

EMPLEO DE PROTOCOLOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE FRAUDE ALIMENTARIO

José David Flores Félix, Raúl Rivas González

Departamento de Microbiología y Genética
Universidad de Salamanca.

Palabras clave: Fraude alimentario, PCR, ADN, carne, alimentos.

Resumen

La industria alimentaria actual se basa en la producción a gran escala de alimentos tanto frescos como procesados, alcanzando estos productos un estimable valor de facturación debido principalmente a la acusada demanda de los consumidores o a la escasez de dichos productos. Esta situación implica un escenario económico muy susceptible a que aparezca el fraude. Aunque la motivación principal para cometer este tipo de fraudes es la motivación económica, en ciertas ocasiones se pueden generar problemas de salud pública. Actualmente, se han desarrollado una serie de técnicas moleculares basadas en el análisis de los ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa que facilitan la identificación de estos fraudes, agilizando los procesos de identificación y mejorando la fiabilidad de los resultados

Introducción

En la actualidad, en el sistema de marketing alimentario imperan los alimentos manufacturados y procesados. Esto es debido en parte a las facilidades que generan este tipo de productos en la vida actual, ya que reducen el tiempo de preparación y permiten su almacenamiento durante un mayor tiempo. Sin embargo, este tipo de productos son susceptibles de presentar alteraciones en la composición que el fabricante indica en el etiquetado, puesto que reconocer sus componentes y aditivos es una tarea cuanto poco difícil por parte del consumidor. Por lo que en muchas ocasiones puede aparecer el denominado fraude alimentario en este tipo de productos.

Para ser correctos, nos referimos a fraude alimentario cuando se produce el incumplimiento intencionado de la legislación alimentaria con respecto a la oferta de productos en cuyo etiquetado se alega una calidad o cantidad diferente a la señalada en dicho etiquetado. Esta situación genera desconfianza y rechazo por parte del consumidor lo que repercute negativamente en la confianza depositada en el producto consumido, razón por la cual, los organismos públicos destinan millones de euros todos los años a controlar y perseguir el fraude alimentario.

El fraude alimentario normalmente suele tipificarse en tres categorías diferentes, pero no excluyentes entre sí, en un mismo producto: la adición, la sustitución o la eliminación de una o varias sustancias. El primero de estos tipos, la sustitución, es uno de los fraudes denunciados con mayor frecuencia, en el que se sustituye uno de los



componente del producto por otro, normalmente de menor valor económico. En segundo lugar la adición, que suele estar relacionado con compuestos capaces de modificar las cualidades organolépticas o la capacidad de conservación del producto. En último lugar, la eliminación de uno de los componentes del producto indicados en la etiqueta está tipificado como fraude alimentario ya que altera las cualidades nutritivas del producto final.

Típicamente, el fraude alimentario ha sido difícil de perseguir salvo en casos sumamente evidentes, donde se observan irregularidades in situ en la cadena de producción, o aparecen problemas de salud pública que detonan una investigación por parte de las autoridades pertinentes (Deelstra et al., 2014). No obstante, en las últimas décadas las autoridades públicas encargadas del control alimentario están llevando a cabo una serie de estrategias proactivas con las que intentar detectar los posibles casos de fraude. Estas estrategias proactivas se han visto reforzadas con el desarrollo de técnicas moleculares que nos permiten detectar la presencia de sustancias o especies animales y vegetales no contempladas en un alimento y por tanto susceptibles de que sea considerado una estafa al consumidor.

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido detectar con suma rapidez los casos de adulteración de alimentos. La técnica PCR permite identificar especies, subespecies o variedades partiendo de tamaños de muestra pequeños y un equipamiento relativamente sencillo. El planteamiento del curso se centra en la obtención de conocimientos teórico-prácticos para la detección del fraude alimentario, conocer las principales técnicas moleculares utilizadas para detectar el fraude alimentario en el marco de la Unión Europea y aplicar técnicas moleculares a la detección de productos fraudulentos.

Contenidos y metodología

Para conseguir la consecución de los objetivos propuestos se tuvieron en cuenta un planteamiento teórico-práctico estructurado en los siguientes bloques temáticos: 1.- el fraude alimentario: características e importancia; 2.- tipos de fraude alimentario; 3.- técnicas moleculares para la detección del fraude alimentario; 4.- recolección y procesado de muestras alimentarias; 5.- realización del análisis y evaluación de la naturaleza de diferentes muestras cárnicas. 6.- futuras perspectivas en la detección del fraude de alimentos; y 7.- casos reales y análisis de los mismos.

El curso se estructuró en dos días consecutivos con el fin de poder realizar de forma correcta las actividades prácticas planteadas. La realización de actividades prácticas se llevó a cabo utilizando kit comerciales para facilitar la futura aplicación de las técnicas y destrezas adquiridas durante el curso a su futura vida laboral.

Para comenzar, se inició a los alumnos en el concepto de fraude alimentario y sus connotaciones en el panorama mundial de la industria alimentaria. Se diferenciaron las variantes que son consideradas fraude alimentario, mostrando la importancia que tiene para el consumidor el correcto etiquetado y la correcta composición de los productos procesados. A continuación, se estudiaron las diferentes técnicas que se aplican de forma rutinaria para la detección de fraude alimentario como son los perfiles de ácidos grasos, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y técnicas inmunológicas. En último lugar, la explicación se centró en la Reacción en Cadena de la Polimerasa,

analizando el fundamento de esta técnica y sus diferentes variantes y aplicaciones en el campo del fraude alimentario.

Para poder implementar la técnica de PCR sobre el fraude alimentario (Mullis y Faloona, 1987), es conveniente darle una direccionalidad en función de qué tipo de muestras queremos analizar, si bien las identificaciones específicas deben ir encaminadas a la amplificación de un gen común a todas las especies que puedan estar presentes en la muestra, como por ejemplo en los animales, donde el gen muestreado suele ser el gen que codifica para el citocromo b mitocondrial, esencial para el correcto funcionamiento celular (Doosti et al., 2014). Esta técnica también es aplicable para la detección específica de ciertas especies u organismos como por ejemplo es el caso de los organismos modificados genéticamente (OMG), donde el gen amplificado será aquel que haya sido introducido, debido a que su presencia sólo podrá ser detectada cuando el OMG se encuentre en la muestra.

El curso continuó con la primera parte práctica, en la que se procedió a realizar el procesado de los productos a partir de diferentes muestras cárnicas de diversa naturaleza. Para realizar esta actividad se utilizó el SpeedTools Tissue DNA Extraction kit de la marca comercial Biotools, B & M Labs ® (España), que permite realizar la extracción de ADN procedente de muestras cárnicas sin procesar o con un procesado medio. Se siguió el protocolo comercial facilitado por la empresa partiendo de 25mg de tamaño de muestra para obtener una cantidad aproximada de 100 ng de ADN que nos sirva como ADN molde para la posterior amplificación utilizando también un kit de la misma marca comercial y diseñada específicamente para la detección de especies animales en muestras cárnicas. Este kit, denominado BioFood Mixed Kit, se basa en una PCR múltiple, pues en la reacción se incluyen diferentes primers u oligonucleótidos que amplifican regiones de diferente tamaño del citocromo b de vertebrados en función de la especie presente (Figura 1), además tiene un rango de detección de hasta el 1%.

Especie	Tamaño producto
Cabra	157 bp
Pollo	227 bp
Vaca	274 bp
Oveja	329 bp
Cerdo	398 bp
Caballo	439 bp

Figura 1. Tamaño esperado de las bandas amplificadas en función de la especie presente en la muestra.

En la segunda jornada, se impartieron conocimientos teóricos acerca de la legislación europea y española que regula el fraude alimentario, además de los sistemas de alerta europeos que la Unión Europea tiene a disposición de sus ciudadanos. Estos sistemas de alerta están gestionados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que gestiona e integra los sistemas de los países miembros para gestionar los problemas de salud pública y fraude alimentario que aparecen dentro de la UE.

Posteriormente se analizaron los casos más destacables de fraude que han sido detectados, así como aquellos que han saltado a la opinión pública en los últimos años, analizando de forma más profunda el caso de la crisis de la carne de caballo, donde el fraude alimentario fue detectado por un análisis rutinario de hamburguesas de ternera

en Irlanda y cuya problemática implicaba un caso sumamente complejo de compraventa de carne de caballo.

Durante la segunda jornada del curso, se llevó a cabo la visualización de las muestras para lo que se utilizó una electroforesis en gel de agarosa, permitiéndonos separar las moléculas de ADN amplificado en función del tamaño de las mismas. El ADN amplificado no es visible a simple vista, por lo que se utilizó bromuro de etidio para teñirlo, un compuesto intercalante que al ser excitado con luz ultravioleta emite radiación visible, permitiéndonos localizar las moléculas amplificadas.

Resultados

Los alumnos desarrollaron de forma satisfactoria las dos actividades prácticas planteadas obteniendo los resultados esperados. Estas actividades se plantearon desde un punto de vista proactivo, partiendo de muestras ciegas con el fin de incentivar en los alumnos el análisis propio de los resultados. Se partió de 10 muestras diferentes como pueden ser hamburguesas, salchichas, carne picada o filetes de diferentes especies. Se incluyeron en la reacción de PCR diferentes controles de ADN para que sirvieran de referencia para el posterior análisis de los resultados, además de un control negativo sin ADN para verificar la pureza de los reactivos utilizados y descartar falsos positivos. La visualización de los resultados fue analizada por los alumnos en función de la imagen obtenida (Figura 2).

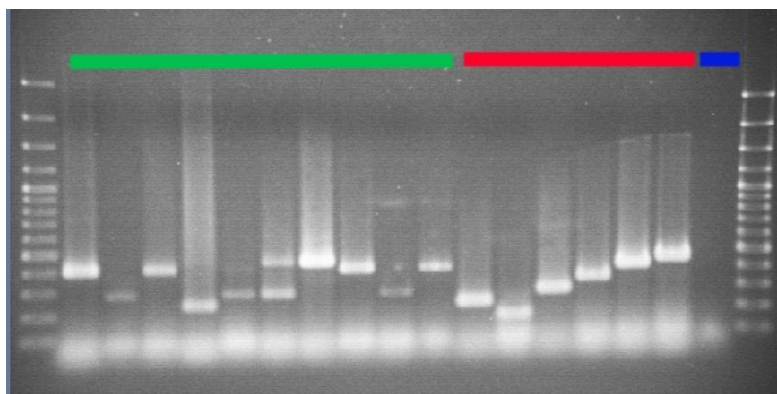


Figura 2. Fotografía del gel realizado durante el curso. En verde muestras analizadas por los alumnos, en rojo, controles de ADN y azul, control negativo.

Para tener en cuenta la percepción que los alumnos habían tenido del presente curso se realizó una encuesta para que ellos valoraran de forma anónima los distintos aspectos, como su formación, su nivel de satisfacción en la calidad de los ponentes y en general con el curso, entre otros. Algunos de estos aspectos fueron evaluados mediante una escala de valoración tipo Likert del 1 al 5, siendo 1 muy malo y 5 excelente.

De entre los asistentes al curso, había un claro predominio de alumnos de Grado de diferentes titulaciones (58%), seguido por alumnos de Postgrado (29%) y tan sólo dos asistentes (12%) pertenecían a PAS y PDI. Los alumnos de Grado y Postgrado matriculados pertenecían un 47% a la Facultad de Farmacia (8/17), un 35% a la Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales (6/17), un 12% a la Facultad de Biología (2/17) y un 6% de la Facultad de Ciencias (1/17). Los mecanismos de difusión por los que habían

conocido el curso fue mayoritariamente la web de la Facultad de Farmacia y la plataforma Eventum (64%), aunque la comunicación por parte de un profesor (17%) o de un amigo (17%) habían jugado un papel importante a tener en cuenta en la divulgación de este curso.

Entre los asistentes al curso se observa un rango de edad entre los 19 y 48 años, aunque la mayor parte se encuentra en el rango de los 23-28. La calidad del curso y de los ponentes se evaluó en un escala del 1 al 5, mostrando un 100% de los alumnos una valoración de muy buena o excelente en lo que a calidad del curso, calidad del ponente o la utilidad del curso. Los alumnos evaluaron también su satisfacción con el curso en una escala del 1 al 10, obteniendo un nivel de satisfacción del 9,23, donde un 83% de los alumnos (14/17) mostraron una satisfacción de 9 o mayor, y un 17% (3/17) entre 7 y 8. Debemos tener en cuenta, que aunque los alumnos han valorado la materia impartida y la calidad del curso como muy buena o excelente, han mostrado su descontento en lo que a duración se refiere, obteniéndose la peor valoración de los aspectos evaluados unido a comentarios donde se indicaba claramente que preferían una mayor duración del curso para poder profundizar aún más en la materia. En último lugar, destacar que la mayoría de los alumnos han expresado su conformidad con la labor docente y la dinámica del curso, definiéndolo como divertido, entretenido y útil, además de ser muy recomendable

Conclusión

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos, podemos concluir que el curso ha tenido un gran éxito de participación y una valoración muy positiva. La diversidad en la procedencia de los alumnos así como las calificaciones obtenidas en cuanto a calidad, satisfacción y utilidad del curso mostrada por las valoraciones de los alumnos pone de manifiesto el interés que suscitan este tipo de cursos teórico-prácticos y en particular los relacionados con el tema del fraude alimentario por lo que se reafirma nuestra opinión sobre la utilidad de este tipo de actividades como formación complementaria de alumnado.

Bibliografía

1. Deelstra H, Burns DT, Walker MJ. The adulteration of food, lessons from the past, with reference to butter, margarine and fraud. *Eur Food Res Technol* 2014; 239: 725–44.
2. Mullis, K. B. y Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* .1987, 155: 335-350
3. Doosti A, Ghasemi Dehkordi P, Rahimi E. Molecular assay to fraud identification of meat products. *J Food Sci Technol*. 2014; 51: 148–52.