superior que el de PFGE. En un AFLP, se amplifica de manera selectiva una parte de ADN cromosómico, el cual ha sido el resultado de la fragmentación realizada por una enzima de restricción. Olive y Bean, (1999) describen que el procedimiento incluye la extracción del ADN del microbio, el cual es sometido generalmente a la acción de dos enzimas de restricción; luego los fragmentos obtenidos son ligados a una molécula acopladora llamada “linker” o “adaptors”, la que une el sitio de restricción estudiado con una secuencia específica de nucleótidos capaz de acoplarse (hibridar) a los cebadores específicos que posteriormente serían añadidos junto con los otros reactivos para realizar la amplificación de estos fragmentos por técnica de PCR; los fragmentos luego son analizados y visualizados por medio de un gel. Rademaker, *et al.*, (2000) proponen que tanto la técnica de AFLP como la de Rep-PCR puedan ser consideradas como técnicas rápidas de “fingerprinting” para determinar diversidad taxonómica y estructura filogenética de aislados bacterianos. Según Fernández-Cuenca, (2004): Principal ventaja: sensible, excelente poder discriminatorio y es usada en centros de referencia. Desventajas: Laboriosidad, requiere secuenciador, patrón de bandas complejos (entre 40

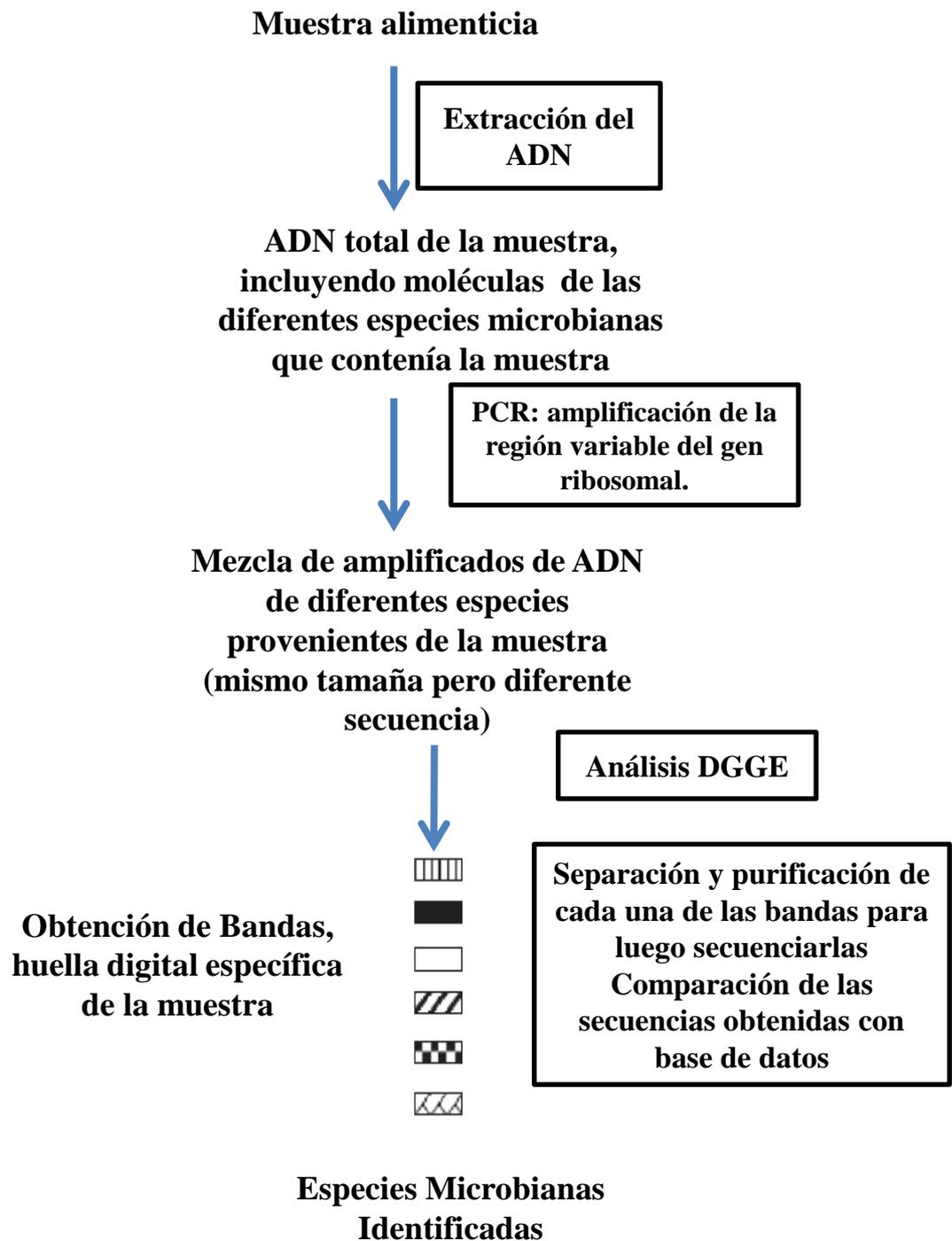
a 50 bandas de distintos tamaños) necesita software adecuado para su interpretación.

6.3.8 Técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).

Ver Figura 81. Utilizada en “fingerprinting” o sea en el trazado molecular o huella del microbio. Es una técnica que separa los amplificadores de ADN que se obtienen después de una reacción de PCR, pero se diferencia de la electroforesis en gel de agarosa, en que puede resolver o separar fracciones de número reducido de tamaño de bases y que difieren muy poco o nada en su peso molecular (Anonimo, 2004). Por ejemplo si queremos investigar la población microbiana de un bio-película, podríamos primero someterla a un proceso de extracción del ADN, el cual una vez extraído, sería sometido a un proceso de amplificación por PCR usando cebadores o iniciadores diseñados para amplificar una región en una familia génica como lo es la sección de 16SrDNA (gen ribosomal muy conservado y compartido por todas las especies bacterianas); éstas moléculas amplificadas tendrían sin embargo algunas diferencias en algunas secuencia de bases, dependiendo del grupo de microorganismos dominantes al que pertenezca; éstas diferencias sin embargo no se pueden visualizar en un gel de agarosa convencional ya que la diferencia en pares de bases es pequeña entre ellos. En cambio la técnica de DGGE separa basada en las diferencias en el perfil de desnaturalización de los diferentes amplificadores, las que dependen más en diferencias de secuencia que en diferencias de pesos moleculares; esto es, las moléculas inician su movimiento electroforético en un gel dentro del cual existe un gradiente de sustancia desnaturalizante, tan pronto la molécula en movimiento encuentre la concentración correcta para su desnaturalización, su movimiento disminuirá marcadamente. De esta manera se separan moléculas provenientes de diferentes grupos de microorganismos formándose bandas y

cada banda corresponde a una comunidad microbiana diferente. Para identificar posteriormente estas comunidades se pueden recurrir a “blotting”

Figura 81. Esquema del protocolo de DGGE- PCR según (Ercolini, *et al.*, 2001) para la investigación de los microorganismos dominantes en muestras alimenticias.



con sensores, o a un secuenciamiento, de estas regiones variables del gen, las que han sido separadas en cada una de las bandas o a algún otro método. Cuando se utiliza como elemento desnaturizante un gradiente de temperatura, la técnica se llama TGGE; de esta manera la temperatura en el gel va cambiando conforme transcurre la separación electroforética y las moléculas empiezan a detener su movimiento conforme llegan a su temperatura de desnaturización. En el campo de los alimentos las técnicas de DGGE han sido bastante utilizadas en el estudio de los sistemas de fermentación láctea (Ercolini, *et al.*, 2001) y también para el control de la presencia de prebióticos declarados en las etiquetas de los productos comercializados (Fasoli, *et al.*, 2003).

Ventajas del método: Permite la identificación y estudio de las comunidades bacterianas sin separación previa; existen diferentes compañías que pueden proporcionar equipos de laboratorio para la DGGE. Desventaja del método: Según (Muyzer y Smalla, 1998) Las diferentes temperaturas de almacenamiento de la muestra podrían afectar ya que es un método basado en la secuencia de 16SrDNA; El método siempre requiere de un procedimiento de extracción de ADN por lisis y purificación los que podrían ser no reproducibles; tanto los métodos de DGGE y TGGE sólo pueden separar fragmentos pequeños de hasta 500 bases de pares lo que limita la cantidad de información secuenciada y el diseño de los sensores; se han encontrado algunos fragmentos que difieren en su secuenciamiento y que no se resuelven; previo al análisis por DGGE y TGGE es necesario determinar el comportamiento de fusión de las cadenas del ADN en las condiciones del laboratorio y determinar cuáles serán los gradientes de desnaturizante, duración y la velocidad de la electroforesis.

6.3.9 Método de PCR en tiempo real con sistema de detección de tipo sonda fluorescente no dependiente de una secuencia específica.

Para poder determinar en el mismo tiempo en el que se produce la amplificación del genoma delimitado por nuestros cebadores de interés, se pueden utilizar moléculas llamadas sondas, algunas de ellas como las compuestas por el colorante verde: SYBR Green I, el cual se une de manera inespecífica a las secciones del ADN conforme se va formando una doble cadena por acción de la polimerasa. Esto es posible ya que el colorante en solución no tiene una fluorescencia detectable, pero cuando es incorporado en la doble cadena sufre un cambio conformacional que lo rinde fluorescente, emitiendo luz a λ 521 – 530 nm al ser excitado a una λ de 494 nm. (Anónimo, 2010a; 2006).

Ventajas del método: Permite monitorear la producción de la PCR en cada uno de los ciclos de amplificación, los métodos que utilizan SYBR Green I son sencillos de implementar y optimizar ya que sólo necesitan diseñar un cebador, cualitativa y cuantitativamente detecta los productos de PCR y RT-PCR

Desventajas del método: Como el colorante se une a cualquier doble cadena de ADN, no es específico a una determinada secuencia que estuviéramos investigando por lo que podría incluso unirse a cebadores o que pudieran haber hibridado entre sí sobrestimando la concentración real del amplificado, debido a esto último en los análisis cuantitativos se requiere un análisis de las curvas de fusión del producto a fin de fácilmente discriminar el amplificado de los productos “artifact” (Anónimo, 2006).

6.3.10 Combinación de hibridación con PCR.

Scheu, *et al.*, (1998) señala que los métodos que realizan una combinación de los métodos de PCR con los de hibridación a sensores, son

los métodos que pueden ser considerados confiables pero también rápidos para el análisis de patógenos y microbios de la fermentación en alimentos. En este sentido, en éstos últimos años los métodos que hacen uso de PCR-en tiempo real han aumentado su uso debido a que ahora se disponen en el mercado de kits, que permiten hacer las etapas de preparación de la muestra con rapidez (Anonimo, 2010b) y gracias a los métodos de RT-PCR la detección de virus transmitidos por los alimentos es posible. Uno de estos kits que comercializan todos los reactivos que se necesitan para el análisis de microorganismos por técnicas PCR es conocido con las siglas de BAX de la compañía DuPont Qualicom® (Dupont, 2006), quienes aducen la detección por técnicas de PCR en tiempo real automatizadas para su sistema, de microorganismos tales como Salmonella, Staphylococcus aureus, E. coli O157:H7 y Vibrio.

(http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/BAX_System/bax_realtime_EcoliH7.html). También se cuentan en el mercado los kits, “mericon kit para Bacterias en alimentos” de la compañía Qiagen™ quienes cuantifican así mismo la presencia del microorganismos con técnicas de PCR en tiempo real. A manera de ilustración del funcionamiento de kits de esta naturaleza, se describirá, por ejemplo, cómo funciona el kit BAX para la identificación de E. coli.

6.3.11 Sistema BAX para E. coli O157:H7.

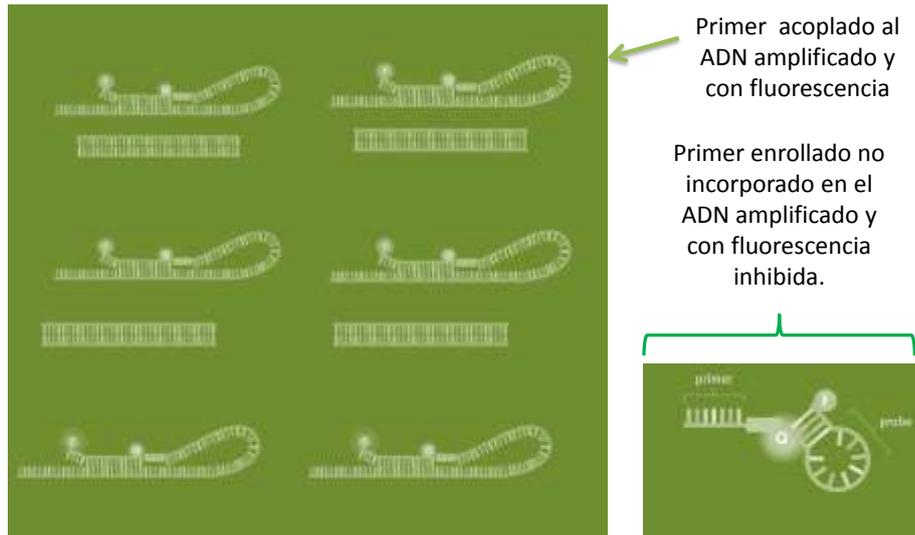
Este sistema funciona, mediante una etapa previa de pre-enriquecimiento. Una cantidad previamente pesada de la muestra es colocada en una bolsa del “Stomacher™” (u homogeneizador), donde es homogenizada con una cantidad de medio de enriquecimiento. Después de lo cual la bolsa es introducida en una incubadora por un periodo de tiempo (dependiendo del tipo de muestra) para el enriquecimiento, Luego una porción pequeña medida con micro pipeta es retirada a un tubo de prueba

que viene con el kit y que contienen todos los reactivos necesarios para la lisis de las células y la liberación del ADN. Esta lisis se realiza en tres etapas cambiando los tiempos y temperaturas de incubación de los reactivos con los reactivos de lisis, como sigue: 37°C por 20 minutos, 95°C por 10 minutos y enfriamiento a 5°C por 10 minutos. Una vez liberado el ADN de las células, éste ya se encuentra disponible para analizarlo con

la técnica del PCR en tiempo real del sistema BAX; con una micro pipeta entonces, se retira una cantidad medida del lisado bacterial y se usa para hidratar dentro de un micropozo, una pastilla conteniendo reactivos de PCR, luego de lo cual se procede con la reacción de PCR dentro de la máquina para tal fin del BAX. Dicha máquina conectada con una computadora y software asociado indicara con un signo positivo o un signo negativo la detección del microorganismo. Esta reacción de PCR toma solamente 55 minutos, sin embargo las etapas de pre-enriquecimiento, podrían tomar dependiendo del tipo de muestra entre 8 y 10 horas, siendo los niveles mínimos detectados del orden de 10^4 cfu/mL. El sistema ha sido validado por “AOAC Research Institute”. La mezcla que resulta en cada uno de los pocillos, contiene los reactivos de PCR, es decir los primers o “cebadores”, ADN de la muestra, y unos sensores que son unas moléculas fluorescentes acopladas a una secuencia de bases de nucleótidos (Figura 82). Estas bases son también complementarias a una parte del ADN que se quiere amplificar, la cual se puede enrollar sobre sí misma, cuando no existe suficiente cantidad de ADN amplificado para hibridar con él. Dentro de este sensor, también hay una molécula que es inhibidora de fluorescencia, la cual se ha acoplado de modo que se encuentre cerca de la molécula fluorescente en el caso de que el sensor se enrolle sobre sí mismo (lo que sucede cuando no hay ADN amplificado de la región “diana”). De esta manera el equipo de PCR de BAX va monitoreando la fluorescencia y con el software asociado puede conocer cuándo se ha producido un amplificado que corresponda a la secuencia de nucleótidos seleccionada

para el organismo de interés, en el caso de este ejemplo, la secuencia que permita identificar al E.coli.

Figura 82. “Primers” o Cebadores con sustancias fluoróforas utilizados en el kit de BAX para la identificación de E. coli O157:H7. Según DuPont ®. F: molécula fluorófora, Q: “quencher” o inhibidor de fluorescencia.



Fuente:

http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/BAX_System/bax_real_time_EcoliH7.html

6.4. Ejemplo de algunas aplicaciones de técnicas moleculares en el estudio de la inocuidad de alimentos.

Tal como lo explica Luttman, *et al.*, (2009) en las separaciones utilizando partículas paramagnéticas, las moléculas a separar son “marcadas” magnéticamente con estas partículas (paramagnético significa que sus características magnéticas solo ocurren bajo la acción de un campo magnético) Figura 83; las que se caracterizan además por no presentar coalescencia entre ellas.

En el ejemplo que discutimos aquí, el ADN de interés es marcado cuando hibrida con la monocadena de una fracción de ADN específico que

se colocó en la superficie de la nanopartícula, de esta manera cuando se activa el campo magnético, el ADN marcado es retenido y el no marcado eliminado o lavado. Luego de retirar el campo magnético, las nanopartículas y el ADN fueron rápidamente re-suspendidas para continuar con otros experimentos con el ADN ya seleccionado y además libre de impurezas que podrían haber inhibido reacciones posteriores.

El análisis de tipo multiplex PCR (Ver capítulo 5) seguido en la metodología de Amagliani (2010) implicó un etapa experimental previa para determinar la concentración más apropiada de los distintos cebadores a utilizar que no ocasionen formación de dímeros, para amplificar secciones específicas del ADN de Salmonella, de Listeria y para amplificar un control interno. Luego de encontrada la combinación correcta fueron todas incorporadas junto con el sensor fluorescente para realizar la PCR en tiempo real y previamente se estudió también en este caso los tintes fluorescentes más apropiados, que presenten longitudes de onda de emisión lo suficientemente separadas para permitir la cuantificación de cada uno de los microorganismos sin confusión. Ellos amplificaron secciones del material genómico de los microorganismos indicados que son consideradas bien conservadas; de esta manera para Salmonella usaron la región *ttrC* del gen y para Listeria la región *hlyA*.

El protocolo diseñado fue ensayado con muestras de salmón artificialmente contaminados con estos microorganismos, confirmando la capacidad del método para determinar la contaminación en concentraciones superiores a 10^2 a 10^3 ufc/g. Dicha capacidad fue confirmada frente a los métodos que utilizan medios de cultivo. Sin embargo en ambos métodos se requirió una etapa de pre-enriquecimiento en medio apropiado y en el caso del método de Amagliani, *et al.*, (2010) se usó un medio especial para multipatógenos. Se menciona como ventajas de este método, el hecho que cumplió con las exigencias de normas de calidad de la Unión Europea;

siendo exitoso en la detección de múltiples patógenos en matrices complejas en un tiempo más corto, para un resultado final definitivo. Es de notar que en estos ensayos de tipo multiplex, la eficiencia de la PCR no se ve afectada cuando se analiza más de un patógeno de manera simultánea.

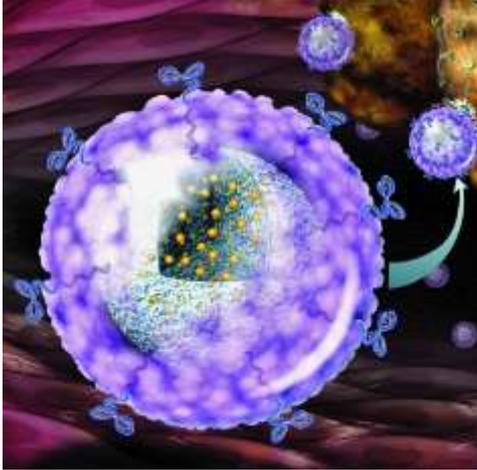
Es de notar la presencia en el mercado de un número cada vez más grande de kits comerciales tanto para la extracción del ADN, como para la amplificación, en ese sentido también encuentro interesante el trabajo de Amagliani, *et al.*, (2007) donde evalúa diversos kits comerciales y los compara con métodos no comerciales, en dos matrices alimentarias en las que era posible de encontrar sustancias interferentes, tales como el queso mozzarella y las salchichas de cerdo, la metodología utilizada por estos investigadores incluyó la adición a un homogenizado de estos alimentos con medio de cultivo de un nivel de contaminación de *Listeria* del orden de 10 a 10^3 ufc/g.

Entre los kits ensayados por Amagliani *et al.*, (2007) se tienen los siguientes: DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany); Puregene Yeast and Gram Positive Bacteria Kit (Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA); *Listeria monocytogenes* DNA Isolation Kit: Milk (Diatheva, Fano, Italy); Extracción con Fenol-cloroformo; y, el método de ebullición.

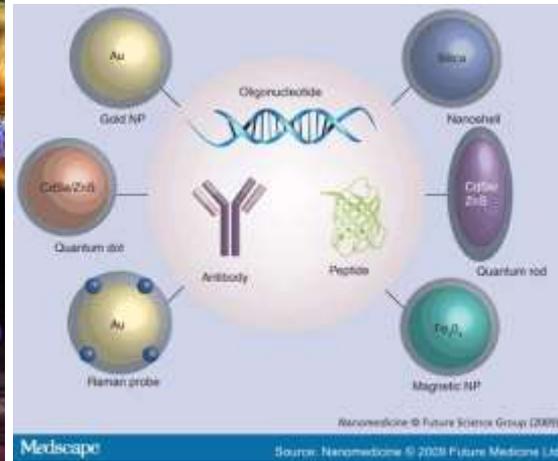
Después de evaluar la calidad del ADN y el rendimiento, se encontraron mejores resultados, en las muestras provenientes de salchicha que en las provenientes del queso. En términos de calidad, evaluadas a través del cociente A260/A280, mostraron ser mejores los kits de Qiagen, los métodos de extracción con fenol-cloroformo y el método de ebullición; mientras que en términos de cantidad fueron mejores los métodos no comerciales, seguidos de *Diatheva* y *Qiagen*.

Figura 83. Esquema de nanopartículas donde se observa la presencia de sensores superficiales de diferentes tipos.

A: Nanopartícula paramagnética.



B: Diferentes tipos de nanopartículas.



Fuente: A. Tomado de: <http://nanoparticles.org/Particles2010/targeted-nanoparticles.jpg> De Millenium Technology Prize ; B. Tomado de: <http://img.medscape.com/fullsize/migrated/587/000/nnm587000.fig1.jpg>

Luego con el ADN extraído de los microbios provenientes de estas dos matrices alimentarias estudiadas y con los 5 procedimientos de extracción ya mencionados, se procedió a evaluar el Kit PCR para *Listeria* de *Diatheva*, luego al observar las bandas que generaban los productos amplificados en el gel de agarosa, se pudo observar que para el caso del ADN de todas las muestras que habían sido contaminadas se apreciaba una banda de 172bp, por lo que el método permitió la detección *Listeria* en forma independiente del sistema utilizado en la extracción del ADN y a niveles de contaminación del orden de 1 ufc/g.

Trevanich, *et al.*, (2010) evalúa el método RAPD-PCR para determinar la presencia o ausencia de diferentes *Salmonella* sp en alimentos; cuando compararon esta metodología con los métodos tradicionales encontraron resultados comparables. Brevemente reportan que su metodología permite la identificación del microbio en 18 horas; de las cuales 14 horas son dedicadas a un pre-enriquecimiento en Caldo Nutritivo

a 37°C, seguido a ello se procede a la lisis de las células para lo que se recurre a la ebullición en el buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0 1mM EDTA) apropiado. Seleccionaron 8 cebadores singulares tomando al azar secuencias de uno de los genes de *Salmonella typhimurium* que codifica para la deshidrogenasa-galactitol-1-fosfato. Después de realizar la PCR con estos cebadores y hacer la separación de los amplificadores por electroforesis en gel de agarosa, se visualizaron las bandas con Bromuro de etidio; presentándose, en todos los casos de ADN de *Salmonella sp* una banda de 770 pares de bases; asimismo notaron que para el caso de *Salmonella enteritidis*, una banda adicional a 1584 pares de bases. Realizaron la evaluación del protocolo primero en muestra de cRNAe de pollo artificialmente contaminada con salmonella y luego de optimizado el procedimiento procedieron a evaluar 195 muestras de alimentos diversos tales como cRNAes congeladas importadas, huevos, vegetales, cRNAes de puerco y pollo del supermercado, encontrando que el límite de detección para determinar ausencia o presencia de *Salmonella* por esta metodología era de 1 ufc /25g de pollo autoclavado; éste límite de detección fue observado para el caso de las muestras contaminadas artificialmente, solo cuando se hacía el pre enriquecimiento ya descrito.

6.5 Identificación de especies animales.

En lo que respecta a las técnicas para la identificación de especies, tradicionalmente se han estudiado las proteínas, pero las técnicas de ADN presentan las ventajas de que a diferencia de las proteínas las que son muy termolábiles, el ADN es relativamente más termoestable y no es afectado por la edad o estado fisiológico del individuo (Rasmussen y Morrissey, 2008). En la Tabla 6 se presenta los principales métodos reportados para hacer identificaciones de este tipo.

Tabla 6. Técnicas de tipificación de especies basadas en el estudio del ADN con la finalidad de determinar el polimorfismo en el código genético de diferentes especies marinas. Adaptado de: (Rasmussen y Morrissey, 2008).

Técnica	Fundamento y Ventajas	Desventaja	Robustez de la técnica	Costo.
PCR	Requiere poco ADN inicial, y amplifica una sección de éste, delimitada por los cebadores, hasta niveles que se pueden analizar por técnicas complementarias. Es una prueba cualitativa.	Requiere de técnicas complementarias tales como electroforesis, hibridación, “blotting”, secuenciamiento, FINS, RFLP, AFLP, RAPD ó SSCP. Amplificación no cuantitativa.	Medio-Alto	Medio
FINS	Permite identificar especies mediante secuenciación de nucleótidos de una fracción amplificada de ADN. Permite hacer análisis filogenético por comparación con base de datos.	Para el análisis filogenético, necesita al menos dos modelos matemáticos y una cuidadosa selección del fragmento a amplificar (Seleccionar uno con alta variabilidad interespecie y baja intraespecie).	Medio-Alto	Alto
PCR-RFLP	Evalúa el polimorfismo en la longitud de los fragmentos generados por el uso de enzimas de restricción en las fracciones amplificadas de ADN. Permite identificar la especie. Es menos costoso que el método FINS	La longitud de los fragmentos tiene que ser visualizada en un gel de agarosa, o en un chip moderno de electroforesis. Requiere desarrollar un protocolo para la especie a identificar. Afectado por variaciones intra-especies.	Medio-Alto	Medio

Técnica	Fundamento y Ventajas	Desventaja	Robustez de la técnica	Costo.
PCR-RAPD	<p>Los amplificados por PCR con un cebador arbitrario generan un patrón típico para la especie. Método poco costoso usado para detectar fraude.</p> <p>Requiere mínimas cantidades de ADN.</p> <p>Hay protocolos ya desarrollados para diferentes especies animales.</p>	<p>Requiere de electroforesis, para obtener el patrón de separación. Existen problemas en la reproducibilidad del método, cuando las muestras se encuentran parcialmente degradadas. Pueden presentarse falsos positivos.</p>	Bajo - Medio	Medio
PCR-AFLP	<p>Dos enzimas de restricción digieren inicialmente todo el genoma. (El corte de una de ellas es más frecuente que el de la otra).</p> <p>Después de la amplificación en dos etapas, son obtenidos y separados por electroforesis un promedio de 100 fragmentos de ADN, los que son visualizados por fluorescencia obteniéndose una huella digital que permite el diagnóstico de la especie.</p> <p>No requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN.</p>	<p>Requiere de dos etapas de amplificación de los fragmentos de restricción con la ayuda de adaptadores que sirven de guía a los primers o cebadores. Cada una de estas amplificaciones reduce el número de fragmentos a un promedio de 100</p>	Bajo - Medio	Medio a Alto.

Técnica	Fundamento y Ventajas	Desventaja	Robustez de la técnica	Costo.
PCR-SSCP	Estudia el polimorfismo conformacional de cadenas individuales de ADN. Es menos afectada por variaciones intra-especie. Recomendado para discriminar entre dos especies muy relacionadas. Permite identificar diferencias desde un nucleótido.	Requiere etapas adicionales de desnaturalización del amplificado a monocadenas las que presentan estructuras secundarias dependientes de su secuencia. Requiere separaciones por movilidad electroforética en PAGE y visualización por tinción con plata. Requiere comparación con patrones y es más laborioso que el RFLP.	Medio-Alto	Medio

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; FINS: Secuenciado de nucleótidos forensicamente informativo; RAPD (“Random Amplification of Polymorphic DNA” Ver Capítulo 2); RFLP: Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de ADN; SSCP: Polimorfismo conformacional de cadenas no apareadas de ADN; AFLP: Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados.

Espiñeira, *et al.*, (2010) describe detalladamente una metodología para la aplicación en pescado y productos marinos, ya sea procesados o crudos, de las técnica del estudio del polimorfismo en longitud de los productos del amplificado de PCR (*AFLP*) usando cebadores específicos para la región de ITS1 del genoma del *Anisakis* (parásito en el pescado); los autores también discuten otra metodología más elaborada y costosa: RFLP-ITS1 para determinar simultáneamente las especies más importantes de *Anisakis*.

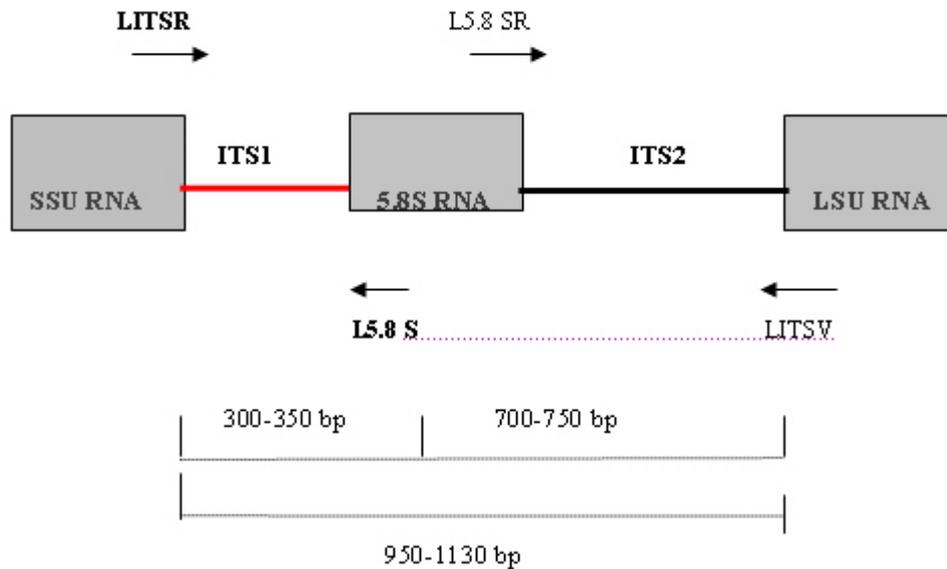
Como se revisa, el uso de la región ITS (Internal transcribed spacer) como marcador molecular, resultó conveniente debido a que es una región que conecta las regiones ribosómicas del genoma y que se caracteriza por que no codifica ningún producto a diferencia de las regiones ribosomales

que si lo hacen Ver Figura 84; por tanto, es una región que ha evolucionado en las especies y no es muy conservada como las regiones ribosomales, sin embargo las diferencias en secuenciamiento que se pueden observar en las regiones ITS son altas a niveles inter-especie y bajas o más bien estables a niveles de intra-especie, lo que permite la identificación.

De esta manera los productos amplificados por esta técnica pudieron ser clonados en la metodología de Espiñeira, *et al.*, (2010) utilizando un vector de Promega Corp., para posteriormente ser secuenciados en sus dos direcciones y enviados a GenBank para comparación con el banco de datos. Cuando ni el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de amplificado, ni el secuenciamiento de las fracciones específicas es suficiente para la identificación de la especie, se puede recurrir a la técnica de RFLP-ITS1 (Figura 85), donde tal como lo menciona Martín, (2005) es una técnica en la que se utilizan enzimas de restricción para hacer una digestión inicial de la parte del genoma seleccionado para el estudio, que en este caso particular del ejemplo de Espiñeira, *et al.*,(2010) es la región ITS-1, los productos obtenidos de la digestión son posteriormente amplificados y se estudia el patrón obtenido en el gel. Ver Figura 85.

Respecto a las técnicas moleculares propuestas por Espiñeira, *et al.*, (2010) para la correcta identificación de las especies del nematodo *Anisakis*, se debe mencionar que éstas tendrían la ventaja con respecto otros métodos, incluyendo los métodos inmunológicos, en que no se presentan los casos de reactividad cruzada y que en el caso de los métodos moleculares se puede trabajar con productos procesados o enlatados, cosa que no es posible por ejemplo cuando se usan los métodos estereoscópicos de identificación. Es interesante notar que Espiñeira, *et al.*, (2010) ensayó también la automatización del procedimiento utilizando un CEQ 8800 *Genetic analyzer*, con el cual utilizando un equipo de electroforesis de capilares pudo determinar la longitud de los fragmentos.

Figura 84. Esquema que presenta las regiones de ITS, conectando a las regiones ribosomales del genoma del Anisakids, según (Al-Jawabreh, 2005).

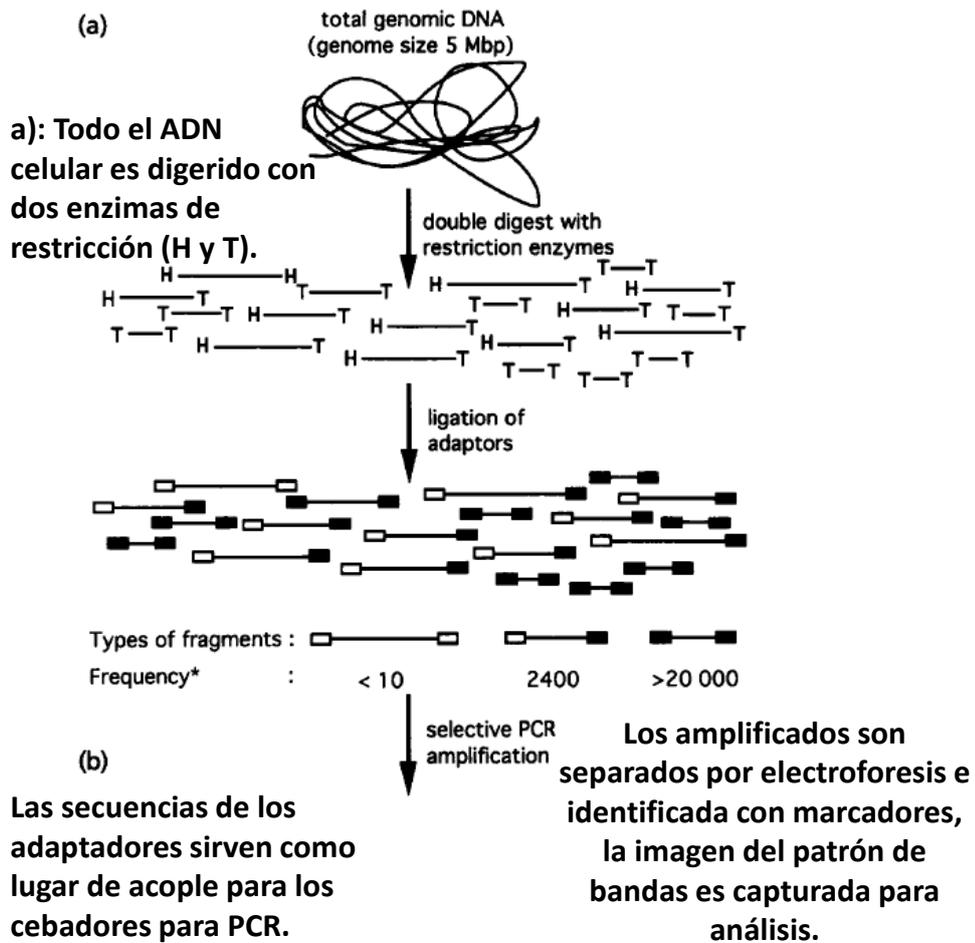


Otra aplicación importante de las técnicas moleculares se da en el caso del estudio de las sustancias alergénicas; éstas sustancias afectan la inocuidad de los alimentos y para ello, las técnicas moleculares tales como la de PCR en tiempo real contribuyen a su control e identificación, aprovechando que la producción de estas sustancias en el vegetal está codificada en los genes y con los avances en la construcción de mapas genéticos para diversas especies, ya existe información para el desarrollo de metodologías analíticas moleculares como lo observamos en la literatura especializada.

Arlorio, *et.al.*,(2007) describe un procedimiento para el desarrollo de la metodología de análisis de estos genes que codifican para la producción de alergénos en el caso de la oleaginosa avellana *Coryluspp.*, llamada también *Hazelnut* (macadamia); su metodología propuesta investiga sobre la identificación de éstas sustancias; primero, con uso de una metodologías cualitativas, utilizan cebadores universales para la región ITS en un PCR

utilizando sólo un termociclador; y luego mediante ensayos cuantitativos, usa la técnica PCR en tiempo real para lo cual prueba dos tipos de sensores: el *Sybr Green* (Descrito más arriba en esta sección), y los sensores Taqman® (Discutidos en el Capítulo 5).

Figura 85. Esquema del RFLP- PCR



Fuente:(Janssen, *et al.*, 1996)

Arlorio, *et al.*,(2007) enfatiza la importancia de identificar la técnica más apropiada para la extracción del ADN ya que permitiría la eliminación de sustancias inhibitoras las que en este caso incluyen aceites y grasas. En la Tabla 7, compara un método no comercial de extracción con el método del kit de extracción, los cuales ya existen en el mercado, e incluyen todos los reactivos necesarios más el protocolo de extracción. De estos kits

estudiados, el que dio los mejores resultados para este grupo fue el kit *WizardMagnetic* de Promega®, permitiendo obtener un alto rendimiento y pureza; éste kit usa microesferas paramagnéticas, tal como se describió en párrafos anteriores. Los autores constataron asimismo que el método convencional no comercial utilizado no había sido diseñado específicamente para el caso de alimentos grasos. La calidad del ADN fue evaluada por medio de la observación de las bandas obtenidas en gel, después de la amplificación utilizando cebadores universales de tipo ITS.

Los mejores métodos de extracción permitieron visualizar en el gel las bandas más claras e intensas. Ver Figura 86.

Tabla 7. Resultados de la evaluación del ADN genómico utilizando diferentes métodos de extracción; estudio realizado por (Arlorio, *et al.*, 2007) en muestras de avellanas para la evaluación de sustancias alergénicas.

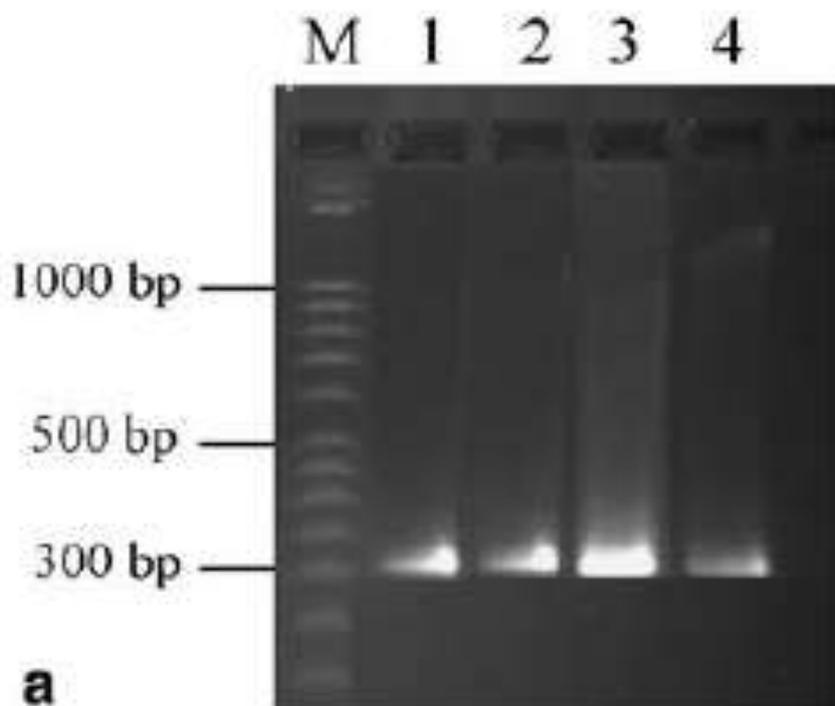
Método de extracción	Peso de muestra	A ₂₆₀	Razón (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	µg/ml
Fenol / Cloroformo/alcohol isoamílico. (25: 24: 1)	1.030	0.020	1.49	9.28
Gene Elute Plant genomic DNA (Sigma, Milan, Italy)	1.015	0.030	1.15	14.86
Ultraclean Plant DNA (Cabru, Milan, Italy)	1.020	0.198	1.34	98.60
WizardMagnetic DNA purificación de alimentos. (Promega, Milan, Italy).	1.020	–	–	–

Para los autores, la amplificación de la fracción ITS ½, permitió la detección de un amplificado típico a 300bp. Si bien es cierto Arlorio, *et al.*,(2007) encontraron que el método de ITS permitía la identificación de la avellana, procedieron a desarrollar un protocolo alternativo en PCR tiempo real utilizando ambos Sybr Green y otro con Taqman para una fracción más específica, el gen Cor a 1, quien presenta una tamaño del amplificado de 82 bp. Sin embargo para la PCR en tiempo real para algunos productos derivados de la avellana, las curvas de recuperación del ADN en los

estudios en los que se añadió intencionalmente cantidades medidas no fueron lineales; punto que se asocia la necesidad de optimizar los procesos de extracción y purificación de ADN para el caso de productos grasos como las oleaginosas.

El método permitió la recuperación al límite de detección de 0.1 ng de ADN genómico. Una sensibilidad tan alta es muy conveniente para la industria de los alimentos ya que permite identificar bajas contaminaciones con avellana (y su posible alérgeno) en diversos ingredientes alimentarios. Finalmente los autores de la investigación recomiendan que este ensayo de ADN se realice de manera complementaria con la detección de proteínas alergénicas específicas por métodos de ELISA y otros.

Figura 86. Bandas resultantes de la amplificación con Cebadores para ITS, según (Arlorio, *et al.*, 2007) M: ladder; 1: Fenol / Cloroformo; 2: Gene ElutePlantgenomic DNA (Sigma, Milan, Italy), 3: WizardMagnetic DNA purificación de alimentos. (Promega, Milan, Italy); 4: UltracleanPlant DNA (Cabru, Milan, Italy)



BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 6

- Al-Jawabreh A. 2005. Molecular Epidemiology, Clinical Molecular Diagnosis and Genetic Diversity of Cutaneous Leishmaniasis in Jericho, Palestine. Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Charité. Berlin: Universitätsmedizin Berlin
- Amagliani G, Giammarini C, Omiccioli E, Brandi G y Magnani M. 2007. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control* 18(9):1137-1142.
- Amagliani G, Omiccioli E, Brandi G, Bruce IJ y Magnani M. 2010. A multiplex magnetic capture hybridisation and multiplex Real-Time PCR protocol for pathogen detection in seafood. *Food Microbiology* 27(5):580-585.
- Anonimo. 2004. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In: Laboratory for Microbial Ecology. Department of Earth, E. a. E. S., editor. Toledo University of Toledo.
- Anonimo. 2006. Real Time PCR methods. In: Roche®, editor. PCR applications Manual. p. Published Examples of Applications for the Light Cycler® Systems.
- Anonimo. 2010a. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. In: Quiagen, editor. Real-Time PCR Brochure. Hilden, Germany: Quiagen®. p. 5 - 6.
- Anonimo. 2010b. Food Safety Testing Solutions by Quiagen. In: Quiagen, editor. Sample and Assay Technologies. Hilden, Germany: Quiagen®. p. 1 - 16.
- Arlorio M, Cereti E, Coïsson JD, Travaglia F y Martelli A. 2007. Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. *Food Control* 18(2):140-148.
- Bruijn F. 1997 The Rep-PCR Genomic Fingerprinting. In: reppcr, editor. Michigan: Michigan State University and The DOE- Plant Research Lab
- Clark M. 2009. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Food Safety News. Seattle, WA: Marler Clark.

- Downes FP y Ito K. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. In: Anonimo, editor. American Public Health Association. Washington: American Public Health Association
- DuPont. 2006. BAX System Q7. In: Qualicon, D., editor. Wilmington DE: Du Pont de Nemours. p. 32.
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G y Coppola S. 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Microbiology* 42(3):199-202.
- Espiñeira M, Herrero B, Vieites J y Santaclara F. 2010. Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS-1 region. *Food Control* 21(7):1051-1060.
- Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, Rossi F, Dellaglio F y Torriani S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International journal of food microbiology* 82(1):59-70.
- Fernández-Cuenca F. 2004. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(06):355.
- Fey P. 2008. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): The Molecular Epidemiologists Tool. *Nebraska Public Health Laboratory*, <http://www.nphl.org/documents/PFGE.pdf> (accessed February 18, 2008).
- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M y Kersters K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142(7):1881.
- Luque J. 2001. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Madrid: Elsevier. p. 469.
- Luttmann W, Bratke K, Kupper M y Myrtek D. 2009. Inmunología: Manual de técnicas de investigación en el laboratorio. Ciencias Biológicas y Bioveterinarias. Zaragoza: Editorial Acribia p. 299.
- Marmioli N y Maestri E. 2007. Polymerase chain reaction (PCR). In: Picó, Y., editor. Food Toxicants Analysis. Elsevier B.V. p. 147-187.

- Martín B. 2005. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. . Ingeniería Química Agraria tecnología Agroalimentaria (EQATA). Girona España: Universitat de Girona.
- Michanie S. 2005. Métodos alternativos, precisos y rápidos para el control microbiológico de alimentos. *Enfasis Alimentacion* 1(Feb-Mar):64 - 71.
- Muyzer G y Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127 - 141.
- Olive DM y Bean P. 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37(6):1661-1669.
- Rademaker J, Hoste B, Louws F, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P y deBruijn F. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: Xanthomonas as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:665-677.
- Rasmussen RS y Morrissey MT. 2008. DNA Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 7(3):280-295.
- Scheu PM, Berghof K y Stahl U. 1998. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiology* 15(1):13-31.
- Trevanich S, Tiyapongpattana S y Miyamoto T. 2010. Application of an optimized 18-h method involving one step culturing and single primer-based PCR assay for detection of Salmonella spp. in foods. *Food Control* 21(5):593-598.

CAPÍTULO VII

VENTAJAS Y DESVENTAJAS TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN CON LECTOR DE MICROPOZOS, EN LA INVESTIGACIÓN ENZIMÁTICA Y DE INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS. (Aplicaciones Prácticas)

Los equipos de lectores de absorbancia o fluorescencia en sus diversos formatos, presentan varias posibilidades para el control rutinario de calidad en los alimentos, especialmente en lo que respecta al análisis de la inocuidad y de la actividad enzimática. Una reseña de sus orígenes y los modelos a disponibilidad en el mercado para el formato de micropozos se revisan en el Capítulo III. Entre las primeras aplicaciones, muy difundidas se encuentran el monitoreo de la actividad enzimática, la cual no siempre es indeseable en alimentos, por ejemplo en el caso de enzimas que destruyen compuestos tóxicos como el ácido fólico o glucósidos cianógenos; en otros casos, la actividad enzimática, estaría asociada a ciertos problemas toxicológicos, tales como la presencia de inhibidores de enzimas digestivas. Además de los estudios enzimáticos, en un formato de micropozos son también posibles los estudios de viabilidad celular con lo cual es posible evaluar el efecto citotóxico o inhibidor de citotoxicidad de algunos componentes alimentarios.

Asimismo, algunos contaminantes encontrados recientemente en alimentos tales como el Bisphenol A se pueden determinar en alimentos con el uso de lectores UV-VIS en formato de micropozos, facilitando el análisis de un número grande de muestras. Asimismo, las aplicaciones en el formato de ELISA, han encontrado en este instrumento un medio que hace posible el contar con metodologías para el análisis de diferentes micotoxinas, alérgenos, toxinas marinas y los patógenos alimentarios más comunes; para lo cual, en la actualidad existen a nivel comercial y a

disposición de los laboratorios los “kits” quienes ofrecen todos los reactivos y protocolos estandarizados para un determinado análisis (Bell, *et al.*, 2005). Por otro lado, usando los lectores de micropozos podemos monitorear cambios en las curvas de crecimiento de diversos microorganismos, con lo cual tenemos una herramienta poderosa para estudiar cómo afectaría en ellos diferentes factores de crecimiento de diferente ocurrencia dentro de los alimentos (pH, Aw, T°, E°, etc) y también para evaluar el efecto de diversas sustancias antimicrobianas.

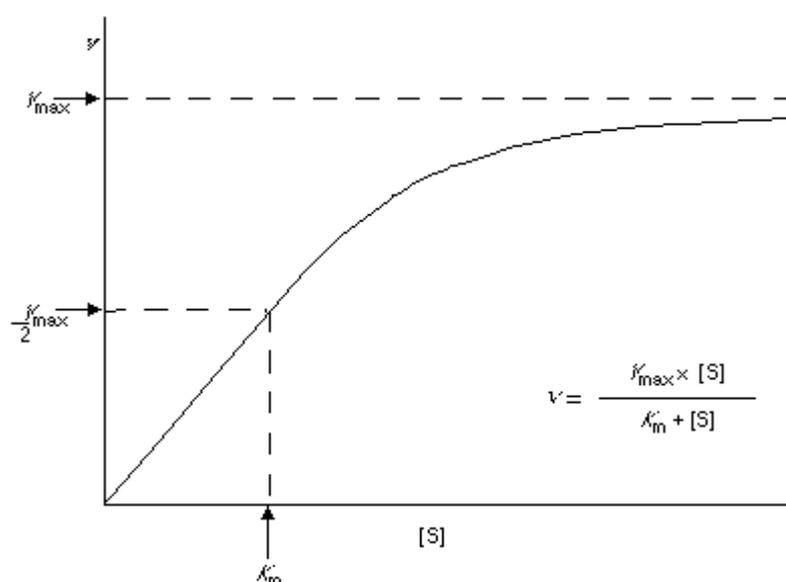
Se presentan a continuación algunas aplicaciones prácticas ya publicadas por diversos investigadores y que serán de ayuda a las personas interesadas en hacer investigación: ya sea fabricando su propio “kit” o usando los ya existentes en la investigación de los problemas inocuidad en los alimentos.

7.1 Aplicaciones en estudios en actividad enzimática.

Las enzimas son catalizadores generalmente de naturaleza proteica que aumentan la velocidad a la que ocurre una reacción termodinámicamente posible, sin modificar la cinética de la reacción, ni consumir la enzima (Powers, 2010). En Figura 87, se observa la ecuación desarrollada en Alemania en 1913 por una doctora médico canadiense, Maud Leonora Menten, en colaboración con Leonor Michaelis; la ecuación llamada ecuación de Michaelis-Menten, fue la base matemática que estableció los principios fundamentales para el estudio de la cinética enzimática (Moran, 2007). La actividad a la cual procede una reacción enzimática depende de factores tales como la temperatura del ambiente que condiciona la posible desnaturalización de la enzima; el pH; presencia de activadores enzimáticos y presencia de activadores e inhibidores. Los inhibidores pueden ser irreversibles (forman enlaces covalentes con la enzima que no se disocian) ó reversibles, si disminuyen la velocidad

máxima y también la cantidad total de enzima activa; los inhibidores reversibles, se caracterizan por la formación de un complejo enzima substrato, el que se encuentra en equilibrio con la concentración de enzima a través de una constante de inhibición llamada K_i ; los inhibidores reversibles pueden ser competitivos (generalmente con estructura similar a la de los sustratos), no-competitivos (actúan, fuera del sitio activo de la enzima) y a-competitivos (Se unen al complejo enzima substrato).

Figura 87. Ecuación de Michaelis-Menten.



Fuente: <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/PS/ps2116/ps2116-fig-0002-1-full.gif>

Powers, *et al.*,(2007) describe un protocolo especialmente diseñado para el ámbito educativo por el cual los estudiantes pueden preparar 12 muestras y hacer sus lecturas en el espectrofotómetro en un formato de placa de micropozos en menos de un minuto. Con los datos obtenidos para el caso de lactato deshidrogenasa (enzima importante para el metabolismo), los estudiantes pueden plotear las ecuaciones de Michaelis-Menten y de Lineweaver–Burky calcular las constantes cinéticas para la reacción enzimática. Previamente al estudio cinético, se monitorea la concentración

de enzima a través de la determinación proteica, usando el mismo lector de micropozos.

La ventaja del uso del lector de micropozos con 96 micropozos, para las determinaciones rutinarias de actividad enzimática, son descritas por Ashour, et al., (1987), para el estudio de la hidrólisis del Yoduro de acetilcolina por acción de la enzima acetilcolinesterasa de la anguila; aquí, los autores encuentran lecturas comparables con aquellas obtenidas con un espectrofotómetro convencional. Sin embargo, se observó que usando el lector de micropozos se incrementaba enormemente la cantidad de ensayos enzimáticos que un solo analista puede llevar a cabo; más aún si el lector se encuentra conectado a una computadora para el procesamiento de los datos. En la actualidad ya son varias de las compañías que venden los lectores de micropozos e incorporan en el software del equipo comandos que facilitan los estudios de cinética enzimática.

Los métodos espectrofotométricos para la determinación de las actividades enzimáticas son bastante frecuentes, En la literatura podemos observar como Lokra, *et al.*, (2009) describe una metodología para monitorear la actividad esteárica de la proteína patatin en aislados proteicos de papa, monitoreando los incrementos de absorbancia a 410 nm; y la disminución de las lecturas a 265 nm lo que permite monitorear los cambios en actividad de polifenol oxidasa en el mismo extracto. Por otro lado (Powers, 2010) describe diversas metodologías para monitorear actividad enzimática en analitos alimentarios monitoreando cambios en absorbancia. Metodologías que podrían adaptarse con facilidad al formato de micropozos (Ashour, *et al.*, 1987).

La Industria de los alimentos, actualmente hace uso de las enzimas en varias de sus formulaciones, las que están orientadas a la comercialización de productos con un añadido de mejora, en su capacidad de aliviar problemas de salud en los consumidores; de esta manera, un

problema como la obesidad, podrían encontrar alivio gracias a la acción de ciertas enzimas tales como la quimosina y similares proteasas, las que cuando actúan sobre la κ -caseína, generan un péptido específico llamado (GMP), glicomacropéptido, el cual estimularía la producción de colecistokinina, una hormona del intestino la cual induce la sensación de saciedad. Por otro lado, sustancias tóxicas como proteínas alergénicas, se podrían remover de los productos procesados con la acción de enzimas específicas, donde tal como lo revisa Birschbach, *et al.*,(2004); hay resultados prometedores para el caso de la reducción de la alergenicidad del garbanzo por hidrólisis de sus péptidos alergénicos. La acción enzimática fermentativa también puede generar sustancias antimicrobianas, tales como el péptido llamado *nisina*, el cual puede inactivar a *Listeriamonocitogenes*. Usando enzimas también se puede reducir el contenido calórico de los lípidos transformándolos en diacilgliceroles.

Una aplicación muy interesante de la determinación de la actividad enzimática en investigación, mediante espectrofotometría en el formato de micropozos la observamos en investigaciones publicadas que estudian la capacidad que poseen algunos extractos de vegetales como algunas infusiones tipo *Te turco* (Orhan, 2004) o *Te chino* (Xiao, *et al.*, 2008) para inhibir a la acetilcolinesterasa, la cual es una enzima que tiene por función la degradación del neurotransmisor acetilcolina. Esta cualidad ha sido reportada de interés para aliviar a ciertas enfermedades degenerativas tales como el alzhéimer; desde que en los tejidos cerebrales de los pacientes que murieron por esta enfermedad, se ha encontrado niveles bajos de acetilcolina, debido a ello existe un tratamiento que consiste en la administración de inhibidores sintéticos de acetil-colinesterasa; sin embargo, se ha encontrado en algunos productos naturales una cantidad elevada de estos inhibidores tales como lo reporta (Orhan, 2004) para el caso de plantas medicinales turcas que son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de problemas de memoria desde hace centurias. Por otro lado, Xiao, *et al.*,(2008) al investigar la actividad anticolinesterasa de Huperzina

A, un alcaloide vegetal que se encuentra en la *Huperziaserrata*, (utilizada durante centurias en la China para el tratamiento de fiebre, inflamación y esquizofrenia) encontraron que estudiando el efecto en ratas, la actividad anticolinesterasa de la huperzina por si sola era débil, pero no así, si se combinaba con (-)-Epigallocatechin-3-gallate proveniente del té. Ambos investigadores hacen referencia a un mismo método que fue publicado para espectrofotómetro, pero que ellos adaptan con éxito al formato de micropozos, permitiéndoles analizar un número mayor de muestras y con triplicados. En ambos casos hacen la extracción de las sustancias de interés con solventes orgánicos los que posteriormente tienen que ser removidos previos al análisis. Orhan (2004) hace las lecturas de absorbancia a 412 nm y calcula los porcentajes de inhibición de acuerdo con el modelo de Michaelis- Menten, mientras que (Xiao, *et al.*, 2008) hace sus lecturas a 405 nm cada 5 s por 2 min, lo que les permitió calcular la velocidad de inhibición para luego compararla con un grupo control en ratas.

Otra aplicación interesante para la agroindustria, la reporta (King, *et al.*, 2009) para la industria de los biocombustibles, donde gracias a la lectura de la absorbancia en un formato de 96 micropozos se puede monitorear la actividad de las celulasas producidas por algunos hongos considerados patógenos fúngicos tales como *Fusarium oxysporum*; ellos adaptaron la prueba del DNS (ácido dinitro salicílico) (Bemiller, 2010) para la determinación de azúcares reductores al formato de micropozos e hicieron uso de ella para monitorear la producción de azúcares debido a la acción de las celulasas fúngicas, las absorbancias fueron medidas a 540 nm, pero antes de ello usaron un termociclador para subir la temperatura en la placa y luego enfriarla antes de la lectura. Éste método sin embargo no es específico para un determinado tipo de azúcar. Por otros lado (Soor y Hincke, 1990), también hace uso del método del DNS adaptado al formato de 96 micropozos, pero esta vez para monitorear la actividad de α -Amylase, en unidades de actividad de amilasa (U-litro).

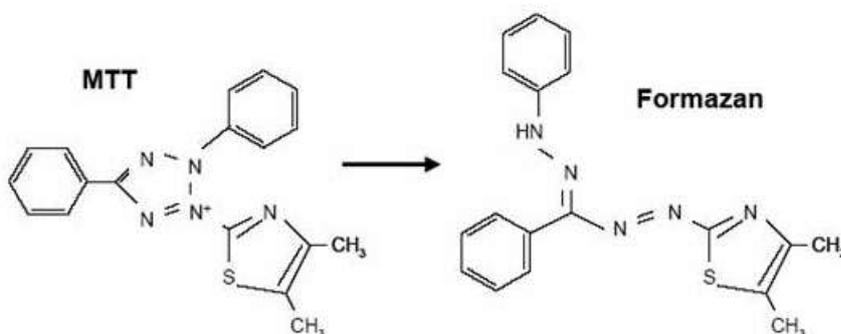
7.2 Estudios de viabilidad celular.

Las técnicas de estudio de viabilidad celular han sido empleadas para investigar el efecto cito tóxico del péptido A β un compuesto con estructuras de tipo amyloid β . En la actualidad existe un esfuerzo muy grande por diferentes compañías farmacéuticas en la búsqueda de drogas capaces de controlar y curar la enfermedad del Alzheimer (Jarvis, 2010). Todas estas compañías tratan de bloquear este amyloid β (A β) ya que las mejores hipótesis atribuyen a este componente el daño neuronal, aun cuando, este bloqueo, no ofrezca la garantía de desaparecer la enfermedad, sobre todo si se tiene en cuenta que actualmente las drogas existentes sólo bloquean a acetilcolinesterasa para atenuar los síntomas de la enfermedad del Alzheimer sin curarla. Esto, es debido a que el mecanismo de daño neuronal para los pacientes de Alzheimer es muy complicado y no es claramente dilucidado.

Heo y Lee, (2006) investigaron el efecto de los fotoquímicos de la col (tanto roja como blanca) en la inhibición de la neurotoxicidad inducida por el peptido “Amyloid- β . (A β)” Para ello, en su diseño experimental hicieron uso, entre otros, de un ensayo de “viabilidad celular *MTT*” en un formato de micropozos. Éste es un ensayo colorimétrico, que hace uso del reactivo *MTT* (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (Anonimo, 2003) el cual es susceptible de ser reducido vía enzimática por ejemplo por acción de las reductasas mitocondriales presentes en las células vivas; donde pasa entonces de un color amarillo a un color púrpura, cuya absorbancia puede ser medida entre 500 y 600 nm. Hee y Lee, (2006) usaron 570 nm (valor óptimo de absorbancia). En la Figura 88, se observa la base química para este cambio de color. Estos investigadores, quisieron estudiar el efecto citotóxico de éste péptido amyloid- β (A β) en un cultivo de células de tipo neuronal de rata clonada de la línea celular PC12 que adquirieron de ATCC. El péptido A β cuenta

entre 40 – 42 aminoácidos siendo el de 42 aminoácidos el más tóxico. Los fenólicos se extrajeron de la col, diluidos en agua desionizada y destilada, se adicionaron al cultivo de células de línea PC12, incubándolas por 30 minutos antes de exponerlas al agente citotóxico: A β , para luego comparar el efecto protector debido a la col con respecto al control sin exposición previa al extracto de col.

Figura 88. Reducción de MIT amarillo a púrpura Formazan.



Fuente: <http://www.famepharma.com/scientific-biocrush.htm>

En la Figura 89 se esquematizan las diferencias en las rutas de moléculas consideradas importantes para explicar la enfermedad del Alzheimer, estas rutas se comparan en la figura, con las de una célula neuronal normal. Lo que se observa, y que explicaría la destrucción de millones de neuronas por apoptosis, y los consiguientes síntomas de pérdida de memoria y capacidad cognitiva, en los pacientes, es lo siguiente: Hay dos fenómenos, uno: la acumulación de oligómeros gomosos de fragmentos de agente citotóxico A β formando fibrillas que atoran los espacios entre las células nerviosas (Ver en Figura 89, “A β misfolding aggregation”) y el otro la formación de grumos de proteína tau, (“*tangles*”) (Ver en Figura 89 “Hyperphosphorylation of Tau”) acumuladas en el interior de las neuronas (Jarvis, 2010). Finalmente para terminar de ilustrar la formación de los A β en los tejidos enfermos, basta mirar nuevamente la Figura 89 para observar que el péptido A $\beta_{40/42}$ se forma a partir de una proteína AP formada en el

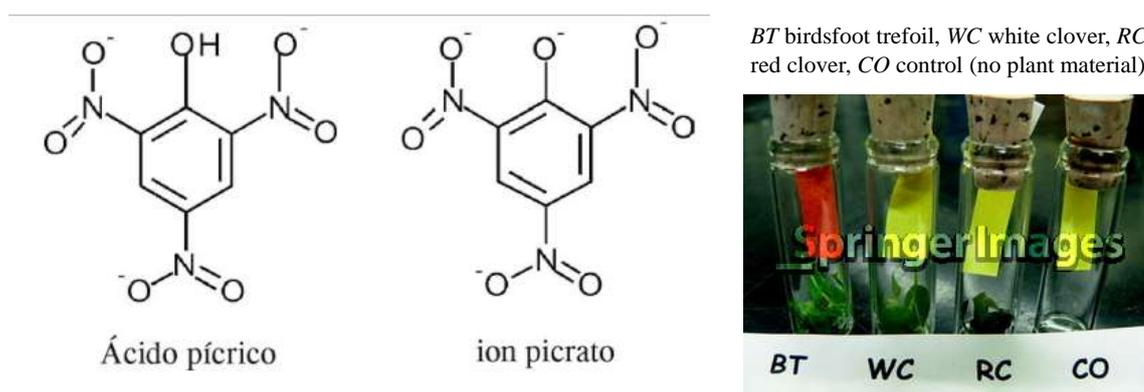
Parece existir una asociación no muy clara entre la presencia de A β y el stress oxidativo (Heo y Lee, 2006). En los estudios de viabilidad celular presentados aquí para ilustrar esta aplicación se encontró que el pretratamiento con los fitoquímicos de la col, antes de la exposición de las células neuronales a los péptidos A β , protegieron a las células del efecto citotóxico inducido por A β en manera dependiente de la dosis. En este estudio se observó un mayor efecto protector con la col roja, donde las antocianinas fueron las principales responsables del color.

7.3 Determinación de cianógenos totales de cassava. (*Manihot esculenta Crantz*) (Yuca).

En algunos países principalmente del África se han reportado intoxicaciones fatales en familias enteras por el consumo de éste alimento mal procesado, y es que esta raíz contiene cantidades variables de glucósidos cianogénicos tales como la linamarina, lotaustralina entre otros; en las raíces, la cantidad promedio total de glucósidos es de: 666 \pm 387 (mg HCN equivalente/kg de raíz peso seco) (Iglesias, *et al.*, 2002); también existen en las raíces actividad de β -glucosidasa: 1.1 a 5.5 nkat/g peso de raíz fresca (Iglesias, *et al.*, 2002) (donde 1nanokatal es definido como la cantidad de enzima requerida para incrementar la velocidad de reacción en 1 nmol/s bajo las condiciones definidas del ensayo). Estas substancias si son consumidas sin un adecuado procesamiento, que reduzcan los niveles de cianógeno a niveles por debajo de 10 ppm de acuerdo con la reglamentación FAO/WHO, afectarían la inocuidad del alimento. (Iglesias, *et al.*, 2002). Se debe señalar que este problema no es en todas las yucas sino sólo en algunas variedades, especialmente las amargas.

Respecto a la metodología para la determinación de estos glucósidos, Brimer, *et al.*, (1998) desarrolla el método basada en la micro-difusión del HCN partiendo de un extracto ácido de harina de *Manihot sculenta*, seguido por la determinación colorimétrica con el lector de micropozos. Estas metodologías están basadas en la reacción de Guignard (Brimer, 1994) por la cual el ácido pícrico frente a la presencia del gas liberado (HCN) es transformado a su base conjugada: el ion picrato. Estos iones se observan en la Figura 90, tal como los presenta (Oliveros-Bastidas, *et al.*, 2009). En esta figura también se observa, como los cambios de color, son de tipo cualitativo; sin embargo, el color impregnado en el papel se puede diluir en agua y proceder a hacer determinaciones de tipo cuantitativo con un espectrofotómetro, el cual puede estar en formato de micro pozo (Brimer, 1994) y hacer lecturas a 510nm (Bradbury, *et al.*, 1999).

Figura 90. Estructuras del ácido pícrico y su base conjugada ion picrato. En la foto de la derecha se aprecia el cambio de color del papel impregnado de ácido pícrico amarillo cuando es expuesto al HCN liberado por diversos vegetales.



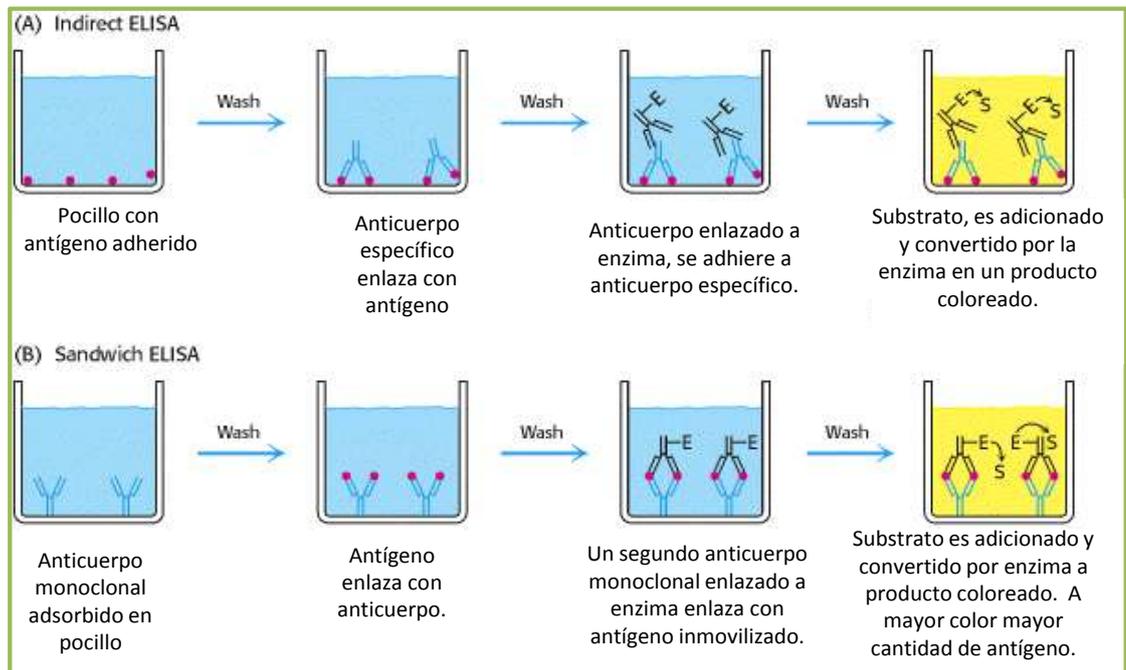
Fuente: (Oliveros-Bastidas, *et al.*, 2009);
http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/1-10.1007_978-1-4419-0378-5_12-0

7.4 Aplicaciones prácticas del lector de micropozos al campo de los inmunoensayos.

El formato de ELISA (“Enzyme linked immunosorbent assay”): Ensayo con sustancias inmuno-adsorbentes unidas a enzimas) es el más utilizado con los lectores de micropozos en el análisis de una serie de analitos tóxicos. Un ELISA es un tipo de ensayo donde el analito en solución, es una molécula que sirve como antígeno para un anticuerpo específico para ella, luego, el que haya ocurrido o no, la reacción antígeno-anticuerpo se pone en evidencia porque ya sea, el anticuerpo o el antígeno (dependiendo del formato, ver Figura 91 y 92) está enlazado a una enzima capaz de catalizar una reacción cromógena, por lo que cuando se adiciona el sustrato de la enzima y aparece un color, que es medido en el lector de micropozos. Es frecuente que la enzima se encuentre enlazada a un anticuerpo secundario que es capaz de reconocer al primario que es el específico para el analito. En la Figura 91. Se observan dos de los tipos más comunes de formato de ELISA: En cada etapa, se han esquematizado lo que ocurre dentro del pocillo, hasta llegar a la etapa final, donde se genera el color por acción de la enzima.

Lee y Kennedy, (2007) compara para el caso de las aflatoxinas, las metodologías de ELISA y HPLC. En la Tabla 9. Son evidentes algunas ventajas en el formato ELISA, tales como su rapidez y bajo costo en comparación con otras técnicas instrumentales, por lo que son considerados métodos ideales para determinaciones de sondeo (explorativas). Sin embargo estas metodologías presentan también desventajas entre las que se pueden mencionar a las siguientes: Para cada ensayo nuevo se requieren preparar reactivos específicos lo que toma tiempo; sólo pueden determinar hasta un máximo de 5 componentes en forma simultánea y son pocos los que son métodos oficiales (generalmente, se encuentran en este formato los métodos oficiales para micotoxinas).

Figura 91. Diferentes etapas en dos Formatos de ELISA muy comunes: Elisa Indirecto y Sandwich.



Fuente: Gráfico tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/stryer/ch4f35.gif>

7.4.1 ELISA Competitivo.

Este tipo de ensayo se puede realizar ya sea, en el formato con anticuerpo inmovilizado en el micropozo; o en el formato, con antígeno inmovilizado a micropozo, para el segundo caso, se observa en la Figura 92 B, que las etapas son: incubar el anticuerpo específico con la muestra previamente a su adición al micropozo, durante este tiempo de incubación algunos de los anticuerpos quedaran conjugados con el analito (antígeno) de la muestra. Después, de esta primera incubación, la solución es transferida con micropipeta a los pocillos donde se encuentran adheridas al fondo moléculas del analito en estudio. Los anticuerpos que no hayan reaccionado con el analito de la muestra y que estén todavía libres, quedarán conjugados ahora con el analito adherido en el pocillo. A mayor cantidad de analito en la muestra menor será la cantidad de anticuerpo que queda adherido al

fondo del pocillo. El anticuerpo adherido es entonces cuantificado con un segundo anticuerpo conjugado a una enzima, luego de la adición de un sustrato cromógeno y formación de color. Un ELISA competitivo (Ver Figura 92 A) también podría llevarse a cabo con el anticuerpo inmovilizado como lo reportan (Lee y Kennedy, 2007)

En el caso de usarse los kits de ELISA para la determinación de proteínas alergénicas, (Fu, *et al.*, 2010) previenen que los resultados deben tomarse con precaución si el producto ensayado ha sido sometido a un procesamiento que incluya tratamiento térmico, ya que en una investigación realizada por ellos con proteína de huevo, lograron identificar que el tratamiento térmico dependiendo de su intensidad afecta la solubilidad y la capacidad inmunológica de las proteínas ocasionado cambios en las determinaciones cuantitativas de ELISA, lo que no es fácil de determinar cuándo se realizan estudios de recuperación en los alimentos ya procesados.

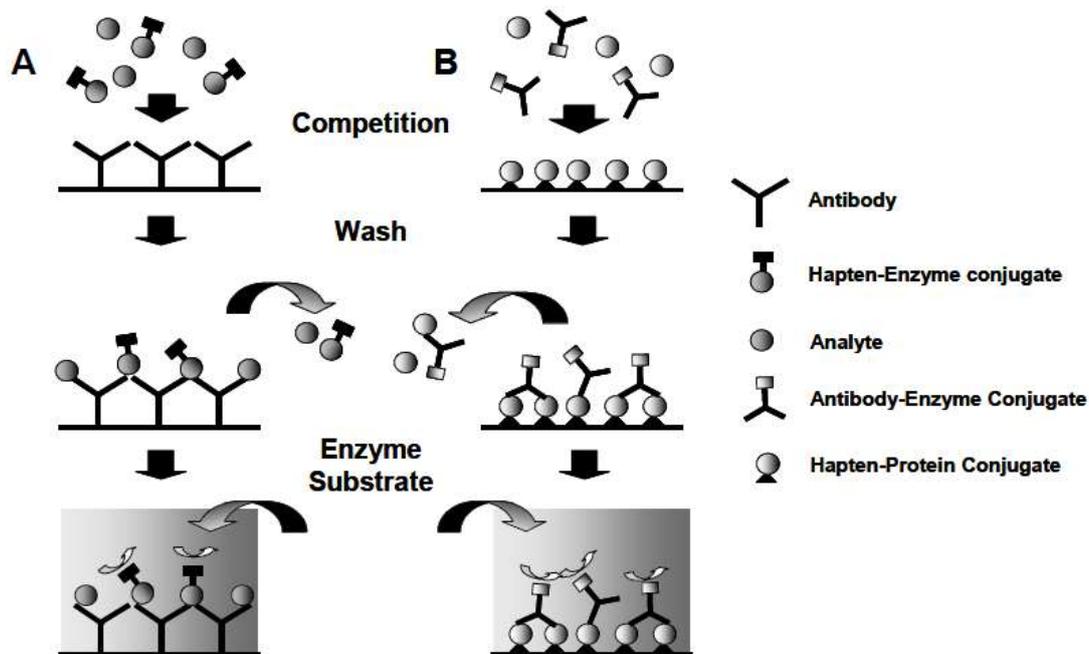
Tabla 9. Comparación de algunas técnicas utilizadas en el análisis del nivel de contaminación con aflatoxinas.

Característica del método	HPLC	ELISA
Límite de detección (ng/g)	<1	1-5
Limpieza por muestra (min)	60-120	10-30
Detección por muestra (min)	120	10
Cuantificación por muestra (min)	30	1-5
Tiempo total (min)	270	15 - 50

Fuente: (Lee y Kennedy, 2007)

Lee y Kennedy, (2007) revisan una lista muy larga de métodos publicados en el formato de ELISA con sus respectivos límites de detección, para ser aplicados en diferentes alimentos, agua y suelo; dentro de la cual se puede encontrar de interés la presencia de casi todas las micotoxinas.

Figura 92. ELISA Competitivo: A: formato con anticuerpo inmovilizado en micropozo. B: con antígeno inmovilizado a micropozo.



Tomado de: (Lee y Kennedy, 2007)

7.4.2 Detección de Bisphenol A en formato de ELISA.

El Bisphenol A, (BPA, 2,2-bis-(4-hydroxyphenyl)-propane), es una material utilizado en la industria de los plásticos, también es sustrato en la producción de resinas de policarbonato y resinas expóidas. En el caso de algunos plásticos utilizados para el almacenamiento de alimentos, el calor y el exceso uso puede ocasionar la liberación de bisphenol A (Ju, *et al.*, 2011). Se considera que esta sustancia presenta actividad estrogénica, siendo capaz de causar disrupciones endocrinas.

FAO/WHO (2010) mencionan que la actividad biológica de bisphenol A es muy compleja, y no sólo incluiría a los receptores clásicos de estrógeno sino también otros receptores. Los efectos en la toxicología reproductiva y del desarrollo en animales sólo se han observado en dosis

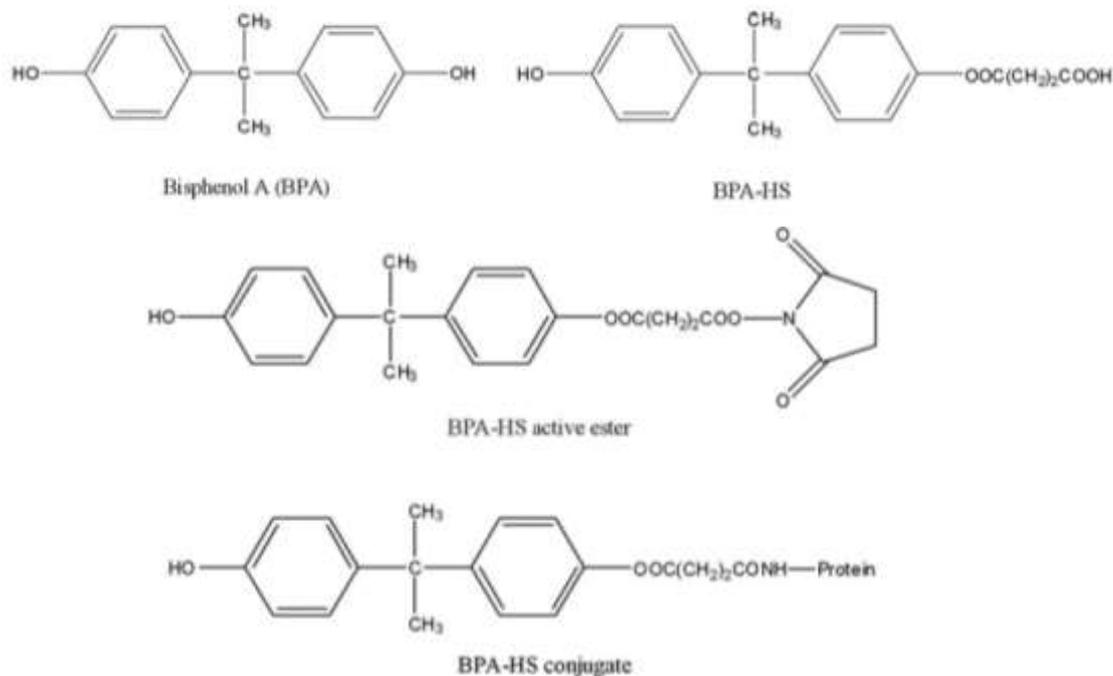
muy altas. Los datos de toxicidad a dosis bajas son inciertos sobre todo para el caso de los niños pequeños que recibieron sus fórmulas infantiles en botellas de plástico no libres de bisphenol A. FAO/WHO (2010) recomienda los métodos de ELISA para ser usados con fines exploratorios mas no con fines cuantitativos para lo que recomienda HPLC o GC con el uso de detectores MS/MS. Un estudio que exploró alimento para infantes en USA encontró niveles promedio para las 100 muestras examinadas de 1 µg/kg. En alimentos los mayores niveles de BPA fueron encontrados en los alimentos enlatados (por ejemplo vegetales enlatados: 32.4 µg/kg) debido a los componentes usados en el recubrimiento de las latas. Existiendo en la actualidad un esfuerzo por la industria de alimentos para reemplazar dichos materiales por otros libres de BPA. Ver Figura 93.

Ju, *et al.*, (2011) desarrolla una metodología en la que en la primera etapa, se lleva a cabo la producción de anticuerpos monoclonales específicos para BPA, los que luego son utilizados en un formato de ELISA para la determinación de esta sustancia en recipientes para líquidos. El procedimiento a grandes rasgos es como sigue, primero se sintetizó una molécula conjugando el BPA con una proteína con la finalidad de obtener una molécula de alto peso molecular que sea capaz de suscitar una reacción de inmuno-respuesta en ratones. Ju, *et al.*,(2011) describe entonces el procedimiento seguido para sintetizar esta molécula primero: BPA-HS, que permite la conjugación del BPA a la proteína BSA (Albúmina de Suero de Bovino) mediante formación de un éster (Ver Figura 93). La siguiente etapa es la producción de los anticuerpos en el ratón. Para lo cual Ju, *et al.*, (2011) describen el protocolo para inmunizar a los animales y el procedimiento para la extracción de los anticuerpos formados del suero, después del tiempo necesario. Estos anticuerpos son todavía los llamados policlonales, los ratones son evaluados para ver cuáles son los animales que producen anticuerpos de mayor afinidad, para continuar el experimento con

ellos y luego producir en masa solo esos anticuerpos monoclonales seleccionados, en un nuevo protocolo descrito más abajo.

Ju, *et al.*,(2011) sigue la técnica clásica conocida como del hibridoma, para la producción de los anticuerpos monoclonales, derivados a partir de un único clon de célula plasmática (Luttmann, *et al.*, 2009) lo contrario es policlonal). Para conseguir esto se extraen células “B” (splenocytes) del bazo del ratón y se les da un tratamiento (descrito en el artículo al que hago referencia), para fusionarlas con células tumorales de mieloma múltiple (células cancerosas), una vez fusionadas, se identificó a las mejores productoras del anticuerpo de interés (en este caso el más afín a BPA). Estas células se pueden cultivar en un medio de cultivo apropiado, pero también como en el caso que describe Ju, *et al.*, (2011) fueron inyectadas en la cavidad peritoneal de ratones hembras, y después de un periodo de 15 días, se recolectó un líquido rico en anticuerpos llamado líquido ascítico. Se examinan nuevamente los anticuerpos y se seleccionan los mejores anticuerpos monoclonales. Una vez obtenidos los anticuerpos, Ju *et al.*, (2011) los utilizaron en el análisis de BPA en un formato de ELISA, para lo cual probaron procedimientos indirectos como directos que se pueden observar en la Figura 91 (a). Se evaluaron los falsos positivos como falsos negativos y el coeficiente de variabilidad y límite de detección inferior para 20 diferentes muestras y 20 diferentes blancos. Los autores encontraron un límite de detección inferior de 0.1 ng mL^{-1} (ppb) para el caso de muestras de agua, pudiendo afirmar que su método era tan sensible como el del LC-MS/MS y más sensible que el HPLC. Con los métodos de ELISA, la recuperación del BPA fue entre 90.8% y 114%; CV: 15.6% - 39.4%. Si no se dispone de tiempo o recursos para montar toda esta metodología, es de notar también que a nivel comercial Abraxis®, en su página web, comercializa un Kit para controlar Bisphenol A (BPA). (<http://www.abraxiskits.com/productByCat.php?catId=42>)

Figura 93. Fórmulas para el Bisphenol A. Tomado de (Ju, *et al.*, 2011)



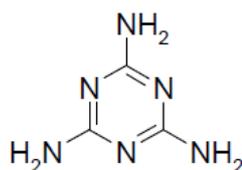
7.4.3 Detección de Melanina en Formato de ELISA competitivo.

Biotek® describe una nota de aplicación para ser usada en sus equipos lectores de micropozos (lecturas a 450 nm) para la determinación de Melanina en alimentos (Held, 2009b). Usaron un Kit que se encuentra ya comercialmente en el mercado ofrecido por la compañía Abraxis (Warminster, PA). Gerber y Brewer, (2010) evaluaron dos kits ELISA comerciales y diferentes métodos de extracción para estas sustancias encontrando que los límites de detección en formula infantil deshidratada estuvo en el rango de 0.2 - 3 µg/g dependiendo del kit. Los límites de detección en la fórmula infantil líquida fueron de <1 µg/ml y en los productos de trigo <2.5 µg/g; de esta manera los autores presentan este método como una alternativa para analizar muestras sospechosas sin tener necesidad de usar costosa instrumentación. FAO/WHO, (2009) señala que de usar cualquier kit para Melanina, se debe hacer la validación del mismo

en la matriz donde se usará si esta es diferente de la matriz usada por los fabricantes.

La Melanina es producida mayormente en China y en Europa oriental, y es usada por la industria de los laminados plásticos, filtros, gomas, adhesivos y también en la industria de las pinturas y fertilizantes. En el año 2008, ocurrió una penosa adulteración de los alimentos infantiles con lo cual fueron afectados 294 000 infantes en China. Held, (2009b) señala que la presencia de los tres grupos amino primarios, (observar en la Figura 94), pueden reaccionar también con el reactivo de Biuret usado comúnmente en la determinación de proteína en alimentos. Es por eso que se usa en alimentos para aumentar artificialmente el contenido proteico. En China los infantes que consumieron Melanina fueron diagnosticados con anomalías en el tracto urinario; tales como cálculos en la uretra, riñón y vejiga; seis niños murieron por falta de tratamiento oportuno (Fao/Who, 2009).

Figura 94. Fórmula de la Melanina. Tomado de: (FAO/WHO, 2009)



Melamine

7.4.4 Monitoreo de Crecimiento Microbiano.

Los lectores de micropozos se pueden utilizar para estudiar la dispersión de la luz ocasionada por una suspensión de células microbianas y de esta manera estimar la cantidad de dichas células en determinados medios líquidos. Algunas aplicaciones importantes se encuentran en el

estudio de los efectos inhibitorios de diferentes agentes sobre el crecimiento microbiano (Domínguez, *et al.*, 2001; Stubbings, *et al.*, 2004).

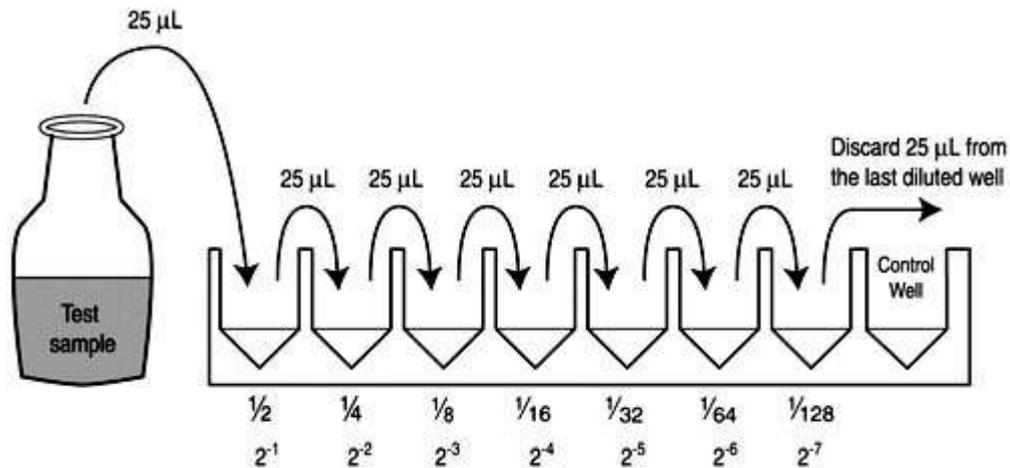
Esta metodología se ha empleado en el monitoreo de la recuperación del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* después de que los microbios fueran sometidos a un tratamiento con antibióticos; cuando Stubbings, *et al.*, (2004) comparó los resultados de hacer el monitoreo con el lector de micropozos a 600 nm, vs el método de recuento de colonias, encontró una alta correlación para los agentes bacteriostáticos, pero para los agentes bacteriolíticos la correlación fue baja. El método descrito por (Stubbings, *et al.*, 2004), utilizando lector de micropozos para determinar el valor MIC (la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación) es bastante simple. Se realizaron microdiluciones del agente microbiano en medio MHB (caldo Mueller–Hinton) inoculando para el caso de *S. Aureus*: 10^6 unidades formadoras de colonias per ml; para los estudios con *E.coli* se usó 10^4 células per ml, en un volumen final de 70 μ l. Se utilizó una placa de micropozos de 384 pocillos, donde se distribuyeron triplicados de diluciones seriadas al $\frac{1}{2}$ (Ver figura 95). La placa de micropozos fue incubada por 16 horas a 37°C dentro de un lector de micropozos (Spectramax™ 384 plus microtitre plate reader de Molecular Devices) que permitía el control de temperatura y las lecturas de densidad óptica a 600nm en intervalos de 10 minutos. El sistema también permitía la agitación durante 30 segundos antes de cada lectura. Se calculó el valor MIC como la concentración más baja de agente antimicrobiano que evitó el crecimiento en los pocillos en triplicado. Se entiende que una disminución en el crecimiento se visualiza como una disminución en el aumento de las lecturas de absorbancia. Los valores MIC finales fueron los promedios de haber realizado el experimento en tres diferentes ocasiones (Stubbings, *et al.*, 2004).

Tilton, *et al.*,(1973) señala entre algunas de las desventajas del uso de los micropozos de poliestireno para la incubación, la posibilidad de que si están descubiertos, se evapora el líquido aumentando la concentración de los agentes antimicrobianos; por lo que recomienda el tiempo mínimo para los estudios de MIC. Asimismo recomienda usar equipos que automaticen la dilución de los caldos.

Quigley, (2008) describe una aplicación importante para un equipo de lector de micropozos que comercializa Biotek®, la cual permite monitorear el crecimiento de *E.coli* y determinar también el efecto de algunos inhibidores, entre ellos el etanol. El método es bastante simple, usando una placa de 96 micropozos, se preparan las microdiluciones, en este caso para el etanol, se pipetea en los micropozos en repeticiones de 8 cada uno de los tratamientos, de modo que cada hilera experimental sea un tratamiento diferente, por ejemplo cada uno de ellos puede ser una dilución de: 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1.25% de etanol en caldo LB, inoculando en cada uno de ellos 5 μ l de *E. coli* a una determinada concentración. El lector de micropozos de Biotek® se puede programar de forma que a 37°C, después de 10 segundos de agitación a velocidad media, se proceda a la lectura de la absorbancia a 600 nm por ejemplo, que es la longitud de onda a la que se mide el crecimiento microbiano por dispersión de luz. Quigley, (2008) señala asimismo, que sería posible utilizar otras longitudes de onda diferentes de 600nm (que es la usada tradicionalmente), demuestra que a otras longitudes se obtienen curvas que muestran la misma tendencia.

Held, (2009a) por otro lado, demuestra que usando un lector de micropozos con control de temperatura hasta 68°C, es posible monitorear a 600 nm el crecimiento de bacterias termoresistentes. Esto tiene aplicaciones prácticas, especialmente durante la fabricación de biocombustibles a partir de materiales celulósicos, donde se exige un crecimiento a temperaturas que, con frecuencia, superan los 50°C.

Figura 95. Representación de diluciones seriadas al $\frac{1}{2}$ para un volumen final de 50 μL .

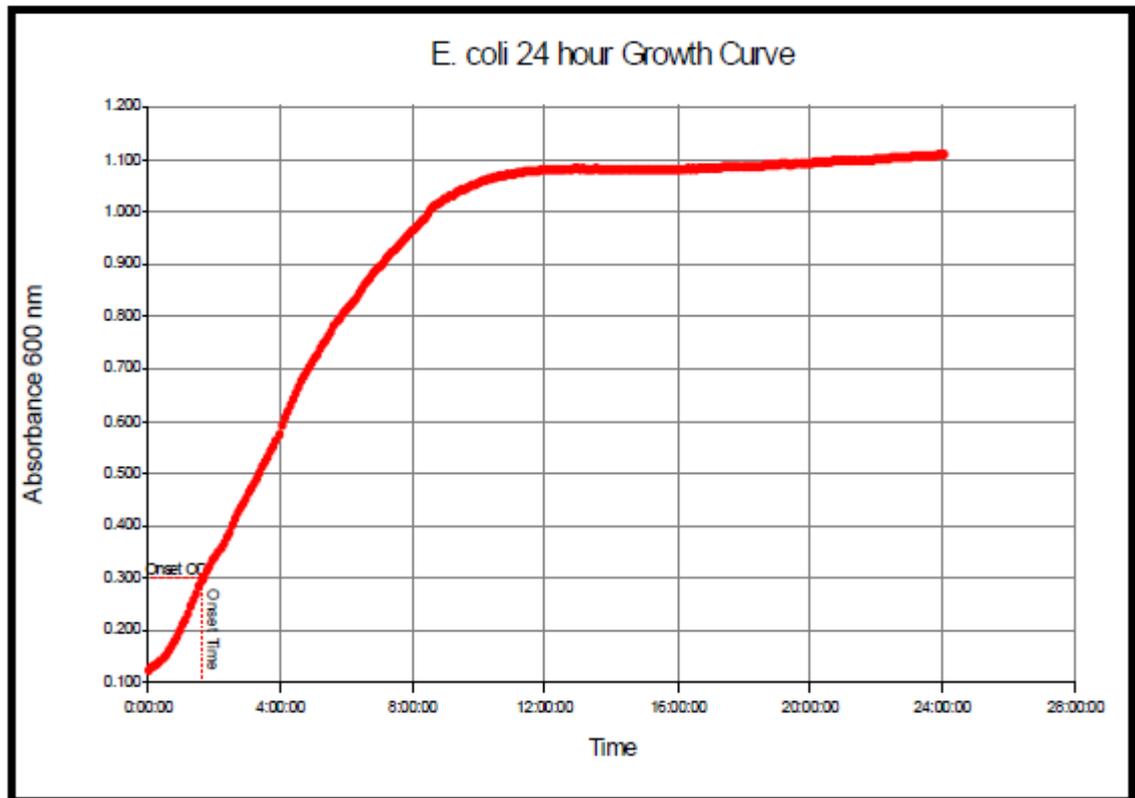


Fuente: <http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e0o.jpg>

Held, (2010) describe también una aplicación con la cual usando un lector que controle temperatura, agitación y haga lecturas cinéticas, se construyen las curvas de crecimiento a 600 nm para levaduras de tipo *Saccharomyces cerevisiae*, (Utilizadas en la elaboración de cerveza *lager*); lo que permite estudiar el efecto en su crecimiento de cambios en temperatura, pH, concentración de etanol y sal entre otros.

Held (2010) recomienda utilizar placas con cobertor para evitar evaporaciones durante evaluaciones que duren 24 horas. Ver figura 96. La información presentada no pretende incluir todas las aplicaciones posibles, pero si mostrar posibilidades metodológicas actuales que posteriormente guíen al futuro investigador a profundizar en el área de su interés.

Figura 96. Curva de crecimiento típica a 600 nm en el lector de micropozos Biotek® según (Quigley, 2008)



BIBLIOGRAFIA DEL CAPITULO 7

- Anonimo. 2003. TACS MTT Assays. Cell Proliferation and Viability Assays. Wiesbaden-Nordenstadt, Germany: Trevigen, Inc.
- Ashour MBA, Gee SJ y Hammock BD. 1987. Use of a 96-well microplate reader for measuring routine enzyme activities. *Analytical biochemistry* 166(2):353-360.
- Bell C, Neaves P y Williams A. 2005. Food Microbiology and Laboratory Practice. In: science, B., editor. Oxford: Blackwell.
- BeMiller JN. 2010. Carbohydrate Analysis. In: Nielsen, S. S., editor. Food Analysis. Springer. p. 147 - 177.
- Birschbach P, Fish N, Henderson W y Willrett D. 2004. Enzymes: Tools for Creating Healthier and Safer Foods. *Food Technology* 58(4):20 - 26.
- Bradbury MG, Egan SV y Bradbury JH. 1999. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(4):593-601.
- Brimer L. 1994. Quantitative solid-state detection of cyanogens: from field test kits to semi-automated laboratory systems allowing kinetic measurements. p. 105-116.
- Brimer L, Abrahamsson M, Mlingi N y Rosling H. 1998. A modified microdiffusion assay with solid-state detection for the determination of total cyanogens (CNp) in cassava flour. Comparison to the method of O'Brien et al.(1991). *Food chemistry* 62(2):239-242.
- Domínguez MC, de la Rosa M y Borobio MV. 2001. Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47(4):391-398.
- FAO/WHO. 2009. Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid. Ottawa, Canada: Report of a WHO Expert Meeting In collaboration with FAO Supported by Health Canada.
- FAO/WHO. 2010. Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A. Ottawa, Canada.
- Fu T-J, Maks N y Banaszewski K. 2010. Effect of Heat Treatment on the Quantitative Detection of Egg Protein Residues by Commercial

- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Test Kits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8):4831-4838.
- Garber EAE y Brewer VA. 2010. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Detection of Melamine in Infant Formula and Wheat Food Products. *Journal of Food Protection* 73(4):701-707.
- Held P. 2009a. Identification of Biofuel Producing Bacteria Through Temperature Resistance. Application note. Winooski, Vermont USA: BioTek Instruments, Inc.
- Held P. 2009b. Using EL406™ Combination Washer Dispenser to Semi-automate a Competitive ELISA for Melamine. Semi-Automated Melamine Quantitation. In: Biotek, editor. Application Note. Vermont, USA: Biotek.
- Held P. 2010. Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces Cerevisiae*. Application note. Winooski, Vermont USA: BioTek Instruments, Inc.
- Heo HJ y Lee CY. 2006. Phenolic phytochemicals in cabbage inhibit amyloid [beta] protein-induced neurotoxicity. *LWT-Food Science and Technology* 39(4):331-337.
- Iglesias CA, Sanchez T y Yeoh HH. 2002. Cyanogens and linamarase activities in storage roots of cassava plants from breeding program. *Journal of food composition and analysis* 15(4):379-387.
- Jarvis LM. 2010. The Amyloid Question *C&EN Chemical and Engineering News* 88(14):12 - 17.
- Ju C, Xiong Y, Gao A, Yang T y Wang L. 2011. Development of a Direct Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using a Sensitive Monoclonal Antibody for Bisphenol A. *Hybridoma* 30(1):95-100.
- King BC, Donnelly MK, Bergstrom GC, Walker LP y Gibson DM. 2009. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and bioengineering* 102(4):1033-1044.
- Lee A y Kennedy IR. 2007. Immunoassays. In: Picó, Y., editor. Food toxicants analysis: techniques, strategies and developments. Sidney, Australia: Elsevier Science.
- Løkra S, Schüller RB, Egelanddal B, Engebretsen B y Strætkvern KO. 2009. Comparison of composition, enzyme activity and selected

functional properties of potato proteins isolated from potato juice with two different expanded bed resins. *LWT-Food Science and Technology* 42(4):906-913.

Luttmann W, Bratke K, Kupper M y Myrtek D. 2009. Inmunología: Manual de técnicas de investigación en el laboratorio. Ciencias Biológicas y Bioveterinarias. Zaragoza: Editorial Acribia p. 299.

Moran A. 2007. Maud Menten and the Michaelis- Menten Equation. In. SandWalk: Strolling with a Skeptical Biochemist. <http://sandwalk.blogspot.com/2007/01/maud-menten-and-michaelis-menten.html>.

Oliveros-Bastidas A, Carrera C y Marin D. 2009. Spectrophotometry study of the reaction between cyanide ions and picrate. A practical example of analytical applications and kinetics studies. *Rev.Colomb.Quim.* 38(1):61-82.

Orhan I. 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 91(1):57-60.

Powers JL, Kiesman NE, Tran CM, Brown JH y Bevilacqua VLH. 2007. Lactate dehydrogenase kinetics and inhibition using a microplate reader. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 35(4):287-292.

Powers JR. 2010. Application of enzymes in Food Analysis. In: Nielsen, S. S., editor. Food Analysis. Springer. p. 283 - 299.

Quigley T. 2008. Monitoring the Growth of E. coli With Light Scattering Using the Synergy™ 4 Multi-Mode Microplate Reader with Hybrid Technology™. Application note. Winooski, Vermont USA: BioTek Instruments, Inc.

Soor SK y Hincke MT. 1990. Microplate reader-based kinetic determination of [alpha]-amylase activity: Application to quantitation of secretion from rat parotid acini* 1. *Analytical biochemistry* 188(1):187-191.

Stubbings WJ, Bostock JM, Ingham E y Chopra I. 2004. Assessment of a microplate method for determining the post-antibiotic effect in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(1):139-143.

Tilton R, Lieberman L y Gerlach E. 1973. Microdilution antibiotic susceptibility test: examination of certain variables. *Applied and Environmental Microbiology* 26(5):658.

Xiao J, Chen X, Zhang L, Talbot SG, Li GC y Xu M. 2008. Investigation of the Mechanism of Enhanced Effect of EGCG on Huperzine A's Inhibition of Acetylcholinesterase Activity in Rats by a Multispectroscopic Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3):910-915.

GLOSARIO

AC	Antes de Cristo
ANDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
AP-PCR	Técnica de amplificación al azar de ADN Polimórfico usando más de un cebador arbitrario pequeño.
ERIC	Secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias
FINS	Secuenciado de nucleótidos forensicamente informativo
FRET	Transferencia de energía resonante Förster. Transferencia de energía por resonancia a una molécula próxima que se torna fluorescente.
HEPA	Filtro compuesto por mayas de filtros dispuestos al azar, usado en la purificación del aire.
PVDF	polifluoruro de vinilideno, fluoropolímero altamente inerte químicamente.
rRNA	El ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
16S rRNA	16S ribosomal RNA, es un componente de las subunidades 30S de los ribosomas procariotas.
16SrDNA	16S ribosomal DNA. Sus genes se usan en la reconstrucción de la filogenia. secciones que codifican el 16S rRNA
5' 18S – ITS1 - 5.8S – ITS2- 28S 3'	Genes ribosomales unidos por ITS, empezando por el extremo 5' y terminando en el 3'.
AAPH	2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride. Radical generador de sustancias peróxido.
ADN / DNA	Ácido Desoxirribonucleico

AFLP	Técnica molecular que estudia el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
AOAC	AOAC International (Association of Analytical Communities)
APHA	American Public Health Association
RNA	El ácido ribonucleico
RNAr	El ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
A-T	Adenina – Timina
ATP	El trifosfato de adenosina o adenosín trifosfato
BAX®	Sistema Comercial de identificación de microbios patógenos en alimentos y es basada en el estudio del ADN
BSA	Albumina de Suero de Bovino.
BSE	Encefalopatía espongiforme bovina
cADN	ADN complementario, en genética es el ADN sintetizado con las bases de nucleótidos complementarios teniendo como molde una molécula de mRNA. Reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa y DNA polimerasa.
CAMP	Fenómeno descrito por primera vez por Christie, Atkins y Munch-Petersen. Usado como método de diagnóstico en microbiología. Consiste en la hemólisis sinérgica de eritrocitos de oveja debido a una co-hemolisina del grupo Streptococcus B en la zona de difusión de una toxina del staphylococcus.
CCD	"charge-coupled device" Dispositivo de carga acoplada. Es un circuito integrado que contiene un número determinado de condensadores enlazados o acoplados.
CDC	"Center for Disease Control and Prevention". Agencia de Control de Enfermedades en Atlanta USA.

CEQ 8800	Modelo de un sistema automatizado que usa electroforesis de capilares en el análisis genético, permite hacer secuenciación de ADN, AFLP® Fingerprinting y otros. Equipo fabricado por Beckman Coulter™
C-G	Citosina – Guanina
CL	Cromatografía Líquida
CRA	Capacidad de Retención de Agua
cRNA	RNA derivado de cDNA a través de una síntesis estándar de RNA.
CTAB	Cetrimonium bromide ((C ₁₆ H ₃₃) N (CH ₃) ₃ Br, Surfactante catiónico usado en el buffer de extracción de ADN.
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHAZ	Dirección de Higiene Alimentaria y Zoonosis
DIGESA	Dirección General de Salud Ambiental (Perú)
DNA	Ver ADN
E	Energía electromagnética transportada en la luz.
ECD	Detector de Captura de Electrones
EITF ó FTIR	Espectroscopia Infrarroja con Transformación de Fourier.
ELISA	Ensayo con sustancias inmuno adsorbentes unidas a enzimas
ESI-MS	Espectrómetro de masas con sistema de ionización de electrospray
ETAS	Enfermedades transmitidas por los alimentos.
FID	Detector con ionización de llama.
FPD	Detector fotométrico de llama para GC

FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster. Es un mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos. Se basa en que la excitación de un cromóforo puede transferirse a otro cercano, generalmente cuando ambos se sitúan en la misma molécula.
FT-IR	Fourier transform-infrared
GC	Cromatografía de Gases
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a espectrómetro de masas
GC-MS-MS	Cromatografía de gases acoplada a un detector de tipo espectrómetro de masas en tándem.
GMOs	Organismos genéticamente modificados.
<i>h</i>	Constante de Planck: Constante fundamental usada para calcular la energía de un Fotón. Representa al cuanto elemental de acción. Es la relación entre la cantidad de energía y de frecuencia asociadas a un cuanto o a una partícula.
HCN	Ácido Cianhídrico
HPCE	Electroforesis de capilares de alta performance.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
HSL	Acil-homoserina-lactona (Un factor de patogenicidad para Pseudomona.
ICPMS	Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo)
ILSI	International Life Science Institute
IMViC / IMVIC	Indol, Metilo, Voges-Proskauer, Citrato (Prueba de identificación bioquímica en microbiología).
ITS	Son secuencias cortas dentro de la unidades de transcripción pre -tRNA de los eucariotas (5' 18S – ITS1 - 5.8S – ITS2- 28S 3')

ITS1	Secuencia corta espaciadora entre la región 18SrDNA y la región 5.8SrDNA
ITS2	Secuencia corta espaciadora entre la región 5.8SrDNA y la región 28SrDNA
LC-MS-MS	Cromatografía líquida acoplada a un detector de tipo espectrómetro de masas en tándem.
Locus	Viene del latín locus, lugar; plural loci: es una posición fija sobre un cromosoma. Esta posición puede ser la posición de un gen o de un biomarcador (marcador genético). Una variante de la secuencia de ADN en un determinado locus se llama alelo.
M/z	Masa/carga
M13DNA	Un tipo de cebador o "Primer" de tipo arbitrario usado para PCR.
MIC	Mínima concentración inhibitoria de crecimiento microbiano.
MLST	Técnica conocida como tipificado por secuenciamiento en múltiple loci
MLVA	Análisis del número variable de tándems repetidos en locus múltiples
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MS	Espectrofotometría de masas
MS/MS	Espectrómetro de masas en tándem.
MVLST	"multiple virulence locus sequence typing " MVLST (Tipificado por secuenciamiento de múltiples locus de virulencia)
NPD	Detector para GC de tipo nitrógeno fósforo
ONPG	o-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside (Sustrato de la b-galactosidasa)
ORAC	Capacidad de absorción de especies radicales de oxígeno libres

PC12	Nombre de una línea celular de tipo células neuronales clonadas proveniente de rata que se puede adquirir de ATCC.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR- RFLP	Reacción en cadena de la polimerasa donde el amplificado es evaluado por el polimorfismo en la longitud de los fragmentos generados por el uso de enzimas de restricción.
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PID	Detector para GC de tipo fotoionización
PNAs	Péptido de ácido nucleico (donde el azúcar del ácido nucleico es reemplazado por un pseudopéptido)
pre -tRNA	unidades de transcripción pre RNA o RNA de transferencia
PVP	Polyvinylpyrrolidone: polímero soluble en agua conformado por unidades monómeras de N-vinylpyrrolidone.
qPCR	PCR cuantitativa
RAPD	Técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico
Rep-PCR	Técnica que amplifica con PCR las regiones que separan las secuencias de nucleótidos rep
RFLP	Técnica que estudia la digestión realizada por enzimas de restricción en fracciones amplificadas del genoma o de secuencias polimórficas de ADN.
RNA	ácido ribonucleico
RT	Transcripción reversa
RT-PCR	PCR de transcripción reversa, la cual puede ser en tiempo real.
S	(Unidades svedberg de ultrafiltración) es igual a 10 - 3 segundos

SDS	Sodium dodecil sulfato. dodecilsulfato sódico
SNP	Polimorfismo singular de nucleótidos
SYBR Green I	Es un agente intercalante utilizado en la tinción de ADN para el análisis por electroforesis de productos de PCR, o como fluorocromo utilizado como medio de visualización directa de los productos de la PCR en tiempo real
Taq polimerasa	Enzima polimerasa del ADN termostable, originalmente aislada, de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i> , microbio que vive por los general en las fuentes termales.
Trasgen	Es un gen o material genético que ha sido transferido ya sea de manera natural o con la ayuda de técnicas de ingeniería genética. Segmento de ADN conteniendo una secuencia genética aislada de un organismo e introducida en un organismo diferente.
T7RNA	RNA del bacteriofago T7, un virus capaz de infectar la mayoría de las cepas de <i>E.coli</i> . Su genoma es usado en biología sintética.
T7 DNA polymerase	Polimerasa obtenida del fago T7 y que se usa en biología molecular debido a su alta velocidad rápida iniciación.
TCD	International Life Science Institute
TGGE	Técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura.
TQ	Tandem quadrupole MS selectivity
UPLC	LC de ultraperformancia.
USDA	United States Department of Agriculture. (Departamento de Agricultura de Estados Unidos)
UV-VIS	Ultravioleta - Visible.
VNTR	Número variable de tándems repetidos

INDICE

A

Absorbancia, 53
 detectores, 67
ácido pícrico, 229
actividad enzimática, 220
ADN, 40
 extracción, 147
 Secuenciación, 127
adulteraciones
 detección con microarray, 139
AFLP, 196
alimento funcional, 16
Alzheimer, 227
Aminoácidos
 cuantificación, 79

B

Biología molecular, 39
Bioluminiscencia, 59
bioluminiscencia, 60
Bisphenol A, 233
Blotting, 169
 comparación, 170

C

cabina
 bioseguridad, 148
Cabinas
 flujo laminar, 147
Carbohidratos
 cuantificación, 76
Cebadores
 con fluoróforos, 203
 Diseño, 124
cianógenos, 228
Coloración Gram, 34
Crecimiento Microbiano, 237
Cromatografía gaseosa, 21
Cromatografía líquida
 detectores, 21
Cromatografía líquida, 19
Curvas de Inhibición, 95

D

detectores
 múltiples sistemas, 69
DGGE, 197
dNTP, 42

E

electroforesis, 43, 47, 82, 111, 115, 118, 119,
 128, 149, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166,
 168, 183, 188, 190, 193, 194, 197, 199, 207,
 208, 209, 211, 248, 252
gel de Agarosa, 163

sistema experion, 168

Electroforesis

de afinidad, 165
en gel, 161

Electrophoresis

de capilares, 166
espectrofotómetros, 61
Espectrómetro de Masas, 23
estereoradián, 56

ETAS

Comparación métodos de identificación, 178
Cuadro comparativo, 185

F

Fenólicos Totales, 89
Fluorescencia, 58
 detectores, 67
Formatos de ELISA, 231
 Competitivo, 231
Fosforescencia, 58
fotoluminiscencia, 58
FTIR, 26

G

GLOSARIO, 246
GMOs
 identificación con mycroarray, 136

H

HPLC, 20

I

ICPMS, 26
identificación de Microbios, 32
identificación de microorganismos
 AP-PCR, 193
 MLVA, 189
 PAGE, 187
 Sistema BAX, 201
Identificación de microorganismos
 RAPD, 193
 Rep- PCR., 191
IMViC, 38
Ionización de electrospray, 25
ITS, 44
 Amplificación, 215
 Anisakids, 212

K

kit de detección, 11

L

Laboratorio
 diseño, 149
Lectores, 61

Luminiscencia
detectores, 69
luz monocromático, 54

M

macronutrientes, 16
Melanina, 236
microarray
 bioactivos, 141
 genes de resistencia bacterianos, 142
 industria cárnica, 144
 industria vitivinícola, 146
 microarreglos, 135
Microarray
 lectores, 169
 procedimiento, 129
micronutrientes, 16
Microplate Reader
 modelos, 68
micropozos
 accesorios, 71
 formato, 62
 primeros lectores, 63
 variabilidad en los volúmenes, 65
 ventajas, 65
Micropozos
 mercado, 66
 tipos, 63
Multiskan
 fotometro, 64

N

Nanodrop, 159
nucleótidos
 incorporación, 131
nutrigenómica
 kits, 17
Nutrigenómica, 16

O

ORAC, 93

P

PCR, 41
 Combinada con hibridación, 200
 Multiplex, 114
 Nested, 116
 RFLP, 118

RFLP Esquema, 213
 tiempo real, 120
 tiempo real, equipo, 153
Polimorfismo singular de nucleótidos, 194
Proteína
 método bradford, 82
proteínas
 cuantificación, 74

Q

Quimioluminiscencia, 59

R

RAPD, 45
Ribotipado, 193
RNA, 40

S

scattering, 57
secuenciación
 microesferas, 133
 pirosecuenciación, 132
Secuenciamiento
 de ácidos nucleicos, 195
Síntesis proteica, 42

T

tablas de composición de alimentos, 14
técnicas moleculares
 Identificación de especies animales, 207
 inocuidad de alimentos, 203
 tipificación de especies, 208
termociclador
 buena amplificación, 152
termocicladores
 placas usadas, 151
Termocicladores, 150
transcripción reversa, 123
Transmitanci, 52

U

UPLC, 25

V

viabilidad celular, 225