



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

AUTENTIFICACION DE CARNE DE CERDO Y DETECCION DE
SOYA EN VARIEDADES DE JAMON COCIDO, MEDIANTE LA
AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS ESPECIFICOS DEL DNA
MITOCONDRIAL (mtDNA) CON LA TECNICA DE REACCION
EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

VANESSA GUADALUPE ROLDAN HUITRON

ASESORES: DR. JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA

DRA. PATRICIA MIRANDA CASTRO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

Autenticación de carne de cerdo y detección de soya en variedades de jamón cocido, mediante la amplificación de fragmentos específicos del DNA mitocondrial (mtDNA) con la técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR).

que presenta la pasante: Vanessa Guadalupe Roldán Huitrón
con número de cuenta: 09606052-8 para obtener el título de :
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de abril de 2005

PRESIDENTE Dr. José Francisco Montiel Sosa

VOCAL Dra. Sara E. Valdés Martínez

SECRETARIO QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz

PRIMER SUPLENTE Dra. Olivia García Mellado

SEGUNDO SUPLENTE MC. María Guadalupe López Palacios

A LA UNAM:

A la máxima casa de estudios, por darme la oportunidad de formar parte de ella, de la que estoy orgullosa y de la que espero lo este de mi ya que pondré en alto su nombre siempre que pueda.

A LA FESC:

Por ser la que me permitió estudiar en ella para formarme como profesional y pasar en ella momentos gratos y otros no tan gratos aunque todos importantes.

A MIS MAESTROS:

Por que sin ellos todo esto no hubiera sido posible, ya que me guiaron y me enseñaron que la mejor arma para enfrentar la vida es el conocimiento. Al Dr. Francisco Montiel y la Dra. Patricia Miranda por su confianza y apoyo, a los Sinodales por su tiempo y dedicación para la mejor realización de este trabajo.

A MIS PADRES:

Por que gracias a ellos y a su guía he llegado a ser la persona que soy y he alcanzado una mas de mis metas que es llegar hasta aquí, pero gracias principalmente a mi Mamá ya que sin su apoyo incondicional, cariño, comprensión, confianza y por su esfuerzo para pudiera llegar hasta aquí.

A RICARDO:

Por su apoyo, amor, paciencia, por estar siempre ahí para escucharme y comprenderme, por alentarme a no darme por vencida y acompañarme en este momento tan importante en mi vida.

A MIS AMIGOS:

A mis amigas, amigos y a todas las personas que pasaron por mi vida por que me ayudaron a culminar con una de las etapas más importantes de mi vida y por darme momentos gratos en su compañía.

GRACIAS

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION | 7 |
| JUSTIFICACION | 8 |
| OBJETIVOS | 9 |
| CAPITULO I: GENERALIDADES | |
| 1.1 Antecedentes | 10 |
| 1.1.1 Que es la calidad | 15 |
| 1.1.2 Que es una adulteración | 16 |
| 1.1.3 Tipos de adulteración | 16 |
| 1.2 Importancia del etiquetado | 17 |
| 1.3 Antecedentes de las secuencias de interés | 19 |
| 1.3.1 Cerdo | 19 |
| 1.3.1.1 Definición de carne | 19 |
| 1.3.2 Definición de jamón | 21 |
| 1.3.2.1 Clasificación | 21 |
| 1.3.2.2 Diagrama de Proceso de la fabricación del jamón | 22 |
| 1.3.2.3 Descripción del proceso | 23 |
| 1.3.3 Aditivos | 27 |
| 1.3.3.1 Tipos de aditivos | 27 |
| 1.3.4 Soya | 29 |
| 1.3.4.1 La soya en los cármicos | 30 |
| 1.4 Métodos para identificación y autentificación | 31 |
| 1.4.1 Técnicas basadas en proteínas | 32 |
| 1.4.2 Técnicas basadas en ácidos nucleicos | 34 |

| | |
|---|----|
| 1.5 Que es el PCR | 34 |
| 1.5.1 Componentes y optimización de la reacción de amplificación..... | 36 |
| 1.5.2 Aplicaciones del PCR | 43 |
| 1.6 El DNA mitocondrial | 44 |
| 1.6.1 Selección de secuencias del mtDNA para la amplificación | 47 |
| 1.7 Diseño y selección de primers | 49 |
| 1.7.1 Que son los primers | 49 |
| 1.7.2 Selección | 50 |
| 1.8 Extracción de DNA | 50 |
| 1.9 Métodos complementarios al PCR | 51 |
| 1.9.1 Electroforesis | 51 |
| 1.9.2 RFLP | 52 |
| 1.9.3 RAPD | 53 |
| 1.9.4 SSCP | 53 |
| 1.9.5 Secuenciación del DNA | 54 |

CAPITULO II: METODOLOGIA EXPERIMENTAL

| | |
|---|----|
| 2.1 Cuadro metodológico | 57 |
| 2.1.1 Descripción del cuadro metodológico | 58 |
| 2.2 Diseño de primers | 58 |
| 2.3 Materiales | 59 |
| 2.3.1 Material biológico | 59 |
| 2.3.2 Reactivos y productos biológicos | 60 |
| 2.3.2.1 Extracción de DNA | 60 |
| 2.3.2.2 Amplificación | 60 |

| | |
|--|----|
| 2.3.2.3 Electroforesis en gel de agarosa | 61 |
| 2.3.3 Equipo | 61 |
| 2.4 Métodos | 62 |
| 2.4.1 Extracción de DNA | 62 |
| 2.4.2 Autenticación | 63 |
| 2.4.2.1 Diseño de Programas para el PCR | 63 |
| 2.4.3 Electroforesis en gel de agarosa | 65 |

CAPITULO III: RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 3.1 Extracción y cuantificación del DNA | 66 |
| 3.2 Especificidad de los primers elegidos para la detección específica de cerdo | 68 |
| 3.3 Efectividad de los primers diseñados para la amplificación específica de soya | 64 |
| 3.4 Confirmación de la utilidad de los primers diseñados para la amplificación de soya, evaluada en diferentes presentaciones de la muestra | 70 |
| 3.5 Evaluación de la presencia de cerdo y soya en diferentes jamones cocidos Comerciales | 71 |

CAPITULO IV: DISCUSIÓN76

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES80

BIBLIOGRAFIA82

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Componentes de distintas partes del cerdo | 20 |
| Tabla 2. Formulación del jamón | 26 |
| Tabla 3. Composición del jamón | 26 |
| Tabla 4. Algunos componentes importantes de la soya | 31 |
| Tabla 5. Concentración de la extracción del DNA..... | 66 |
| Tabla 6. Distribución de las muestras en el gel 7 ^a | 72 |
| Tabla 7. Distribución de las muestras en el gel 7 ^b | 73 |
| Tabla 8. Resultados de las distintas marcas de jamón | 75 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Termociclador | 39 |
| Figura 2. Secuencia de PCR | 42 |
| Figura 3. Estructura del mtDNA | 47 |
| Figura 4. Gel de PCR con primers de cerdo y otras especies | 68 |
| Figura 5. Gel de PCR con primers de soya y otras especies | 69 |
| Figura 6. Gel de soya | 70 |
| Figura 7a. Gel de PCR muestras de la 1-5 | 71 |
| Figura 7b. Gel de PCR muestras de la 6-10 | 73 |

RESUMEN

Hoy en día la biotecnología juega una parte importante dentro de la industria alimentaria, pues el análisis de los alimentos requiere de técnicas cada vez más sofisticadas, eficaces y específicas, una de estas técnicas y la cual se basa en la utilización del DNA es la Reacción en Cadena de la Polimerasa la cual es la base del presente trabajo.

En el presente trabajo se realizó el estudio de identificación y autenticación para carne de cerdo y soya en diferentes marcas comerciales de jamón cocido, mediante la amplificación de un fragmento específico del DNA mitocondrial con la técnica de la PCR.

La especificidad de los primers utilizados para la amplificación de cerdo y soya fueron evaluados con DNA de bovino, pollo, conejo, soya y cerdo según el caso. Al realizar la amplificación para las diferentes marcas comerciales de jamón se encontraron bandas de 531 pb y 305 pb los cuales pertenecen a la presencia de cerdo y soya respectivamente, no encontrando en ningún caso la omisión de estos ingredientes en el etiquetado de estos productos.

Demostrando con ello que la técnica al igual que los primers elegidos dan resultados satisfactorios, aun en productos que han sido sometidos a procesos térmicos.

INTRODUCCION

El jamón cocido es un producto cármico de gran aceptación. Por este motivo y su versatilidad en el precio es susceptible ha adulteraciones o a etiquetarse de manera incorrecta por parte del productor, lo que generaría disminución en los costos de producción y fraude a los consumidores.

Una adulteración es la incorporación de uno o más ingredientes sin ser especificados en la etiqueta, así como la adición de aditivos prohibidos por ser dañinos para la salud del ser humano de manera intencional, accidental o en proporciones no adecuadas, así como el de incluir en las especificaciones de la etiqueta ingredientes o aditivos que el producto no contiene¹⁷.

La norma oficial de calidad NOM-158-SCFI-2003⁵¹ no permite la adición de emulsificantes ni caseinatos entre otros, solo de aislados proteicos de soya en concentraciones no mayores al 2 %, no queriendo decir con esto que no se le adicione otros ingredientes; pero si contiene otros aditivos, deben estar todos reportados en la etiqueta y deben agregarse en las concentraciones permitidas para no ocasionar daño a los consumidores. Es importante que se reporten los ingredientes que el producto contiene, ya que si no se realiza de esta manera entonces ese producto puede considerarse como adulterado⁵¹.

Para la autenticación de especies o su identificación se cuenta con diversas técnicas analíticas, entre las que se encuentran las que utilizan a los ácidos nucleicos, ya que como sabemos aportan varias ventajas con relación a la utilización de proteínas, principalmente la estabilidad térmica, lo que permite una mas segura identificación en productos procesados térmicamente. En estas estrategias, así como en el presente trabajo se utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que se ha convertido en una poderosa herramienta de análisis. Para estos estudios el DNA mitocondrial (mtDNA) se prefiere en lugar del DNA nuclear por diferentes ventajas que presenta ésta molécula como lo son su número de copias por molécula, su amplio conocimiento en un gran número de especies de importancia alimentaria, así como su gran variabilidad intra e inter específicamente hablando⁴⁶.

En este trabajo se evalúan distintos jamones cocidos que comercialmente se distribuyen en la Ciudad de México, con el propósito de evaluar el tipo de carne empleada en su elaboración y la posible presencia de soya. Con este propósito se eligió una pareja de primers que amplifica un fragmento de 531 pb de la región del D-loop del mtDNA del cerdo, de acuerdo con lo propuesto por Dr. Montiel Sosa y col. (2000)⁴⁶.

Para la identificación de la soya en los diferentes jamones evaluados, se diseñó una pareja de primers de 21 y 23 pb respectivamente que amplifican un fragmento de 305pb que corresponde a los genes del atp6 y cox2 del mtDNA de la soya ³³.

JUSTIFICACION

El jamón es uno de los productos cárnicos con mayor demanda entre otros aspectos por su tiempo de vida de anaquel. El productor quiere llegar a todas las personas manejando así precios al alcance de todos los bolsillos y debido a esto, los productores recurren a la adición de compuestos que permiten ligar una mayor cantidad de agua aumentando así los rendimientos, empleando una menor cantidad de carne y proporcionando al producto las mismas características organolépticas y en ocasiones nutricionales como contenido de proteína, que las de un producto elaborado con pierna de cerdo como materia prima principal y aditivos como conservadores, emulsificantes, caseinatos, aislados proteicos (soya), nitratos y nitritos, que pueden ser considerados como adulteraciones. Si estos existen en el producto y no están reportados en la etiqueta o se encuentran en concentraciones no permitidas ^{26, 51}.

Por lo anterior, es necesario que el consumidor conozca y consuma lo que se especifica en la etiqueta, ya que el jamón debe de elaborarse con carne de cerdo, y para comprobar la existencia de esta especie y la presencia de soya, se requiere de un análisis de autenticación el cual puede realizarse con una técnica específica como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual consiste en la replicación de un fragmento específico del DNA mitocondrial del cerdo y la soya, para posteriormente realizar un análisis electroforético en donde se pueda comprobar la existencia de estas especies, comparándolas con un patrón bien conocido.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Autenticación de contenido de carne de cerdo y detección soya en variedades de jamón cocido mediante la amplificación de fragmentos específicos del mtDNA utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Objetivo particular 1:

Diseñar el protocolo de PCR con DNA mitocondrial que permita la autenticación de cerdo y no otra especie en jamón.

Objetivo particular 2:

Diseñar el protocolo de PCR con DNA mitocondrial que permita la autenticación de soya y no otra especie en jamón.

Objetivo particular 3:

Autenticar la presencia de carne de cerdo y soya en diferentes jamones cocidos comerciales.

CAPITULO I: GENERALIDADES

1.1 ANTECEDENTES

Desde la aparición de la biotecnología como herramienta de apoyo para la investigación se han realizado diversos estudios con técnicas de ácidos nucleicos y una de las más importantes es el PCR como método de identificación entre otras aplicaciones de la técnica.

En el año 1998, Akira y col. realizaron estudios para identificar y secuenciar la región del *cox2* y *atp6* que serviría para la identificación de la soya entre otros estudios de secuenciación, utilizando soya silvestre y soya cultivada. Encontraron que en las regiones antes mencionadas se repetían secuencias de 299 y 23 bp³³.

Aranda y col. En 1999 realizaron una recopilación de las técnicas de ácidos nucleicos que se pueden utilizar para la detección *C. botulinum* y destacaron el uso de la técnica de PCR ya que ésta pudo detectar distintos tipos de *C. Botulinum* como el tipo A, B, E, y F con un solo ensayo y con alta sensibilidad y especificidad¹. También Martínez Iciar y Malmheden Yman Ingrid (1999) utilizaron el método de RAPD el cual realiza una especie de huellas digitales para cada especie y funciona con el fundamento de la PCR, este fue usado para la identificación de especies utilizadas en varios productos cárnicos. Las especies que fueron probadas en los productos fueron: res, caballo, mula, búfalo, burro, alce, cordero, cabra, canguro, avestruz; se identificaron en trozos empaquetados, como carne roja congelada, para verificar en el etiquetado el contenido de carne de res y puerco en el salami y en productos enlatados. El análisis de RAPD produjo huellas claras de los productos analizados con la cual se pueden identificar fácilmente las especies. Todos los productos fueron correctamente etiquetados excepto uno de los paquetes que contenía trozos congelados de carne roja vendida como res, este producto no contenía ninguna de las especies antes mencionadas y muy probablemente contenía alguna raza diferente a estas⁴¹.

En el mismo año Matsunaga y col. (1999) amplificaron e identificaron seis especies (cordero, pollo, res, oveja, puerco y caballo) de manera simultánea de carne fresca para algunos productos. Emplearon mezclas de 7 primers en las proporciones apropiadas, estos fragmentos específicos de DNA de cada especie pueden ser amplificados por un solo multi PCR. Los fragmentos obtenidos de DNA fueron de 157, 227, 274, 331, 398 y 439 bp para cordero, pollo, res, oveja, puerco y caballo respectivamente. La identificación es posible por electroforesis de los productos de PCR. Los fragmentos de DNA de cordero, pollo, res, oveja y puerco fueron amplificados aún después de ser sometidos a temperaturas de 100 y 120 °C por un tiempo de 30 minutos, pero los fragmentos de DNA de caballo no se pudieron detectar a una temperatura de 120°C ⁴⁴.

Por otra parte se encuentra una recopilación de estudios sobre el DNA contenido en las mitocondrias por Taanman Jan-Willem (1999) explica la importancia de la mitocondria en la célula, y la importancia y origen del DNA mitocondrial así como de su estructura y función⁵⁴. Y Wolf Christian y col. (1999) realizaron un estudio PCR-RFLP de análisis del DNA mitocondrial: Que se considera un importante método para la identificación de especies. Este método para la identificación de especies ha sido empleado con las bases de la amplificación de especies partiendo del genoma mitocondrial (tRNA^{GLU}/ cytochrome b) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método distingue entre varias especies, se obtuvo como producto de PCR 464 bp de longitud que se cortó con diferentes endonucleasas de restricción (RE) resultado del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) específicos de cada especie. Aún en especies muy similares se puede distinguir con la aplicación de una o dos endonucleasas de restricción ⁵⁹.

Andrew K. Lockley y Ronald G. Bardsley (2000) realizaron con la técnica de PCR la amplificación de una parte del gen del citocromo b para la diferenciación de *Thunnus thynnus* y *Sarda sarda* ya que ésta técnica es más rápida que cualquier otra técnica anteriormente descrita para esta determinación ⁵⁸.

En el 2000 Montiel Sosa y col. seleccionaron primers altamente específicos para la detección de cerdo en la zona del D-loop del mtDNA que han sido designados, usados y amplificados con PCR en condiciones controladas. La PCR amplificó una banda de 531 bp para puerco. Se probó en mezclas con DNA de bovino, ovino, pollo y humano y en muestras sometidas a cocimiento y en ambos casos se obtuvieron resultados favorables ⁴⁶.

Wolf, Christian y Juerg Luethy (2001) realizaron la cuantificación de PCR para DNA porcino. Destacando que para proteger a los consumidores de fraudes y declaraciones erróneas, no solo es necesario cuantificar, sino también monitorear el contenido de ciertos ingredientes, para ello, son necesarias las técnicas basadas en el DNA como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha sido utilizada para la identificación de especies. La especificidad de los nuevos primers fue evaluada con DNA de res, oveja, pollo y pavo. La concentración ha equilibrado los contenidos de DNA porcino de 2 al 20% por las mezclas contenidas de porcino, con resultados satisfactorios⁵⁸.

En el 2001 Bellagamba Federica y col. Utilizaron la PCR para amplificar cada variable del gen citocromo b del mtDNA. La identificación fue determinada por la digestión de la amplificación obtenida con enzimas de restricción de 359 bp, el cual generó un patrón electroforético de especies específico, la secuenciación de productos de PCR ha sido usada para la confirmación del análisis. El análisis de PCR-RFLP revela la presencia de carne animal en comida y distingue las especies de interés. Los resultados sustentan la aplicación del método en medidas de control que debería ser adoptado para el estudio de comida cárnica para animales como es sugerido por la ley de E.U. Como técnica mejora y simplifica el análisis, el número de enzimas de restricción presentada en este trabajo es mayor al reportado por la literatura, este método distingue entre especies rumiantes y no rumiantes, entre mamíferos y ovíparos, el estudio fue posible con pocas digestiones³.

Calvo, J.V. y col. (2001) desarrollaron y evaluaron con PCR la detección de puerco procesado y sin procesar en salchichas, comida enlatada, productos curados y pathé aislaron un nuevo fragmento de DNA específico para puerco. Después de analizar la respectiva secuencia un par de primers fue sintetizado. Para confirmar la especificidad del fragmento se realizaron amplificaciones con 55 muestras de sangre de cerdo de diferentes clases obteniendo resultados positivos. Con 200 muestras de otras especies, la especificidad del amplificado no es detectada. Obtuvieron que usando este método se puede cuantificar el grado de contaminación, dependiendo de la cantidad de ciclos del PCR, detectando por arriba del 0.005% puerco en res y 1% puerco en pato (paté) usando 30 y 20 ciclos de amplificación de PCR respectivamente. La cantidad de DNA de puerco detectado es 1.25 y 250 pg si se usan 30 y 20 ciclos respectivamente. El puerco ha sido detectado en ambos casos sin procesar y procesado en salchichas, comida enlatada, hamburguesas y paté. En conclusión, la técnica de PCR es poderosa para la amplificación de puerco procesado y sin procesar (con 30 ciclos de amplificación puede detectar 0.005% de puerco). Es un método rápido que detecta una contaminación del 1% con 20 ciclos⁴.

Para el 2002 Bert Popping realizo una recopilación de las técnicas de ácidos nucleicos utilizadas para el análisis de alimentos y bebidas marcando la importancia del PCR para el estudio. La industria de alimentos y bebidas ha perdido una importante cantidad de dinero y el consumidor ha sido engañado, debido a la falsificación de productos, el etiquetado fraudulento y la venta de productos de baja calidad como productos premium. Aunque antes era difícil establecer a ciencia cierta los tipos de fraudes, con la llegada de la biotecnología moderna y con los métodos basados en ácidos nucleicos toman una gran contribución al proyecto de las marcas de alta calidad y protege al consumidor. Varios años atrás, la tecnología del DNA era considerada como métodos empleados en las universidades, principalmente con la finalidad de investigación y no en aplicaciones en la vida cotidiana. Sin embargo esto ha cambiado y un gran numero de laboratorios especializados ofrecen sus servicios a la industria, con técnicas específicas utilizadas para la autenticación ⁴.

En el 2002 Calvo, J.V y col. realizaron diversos trabajos con PCR entre ellos Cuantificación y detección de carne de cerdo y res en crudo y sometida a calor (pathé)¹⁸, obteniendo una sensibilidad y especificidad con 30, 25, y 20 ciclos de PCR con cada fragmento y pudo detectar hasta 0.005%, 0.1% y 1% de puerco con res en crudo y puerco en paté respectivamente. Las estimaciones cuantitativas para la determinación de adulteración de manera intencional o accidental de puerco con res en el pathé son importantes. El proceso de PCR ha demostrado y evaluado cuantitativamente la presencia de puerco en crudo y sometido a un proceso térmico y en pathé por densitometria usando un fragmento específico y repetitivo de DNA. Con 30,25,20 ciclos de PCR para encontrar la mejor curva estándar y coeficiente de correlación en contenido de puerco y la intensidad de la banda. Con 20 ciclos se encontraron los mejores resultados localizando contaminaciones de res en puerco por arriba del 1% y de puerco en pathé con un mínimo error. Finalmente los fraudes fueron encontrados en pahtés comerciales⁷. Evaluaron con PCR la presencia de carne de res y bovino en carne sin procesar y procesada en salchichas y comida enlatada. Para confirmar la efectividad y sensibilidad del fragmento seleccionado para la amplificación lo corroboraron con 45 muestras de sangre de ganado obteniendo resultados positivos. Con 125 muestras de otras especies obtuvieron la evaluación de la especificidad ya que no amplificó otra especie. Usando este método se pudo detectar el grado de contaminación por arnba del 0.01% en res y cerdo crudo y el 1% en mezclas de carne cocinada y mezclas de bovino. La res fue identificada en ambos casos en crudo y sometida a un proceso térmico en productos como salchicha comida enlatada y hamburguesas. En conclusión la técnica de PCR es poderosa para la identificación de res procesada y sin procesar porque es simple, específica y sensible. Además, los ingredientes nutritivos de un alimento como es la carne pueden ser

verificados. El proceso es mucho más barato que otros métodos basados en RFLP-PCR, inmunodifusión y otras técnicas que requieren de equipo costoso ⁶.

Con el paso de los años se siguen dando experimentos con el PCR y en el 2003 Yu-Ling Sun y Chich-Sheng Lin. realizaron estudios con un método de reacción en cadena de la polimerasa fluorescente - polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCRRFLP) ha realizado análisis cuantitativos e identificación de carne. Con la ayuda de las secuencias específicas de DNA del gen 12S ribosomal RNA (12S rRNA) del DNA mitocondrial para carne de porcino, caprino y bovino. No pudo ser amplificado el DNA para perro, gato, pescado, pato, ganso, pavo y pollo con el mismo par de primers. Usando un sensor capilar fluorescente para electroforesis y con las enzimas de restricción obtuvieron las huellas de puerco, cabra, y res. La sensibilidad de la prueba detecto menos del 1% de mezclas binarias de puerco, cabra y res. Si la carne se somete a cocimiento o esterilización se demostró que esto no influye en la obtención de los perfiles de PCR-RFLP ⁵³.

En el 2004 Saez, R. y col. realizaron técnicas basadas en PCR para la detección rápida de especies animales en productos cárnicos demostrando que es un método reproducible, rápido, simple para amplificaciones simultáneas de múltiples especies en un mismo paso ya que está basado en una amplificación de DNA arbitrario. Ejemplos representativos de varias especies y productos cárnicos son delimitados por diferentes procesos y condiciones seleccionadas para verificar la aplicación de la técnica. RAPD-PCR permitió la distinción entre puerco, res, cordero, pollo y pavo en todos los casos. Los ejemplos correspondientes muestran especies que son similares. El DNA que se amplifica reproduce un gran número de bandas y hace posible la interpretación de los resultados por simple inspección visual. AP-PCR también permitió la identificación de algunas especies aunque es mas complicado el modelo que genera, incluyendo algunas pequeñas intensidades de las bandas. En ambos casos el tiempo de annealing (anillado o tiempo de apareamiento) y temperaturas de extensión lograron una buena producibilidad. En general, la simplicidad del modelo de RAPD-PCR pudo hacer esta técnica adecuada para la autenticación en análisis de rutina ⁴⁹.

Por todo lo anterior las técnicas de identificación o autenticación como la PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR son tan importantes ya que estas comparadas con un patrón determinan la presencia de un aditivo, organismo o especie y lo certifican ⁵⁵.

El control de calidad es un: “Sistema de métodos para la provisión coste-eficaz, de bienes o servicios cuya calidad es adecuada a los requisitos del comprador”²⁶ y este es importante para la fabricación adecuada de todos los productos ya que es lo que determina el precio y la preferencia del consumidor entre otras cosas.

Los productos cárnicos como el jamón cocido no es la excepción debido a su gran demanda. Algunos productores de éste recurren a la adición de compuestos que permiten ligar mayor cantidad de agua aumentando los rendimientos, empleando una menor cantidad de carne y proporcionando al producto las mismas características organolépticas y en ocasiones nutricionales como contenido de proteína que las de un producto elaborado con pierna de cerdo como materia prima principal. Además, estos aditivos pueden ser considerados como adulteraciones, ya que una adulteración es la incorporación de uno o más ingredientes sin ser especificados en la etiqueta, así como la adición de aditivos prohibidos (dañinos para la salud del ser humano) de manera intencional, accidental o en proporciones no adecuadas, así como el de incluir en las especificaciones de la etiqueta ingredientes (Materia prima, nutrientes, aditivos, etc.) que el producto no contiene ^{13,26}.

La Norma Oficial Mexicana NOM-158-SCFI-2003 para jamón de pierna cocido permite los siguientes aditivos:

- ✓ **Oxidantes:** Nitrito de sodio 156 mg/kg, 156 ppm como máximo en producto terminado.
- ✓ **Antioxidantes:** Ascorbato y/o Eritorbato de sodio, mínimo 0.5%.
- ✓ **Estabilizadores:** Polifosfatos de sodio y/o potasio, máximo agregado 0.7%.
- ✓ **Condimentos, especias y saborizantes:** todas las especias naturales y los condimentos preparados a base de mezclas de ellos y/o sus extractos y/o sus aceites esenciales, azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa y fructosa), sal, glutamato monosódico, proteínas vegetales hidrolizadas ⁵¹.

1.1.2 ADULTERACION

Una adulteración es la incorporación de uno o más ingredientes sin ser especificados en la etiqueta, así como la adición de aditivos prohibidos (dañinos para la salud del ser humano) de manera intencional, accidental o en proporciones no adecuadas, así como el de incluir en las especificaciones de la etiqueta ingredientes (Materia prima, nutrientes, aditivos, etc.) que el producto no contiene ¹⁷.

1.1.3 TIPOS DE ADULTERACIÓN

las adulteraciones se dividen principalmente en dos tipos:

1. Las adulteraciones accidentales: Son adicionadas a los productos de manera no intencional y puede o no proporcionar alguna característica no deseada.
2. Las adulteraciones intencionales: Se ha observado que la adición intencional de especies extrañas se puede efectuar en dos momentos diferentes: uno previo a la entrega que hace el productor a la industria y el otro durante la elaboración del producto. En ambos casos se cometen fraudes y se miente al consumidor, ya que ésta adulteración la usan para disminuir sus costos y aumentar sus ganancias con sustancias o ingredientes que suplantán a otros de mayor calidad vendiéndole un producto que no cumple con las especificaciones previamente acordadas y estipuladas en la norma oficial ¹⁹.

Los aditivos utilizados en productos cárnicos pueden ser considerados como adulteraciones si no están reportados en la etiqueta como son: los que dan las características de aglutinantes como cereales, almidón vegetal, harina de soya, concentrado proteico de soya, leche seca no grasa, suero seco, lactosa reducida de suero, minerales reducidos de suero, lactato de calcio y caseinato de calcio, sodio y potasio.

Estos aditivos se deben emplear bajo ciertos estándares permitidos para los diferentes productos cárnicos ⁹.

Para el caso del jamón cocido no se permiten aglutinantes, solo 2% como máximo de proteína de soya ⁵².

Para que los Estados puedan garantizar la protección de los derechos del consumidor, es necesario fijar normas mínimas de garantía de calidad e inocuidad. El Programa Conjunto de Normas Alimentarias de la FAO/OMS que funciona sobre todo por medio de la Comisión del Codex Alimentarius, fue fijado para proteger al consumidor sobre los riesgos para la salud y el fraude, para asegurar buenas practicas en el comercio de alimentos, y para facilitar la comercialización de los mismos a nivel internacional ²².

1.2 ETIQUETADO

El etiquetado permitirá a los consumidores decidir de manera informada que alimentos consumirán y de que modo su poder de compra afectará el mercado, su salud y el medio ambiente ¹⁹.

Tanto la presencia como la ausencia de información son relevantes en lo que respecta a un mal etiquetado. Las comunicaciones fraudulentas con frecuencia involucran declaraciones, símbolos o imágenes que son literalmente ciertas pero que conducen a los consumidores a hacer inferencias falsas. La interpretación de afirmaciones falsas pudiera ser afectada por factores como la cultura, conocimiento y educación, así como por las características de la etiqueta. Una etiqueta que podría ser equivocada para un grupo o cultura, podría no serlo para otra. Las etiquetas pueden ser irreales porque se ha omitido un hecho material, se usa lenguaje o símbolos confusos, y los consumidores hacen inferencias incorrectas a atributos que no se mencionan que son el tema de una afirmación, o se usa inapropiadamente una promoción. Se puede prevenir la presentación engañosa en la etiqueta alimentaria, por ejemplo requiriendo información adicional, estableciendo normas o prohibiendo representaciones que se consideren inherentemente falsas ¹⁹.

En materia de comercio de alimentos, hay un acuerdo de voluntades por el que por una parte, el oferente, entrega un producto y el consumidor paga por dicho bien. Como en todo contrato se derivan derechos y obligaciones y así el consumidor es titular de un derecho subjetivo que le permite exigir de la oferente información clara, relevante, veraz y suficiente sobre el producto ²².

Características del etiquetado:

- ✓ Debe estar redactado en el idioma donde se consume
- ✓ Denominación y marca del alimento
- ✓ Empresa elaboradora, fraccionadora, distribuidora y/o expendedora, y razón social de la misma.
- ✓ Ingredientes según su peso, de mayor a menor, excepto que se trate de un alimento con un único ingrediente.
- ✓ Contenido neto.
- ✓ Fecha de vencimiento. No es obligatoria para algunos alimentos tales como vinos, vinagres, azúcar, frutas y hortalizas frescas, productos de panadería y pastelería que se consuman dentro de las 24 horas de elaborados, caramelos y pastillas, entre otros.
- ✓ Modo apropiado de conservación. Uso y precauciones de su manipulación. En los envases cuyos contenidos puedan experimentar alteraciones después de abiertos, debe indicarse que el producto es de consumo inmediato, y cuales son las condiciones en que el producto debe ser conservado una vez abierto.
- ✓ Número del certificado de autorización del producto otorgado por autoridad sanitaria competente y número de inscripción de la empresa elaboradora.
- ✓ Identificación del lote.
- ✓ País de origen.
- ✓ Opcionalmente pueden incorporarse: designaciones de calidad e información nutricional aprobada ^{13, 31, 51}.

Así como también se deben especificar de manera decreciente todos los ingredientes que contiene el producto, de no ser así serán sancionados por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial y de Salud en los términos que señala la Ley Federal de Protección al Consumidor⁵¹.

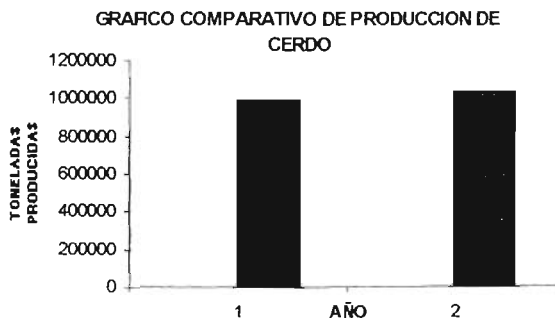
1.3 ANTECEDENTES DE LAS SECUENCIAS DE INTERES

1.3.1 CERDO

Debido a la necesidad del ser humano por alimentarse es que desde la antigüedad consume plantas y animales, de éstos últimos, lo que se consume y de mayor importancia es la carne. La carne es la “parte muscular comestible de los animales de abasto, sacrificados y faenados en condiciones higiénicas. Se incluye en este concepto las porciones de grasas, hueso, cartilago, piel, tendones, nervios y vasos linfáticos y sanguíneos que normalmente acompañan al tejido muscular y que no se separan de éste en los procesos de manipulación, preparación y transformación de la carne”³¹.

Uno de los animales de mayor importancia para la obtención de carne en México es el cerdo. El cerdo (*Sus scrofa*) es un animal vertebrado de gran importancia para la alimentación humana. Procedente de especies salvajes de Asia y Europa, se ha domesticado desde finales del periodo neolítico. Su piel es muy gruesa con una notable capa de grasa, y está cubierta por unos pelos llamados “cerdas” de donde proviene su nombre común ⁶⁰.

La producción de la carne de cerdo es de suma importancia para el año 2002 se produjeron 1035000 toneladas de carne de cerdo, obteniendo con esto un crecimiento del 4.3% con respecto al año 2001,⁶⁰ así como se muestra en el siguiente gráfico donde 1 es la barra correspondiente al año 2001 y el 2 al 2002.



El mercado mexicano de carne de cerdo está compuesto por el consumo de la industria de embutidos (20 %), el consumo realizado fuera de casa (20 %) y el mercado detallista para consumo en casa, el 60 % compuesto en su mayor parte por ventas en carnicerías, mercado y tianguis (55 %) y solo el restante 5 % se vende a través de supermercados ⁶⁰.

Debido a la importancia de la carne de cerdo, la industria porcina se encarga de preparar las diversas partes del animal para consumo alimenticio, se debe considerar que según la pieza que se consuma será el aporte de proteínas y grasa como se muestra en la Tabla 1, y la industria cárnica en su mayoría se encarga de transformarla para conservarla durante tiempos mas prolongados en condiciones óptimas para el consumo, existiendo con esto una gran diversidad de productos derivados de este animal, como los embutidos y dentro de estos el más importante es el jamón que puede ser cocido o curado ¹⁸.

Tabla 1. Componentes de distintas partes del cerdo

| Parte del animal | Tejido óseo | H ₂ O | Grasa | Proteínas % | |
|------------------|-------------|------------------|-------|-------------|------------|
| | % | % | % | Totales | Componente |
| Cuello | 38.5 | 72.6 | 7.1 | 16.3 | — |
| Paleta | 23.7 | 71.5 | 9.2 | 16.4 | 11.9 |
| Lomo | 9.2 | 66.6 | 12.8 | 15.9 | 10.5 |
| Pecho | 16.6 | 64.7 | 16.3 | 14.0 | 9 |
| Pierna | 12.9 | 72.0 | 7.0 | 16.7 | 12.5 |

Fuente: Carbonell, Guadarrama Nancy; 1995. "Implementación de una técnica para la evaluación de la adulteración de jamón cocido con proteína de origen no cárnico". Tesis: Cuautlán Izcalli México, p.10.

Como muchos alimentos, el jamón surgió hace varios siglos por la necesidad de conservar la carne (a través de un proceso conocido como curado). El curado consiste, esencialmente, en agregar una mezcla de sales (cloruros, nitratos y nitritos) que, además de prolongar su conservación, le dan un sabor característico. Actualmente el mercado ofrece diversos tipos de jamones como el jamón cocido ¹³.

1.3.2 Definición del jamón cocido: Es el producto alimenticio preparado con la carne de las piernas traseras de cerdos sanos, sacrificados bajo inspección sanitaria. Esta carne es sometida a curación y cocimiento. El producto final debe ser empacado y refrigerado ⁹.

Las piernas deben ser cortadas de forma especial, se debe excluir la carne maltratada, además de quitar todos los huesos, y dejar la carne prácticamente libre de cartilagos, tendones, ligamentos sueltos y tejido conjuntivo ^{9,31}.

1.3.2.1 Clasificación: Los jamones presentan diferentes tipos de clasificaciones dentro de las cuales se encuentran:

✓ De acuerdo a la temperatura registrada durante el tiempo de cocción

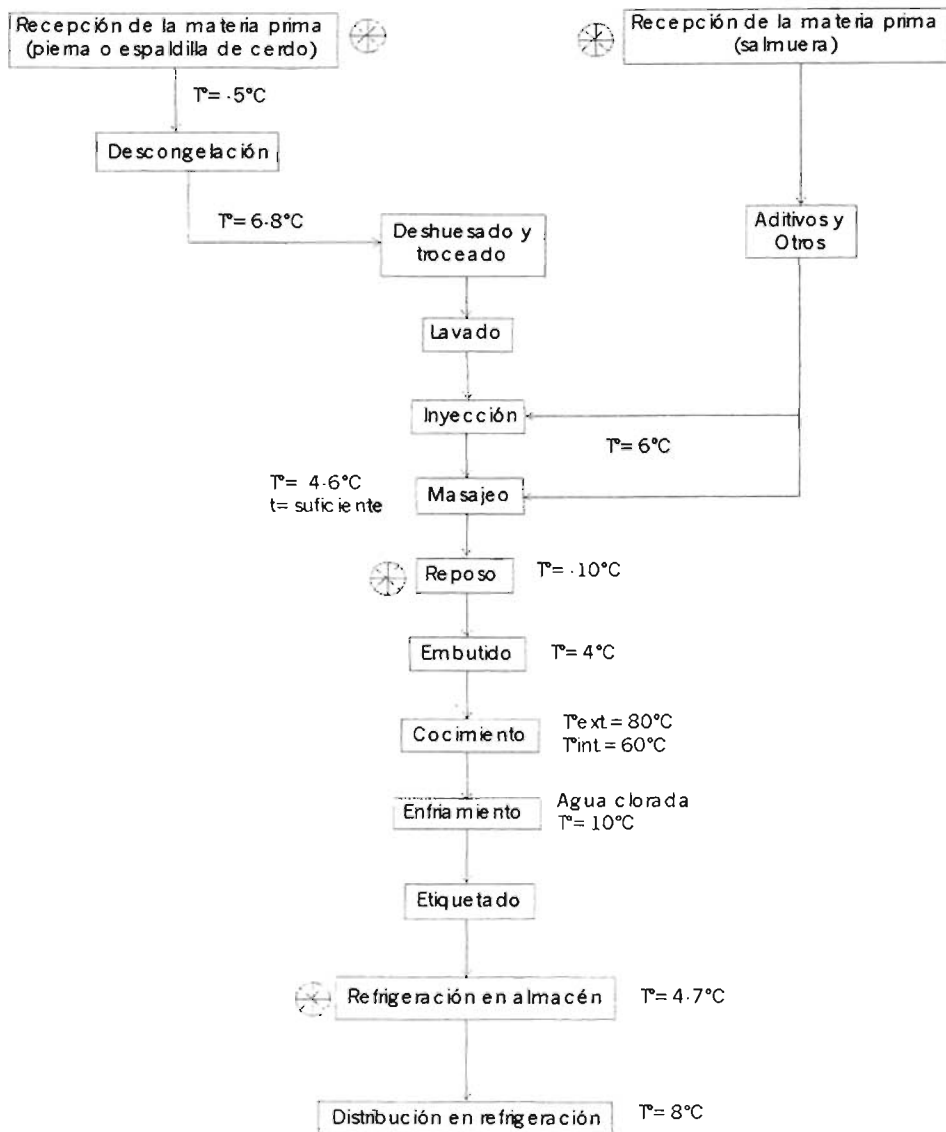
✓ De acuerdo a la cantidad de sustancias añadidas que se retienen después del proceso*


*Las sustancias añadidas se refieren a agua y sal presentes en exceso en el producto curado de la cantidad normal presentes en productos no curados

✓ De acuerdo a la ausencia o presencia de huesos dentro del jamón como son: jamones con hueso, jamones semi-libres de hueso (aquellos que generalmente solo presentan el fémur) como el jamón serrano; y jamones libres de hueso (hechos en contenedores de forma plana y embutidos) como el jamón tradicional cocido ¹³.

En el siguiente diagrama se muestra de manera esquemática el proceso de elaboración de jamón cocido.

1.3.2.2 DIAGRAMA DE PROCESO DE LA FABRICACION DE JAMON COCIDO



 Puntos para muestreo de análisis e inspección

Fuente: 14,40.

1.3.2.3 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE JAMON

Recepción de la materia prima: El departamento de recepción de la carne, debe juzgar la calidad de la carne, confirmar su peso y ratificar su precio. El pH de la carne deberá oscilar entre 5.8 y 6.2 y se deben tener controlados los siguientes aspectos.

- Obtener la materia prima en buenas condiciones higiénicas.
- Cuando se traslade una pierna fresca debe cuidarse que ésta sea manejada bajo condiciones de refrigeración (-4 a 2°C).
- En el almacenamiento vigilar rigurosamente las temperaturas (-4 a 2°C) y la humedad relativa (90 a 92%).
- Mantener bajo control la variación del pH de la carne.
- Evitar el uso de carne calificada como “PSE” (pálida, suave y exudativa) ya que al utilizar estas se disminuyen los rendimientos y la calidad del producto.
- Evitar el uso de carne calificada como “DFD” (Obscura, firme y seca) ya que si se utiliza esta tipo de carne disminuye el rendimiento, modifica la apariencia y la calidad.
- Evitar las sobrecargas microbiológicas en las superficies en contacto con las piezas de carne.

Hay que recordar que mediante la elección de materia prima con calidad se sientan las bases para la obtención de un producto de excelente calidad al final ¹⁵.

Deshuese o despiece: Para obtener productos con ligue aceptable, es importante cortar las piezas de tal modo que liberen grasa suelta y tejido conjuntivo. Las fundas de tejido conjuntivo deben rasgarse para facilitar la salida de proteína. Además deben eliminarse los ganglios linfáticos, cartílagos, tendones gruesos y grasa situada entre las piezas de carne.

El tamaño y tipo de corte cármico estará en función del producto al cual se le dará destino y por lo tanto diferirá de la marca comercial de la cual formara parte. Se recomiendan temperaturas de cámara de entre -4 a -2°C ^{15,40}.

Lavado: Se lava la superficie de la carne perfectamente y se sumerge instantáneamente en una solución de germicida grado alimenticio*.

* Germicida grado alimenticio.- generalmente se utiliza una solución de yodoformo desde un 0.005 hasta 0.1%

Curado e inyección: El propósito de ésta operación es suministrar la salmuera hacia el músculo; la composición de la salmuera dependerá del producto que se trate siempre siguiendo con las siguientes normas:

- No aplicar de una vez la cantidad a inyectar.
- Regular adecuadamente la presión en el cabezal de inyección.
- Verificar la limpieza y sanitizado de los dispositivos para la inyección.
- Verificar y evitar la corrosión en la aguja para la inyección.
- Efectuar pesadas a la entrada y salida de las piezas de carne para controlar la cantidad de salmuera incorporada a cada una de ellas.
- En cuanto a los coadyuvantes para el enrojecimiento se recomienda incluir en la salmuera solo productos de ascorbato recién preparados.
- Haber superado el rigor mortis.
- Controlar la temperatura de la salmuera para no aumentar la rigidez y disminuir la difusión de sales a temperaturas bajas.

Después de la inyección se provoca un rasgado sobre la superficie de los músculos inyectados para aumentar el área superficial expuesta a la extracción de proteínas para disminuir el tiempo necesario para la distribución homogénea de la salmuera en el músculo. De este modo se favorece la cantidad de proteína extraída a partir de un músculo crudo^{11, 40}.

Molido: Para hacer jamón económico en ésta parte del proceso es donde se hace la adición de soya o almidones según sea el caso. Esta operación no es precisamente un molido sino mas bien es un mezclado pero si la carne lo requiere, ya sea que se encuentre en trozos muy grandes o que esté un poco golpeada puede llevarse a cabo un molido que enmascarará los defectos¹³.

Masajeo: Durante esta operación se persigue transferir la energía mecánica del equipo a la carne para provocar un rompimiento celular y de tejidos que conforman el músculo para así provocar la extracción, concentración y distribución de la proteína miofibrilar y desarrollar un exudado rico en proteínas^{13, 15}.

Reposo en cámaras de refrigeración: Para asegurar la completa difusión de la salmuera es importante dar un determinado tiempo de reposo, así que después del tratamiento deberá darse un tiempo de maduración desde 4 hrs. hasta 30 días a bajas temperaturas de entre -4 a -2° C (en el jamón serrano el reposo puede ser de incluso meses) antes de aplicar el siguiente tratamiento mecánico¹³.

Embutido: Consiste en el llenado de la funda con la pasta cármica; el embutido deberá tomar en cuenta la aplicación de vacío, esto debido al efecto de reacción del oxígeno del aire durante el curado y su influencia en la coloración de la carne, las piezas embutidas son posteriormente moldeadas y prensadas en el interior del molde para después ser mandadas a la sección de cocimiento^{13,40}.

Cocimiento: Según la forma peso y tamaño se seleccionan las temperaturas aplicadas durante este tratamiento, deberá considerarse además la impermeabilidad de la funda para la selección de temperaturas, la destrucción de aquellos microorganismos patógenos, el tipo de calor ya sea húmedo seco, etc.

Se debe cocer de acuerdo a la temperatura interna 66 a 68°C, cada grado de aumento en la temperatura mejora la capacidad de conservación de los alimentos y la estabilidad de color pero la temperatura interna no se deberá de elevar a más de 75°C para cualquier caso ya que se verían afectados los resultados finales, se deberá de cocer durante 6 hrs, este tiempo es estimado para 4 Kg de producto ya que el tiempo depende del tamaño de la pieza¹³.

Enfriamiento: Se reduce la temperatura repentinamente con el fin de provocar un choque térmico a nivel microbiológico y obtener el producto en el mínimo tiempo necesario de proceso, entre el cocimiento, enfriamiento y desmolde para obtener un producto cuya temperatura interna sea de 8°C¹³.

Empaquetado: En este paso se define la presentación del producto, los lotes de jamón deberán clasificarse según la fecha de la elaboración, se etiquetan según el producto o marca comercial y tipo de jamón; con todo esto las piezas se trasladan al almacén de distribución y de aquí a los principales puntos de consumo^{11,15}.

Almacenamiento de producto terminado: Se pesan y se cuentan las piezas trasladándolas al almacén de producto terminado que debe tener una temperatura de 2° -- 3° C máximo sin humedad condensada¹³.

En la Tabla 2, se muestra la formulación de un jamón cocido enlistando sus ingredientes y las proporciones en las cuales se encuentran y, en la Tabla 3. Se muestra la composición nutricional que aporta dicha formulación.

Formulación

Una formulación típica de jamón cocido se muestra a continuación:

Tabla 2. Formulación del jamón.

| INGREDIENTE | % (g/100g) |
|---------------------|-------------|
| Carne | 50 |
| Agua | 18.57 |
| Sal | 1.08 |
| Fosfatos | 0.7 |
| Sal cura | 0.26 |
| Eritorbatos | 0.10 |
| Dextrosa | 0.271 |
| Carragenina | 0.018 |
| Nitratos y nitritos | 125-250 ppm |

Fuente : Dieter B, Hans-Grosch, 1985. Química de los alimentos. Editorial Acirbia, Zaragoza, España, p 467.

Obteniendo con esta:

Tabla 3. Composición del jamón.

| | AGUA | PROTEINA | GRASA |
|--------------|------|----------|-------|
| JAMON COCIDO | 74% | 18% | 15% |

Fuente : Dieter B, Hans-Grosch, 1985. Química de los alimentos. Editorial Acirbia, Zaragoza, España, p 470.

1.3.3 ADITIVO

Es importante saber que es un aditivo, y como este se puede convertir en una adulteración, por lo cual a continuación se muestran los aditivos permitidos y utilizados para la elaboración de jamón cocido.

Un aditivo es toda sustancia que, sin constituir por sí misma un alimento ni poseer valor nutritivo, se agrega intencionadamente a los alimentos y bebidas en cantidades mínimas con objeto de modificar sus caracteres organolépticos o facilitar o mejorar su proceso de elaboración y/o conservación ²⁴.

De acuerdo con el *Codex Alimentarius* “los aditivos son los conservadores, colorantes, exaltadores de sabor, antioxidantes, emulsionantes, hormonas, antibióticos, edulcorantes, coadyuvantes técnicos, solventes, etc. y en general todo tipo de sustancias que no se consumen directamente como alimento” ²⁴.

En muchas ocasiones los aditivos son utilizados con una finalidad económica: un producto que resulte más atractivo para el consumidor y que se mantenga durante más tiempo, siempre será económicamente más rentable para la empresa que lo comercializa. Pero a menudo esos aditivos no son inócuos, incluso pueden resultar peligrosos si no se aplican en las concentraciones adecuadas. Sin embargo, ésta es una información que las empresas se cuidan mucho de suministrar a los consumidores y las autoridades sanitarias, que son las que otorgan las autorizaciones para el uso de aditivos, tampoco ponen al consumidor sobre aviso ya que si no son reportados en la etiqueta se consideran como productos adulterados ¹².

1.3.3.1 TIPOS DE ADITIVOS

Los aditivos mas comúnmente utilizados para el jamón son:

OXIDANTES

Nitrito de sodio.

Son sales de ácido nitroso, que actúan como agente oxidante y reductor, son sensibles al calor y muy reactivo con la materia orgánica, es un polvo blanco amarillento granular.

Función: Forma y estabiliza el color rosa característico al formar nitrosomioglobina, desarrolla características organolépticas, inhibe el crecimiento de microorganismos como el *Clostridium botulinum*, contribuyen al sabor, contribuyen al aroma particular de los embutidos ².

Dosis permitida: 156mg/kg de producto. El nitrito de sodio puede ser muy venenoso ya que transforma la hemoglobina en metahemoglobina ⁵¹.

Los nitritos y nitratos pueden destruir los glóbulos rojos. Forman nitrosaminas en los alimentos y en el organismo, por lo que son cancerígenos.

ANTIOXIDANTES

La oxidación de las grasas es la forma de deterioro de los alimentos más importante después de las alteraciones producidas por microorganismos. Los antioxidantes evitan que los alimentos se oxiden y se pongan rancios, por lo que su utilización retrasa la oxidación de los alimentos pero no la evita de una forma definitiva. Las vitaminas C y E y ciertas plantas como el romero son antioxidantes naturales, aunque la industria alimentaria suele emplear otros sintéticos de más bajo costo ^{24,51}.

Acido ascórbico

El ácido ascórbico o vitamina C por su actividad vitamínica, es un polvo blanco que se encuentra en productos de origen vegetal principalmente en cítricos.

Función: Intensifica el color cuando se encuentra como ascorbato. El color es más estable a la luz ²⁴.

Dosis permitida: 500mg/kg de producto.

ESTABILIZADORES

Fosfatos

Son cada una de las sales del ácido fosfórico, se usa como amortiguador de pH, secuestrador, antiaglomerante, y nutrimento para levadura ²⁴.

Función: Emulsifican la grasa. Disminuyen la pérdida de la proteína durante la cocción. Reduce el enrojecimiento. Incrementa la capacidad de retención de agua de las proteínas, mejorando así la textura. Protege contra quemaduras por congelación y retrasa la rancidez oxidativa ²⁴.

Dosis permitida: 5g/kg de producto.

CONDIMENTOS, ESPECIAS Y SABORIZANTES

Sal

Compuesto químico cristalino que resulta de la desnaturalización de un ácido y una base y que en disolución se comporta como electrolito. Por antonomasia también se da este nombre al cloruro de sodio ²⁴.

Función: Prolonga el poder de conservación. Mejora el sabor. Aumenta el poder de fijación del agua. Favorece la penetración de otras sustancias curantes. Favorece la emulsificación. Inhibe el crecimiento de algunos microorganismos ¹².

Dosis permitida: 1.0-3.0 %.

Glutamato monosódico

Es una sustancia cristalina procedente de las proteínas vegetales. Se extrae de las semillas de soya, del maíz, del trigo y de la remolacha de azúcar por hidrólisis ácida o alcalina.

Función: Mejora el sabor, es decir es un potenciador del sabor.

Dosis permitida: 1.5g/kg de producto.

1.3.4 SOYA

La soya (soja, *Glycine max*) es nativa del norte y centro de China, aproximadamente en el siglo XI AC.

En América fue introducida por Estados Unidos en 1765, sin embargo su gran expansión se inició en 1840. En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión se produjo a principios del siglo XX.

Se siembra entre los meses de Noviembre, Diciembre y Enero. De ella se obtienen aceites y harinas panificables que son empleadas en productos alimenticios dietéticos. Es dicotiledónea y posee hojas alternas ²².

La soya es una leguminosa cuyos granos y semillas se consumen en extremo oriente desde hace unos dos milenios. El 95% de su producción se utiliza para la fabricación de aceites y tortas destinadas para la alimentación animal. Desde 1950 se dedica una creciente proporción de soya para producir harina desengrasada destinada a la alimentación humana y sus derivados (concentrados, aislados).

Aunque México no es un productor de soya a gran escala, se puede encontrar en estados como Chiapas, Campeche, Chihuahua, Michoacán y Nuevo León, entre otros. Aunque la mayoría de la soya que se procesa en México proviene de Estados Unidos.

La soya tiene un costo en el mercado de \$20 por kilo, mientras que el aceite, la harina y otros productos de soya tienen un precio de \$9.50 y \$30, respectivamente ²².

Con una inversión de alrededor de un millón de dólares, es posible abrir una planta procesadora de soya, en la para obtener aceite, texturizados y pastas a base de soya. Aunque también es factible producir atoles, chocolates y pastas enriquecidos con la proteína de la soya, al igual que golosinas como chamoy y polvos agrídulces, elaborados a base de pulpa de frutas y harina de soya. Actualmente, la producción mundial de harina de soya desengrasada sobrepasa los 1.5 millones de toneladas por año ⁶⁰.

1.3.4.1 LA SOYA EN LOS CARNICOS

La harina de soya es de aplicación directa al consumo humano como integrante de otros productos alimenticios o como materia prima para la obtención de proteínas concentradas o aisladas. El consumo de aceite se relaciona directamente con la dieta humana, en la que las grasas son un componente esencial por su valor energético-dinámico; el de harinas con la formulación de alimentos balanceados para la producción de carnes rojas y blancas, que sigue siendo la aplicación dominante y finalmente, el de la utilización del harina o de las proteínas de soya en la alimentación humana con el enriquecimiento de otros alimentos.

El principal componente de la soya es la proteína así como se muestra en la Tabla 4, por este alto contenido y sus propiedades funcionales los aislados proteicos de soya son adicionados para reemplazar porciones de la proteína de la carne soluble en sal en sistemas de carne procesadas, por absorber y retener agua, formar y estabilizar emulsiones, absorber grasas, formar geles, proporcionar adhesión, cohesión y elasticidad, mantener la integridad estructural de los productos cárnicos después de la cocción; esta adición puede aumentar el perfil nutricional y la integridad estructural y los costos de las materias primas e ingredientes, manteniendo la calidad del producto, aunque tiene un inconveniente que a concentraciones mayores al 10% le transmite al producto un sabor desagradable. Por ello se recomienda el uso de aislados proteicos de soya para embutidos en una concentración máxima del 2% y se permite el 3.5% de concentrados de soya⁵².

Tabla 4. Algunos componentes importantes de la soya

| Componente | Peso Seco |
|-------------------------|-----------|
| Aceite (%) | 14-25 |
| Proteína (N x 6.25) (%) | 34-49 |
| Metionina (g/16g N) | 1.0-1.9 |
| Cisteina (g/16g N) | 1.6-3.5 |

Fuente: compilado por Rachis, J.J.1979. Soy Protein Foods.

1.4 MÉTODOS PARA IDENTIFICACIÓN Y AUTENTIFICACIÓN

Para prevenir el fraude y el mal etiquetado de los productos alimenticios es necesario poder identificar y cuantificar las especies empleadas en la elaboración de los alimentos procesados. Pero hasta ahora, no había sido posible cuantificar de manera fiable estos constituyentes, debido a su alta susceptibilidad a las condiciones del proceso al que son sometidos. Las nuevas técnicas genéticas, en particular las que se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son muy importantes para desarrollar métodos rutinarios y kits rápidos de análisis²⁶.

Debido a la demanda de los productos cárnicos, en la actualidad algunos productores han recurrido a la extensión proteica de los embutidos mediante la adición de proteínas de origen no cárnico (soya) disminuyendo con esto el costo de producción; la adición de estos componentes son, en muchas ocasiones, no permitidos por las normas de calidad, ya que se asegura la

obtención de un producto con mayor volumen pero con menor cantidad de carne empleada. Es por ello que la autenticación de la carne es importante por mas de una razón: para identificar la presencia de especies de alto costo. Para contrarrestar ésta problemática varios métodos de detección están siendo usados tal como la técnica de PCR y sus técnicas complementarias como secuenciación, RFLP, RAPD, SSCP. Estas técnicas son aplicadas dependiendo del análisis que se quiera realizar ^{6, 36, 50}.

Existen otras técnicas que han intentado realizar la identificación o autenticación de las especies en productos alimenticios y entre estas se encuentran:

1.4.1 TÉCNICAS BASADAS EN PROTEÍNAS

Las proteínas han sido usadas como marcadores de especies, no solo para la identificación de especies de consumo humano, sino para propósitos taxonómicos. Los primeros trabajos sobre el desarrollo de técnicas para la identificación de especies demostraron que la separación de proteínas hidrosolubles por electroforesis de agarosa o almidón podrían ser usadas para este propósito. Posteriormente, las técnicas de electroforesis fueron mejorando con el desarrollo del enfoque isoelectrico y la alta resolución de las proteínas hidrosolubles las cuales permiten la diferenciación de especies ²⁰.

Existen distintos métodos de identificación reportados en la bibliografía: serología, electroforesis, análisis aminoácidos y métodos indirectos.

Algunos de estos métodos disponibles para la identificación de especies utilizan el punto isoelectrico de las proteínas enfocándose en geles de poliacrilamida y ensayos en geles de agar para inmunodifusión ³⁰.

Serológicos: este método depende de la alta interacción específica entre un antígeno, el cual es específico a una proteína y anticuerpo presentes en un antisuero obtenido por un antígeno de un animal experimental. Estas pruebas son específicas y sensibles, pero en reacciones entrecruzadas no se pueden diferenciar ⁴.

Electroforesis: este método se basa en el principio de que un ión cargado o grupo puede migrar hacia uno de los electrodos en presencia de un campo eléctrico. En la electroforesis las mezclas

de proteínas son separadas en sus componentes de acuerdo a la carga y peso molecular de cada tipo de moléculas presentes.

La mezcla que va a separarse es aplicada en una banda estrecha sobre una franja de papel o medio de soporte de acetato de celulosa, almidón, agarosa o SDS el cual termina en un baño en una solución amortiguadora, el medio es seleccionado para ofrecer una pequeña resistencia para la corriente y para ser inerte a las proteínas y a los tintes usados en ellas.

En procesos a altas temperaturas las proteínas comienzan a desnaturalizarse progresivamente y por lo tanto se tiene mayor dificultad para extraerse y las bandas de las proteínas son casi imperceptibles o se pierden caracterizando estructuras finas ⁹.

Las ventajas de las técnicas basadas en proteínas son:

- ✓ La rapidez del análisis de las muestras.
- ✓ El bajo costo de los reactivos.
- ✓ Son técnicas sencillas de aprender.
- ✓ Existe una amplia disponibilidad de datos para muchas especies.

Las desventajas son:

- ✗ No es posible en ocasiones analizar muestras sometidas a procesos intensos o a tratamientos térmicos.
- ✗ La conservación de las muestras debe hacerse en buenas condiciones para que los resultados puedan ser reproducibles.
- ✗ Se requiere de una gran cantidad de muestra.
- ✗ El análisis de los perfiles electroforéticos es bastante complejo.
- ✗ El contenido de proteínas y tipo son específicas del tejido que se estudie ^{44, 46}.

Debido a estas desventajas La autenticación es difícil de realizar en productos cárnicos que son sometidos a un proceso térmico con técnicas basadas en proteínas, debido a la desnaturalización de las proteínas. Esto significa un problema aunque se use grasa o carne de cerdo, res y ave para el estudio.

Por lo tanto, es necesario un método de identificación de especies rápido y tajante que sirva para distintas variedades de productos ⁴⁶.

Estos problemas se pueden resolver con métodos basados en secuencias de ácidos nucleicos de especies específicas para carnes, detectados por la hibridación del DNA o por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ⁴⁶.

1.4.2 TECNICAS BASADAS EN ACIDOS NUCLEICOS

Las ventajas de los métodos basados en ácidos nucleicos son:

- ✓ Se requiere de muy poca cantidad de muestra (50-100 mg de tejido),
- ✓ Se pueden analizar muestras conservadas en malas condiciones durante mucho tiempo,
- ✓ Es posible analizar muestras sometidas a intensos procesos, incluso procesos térmicos,
- ✓ Se pueden detectar mutaciones silentes.
- ✓ El DNA es el mismo en todos los tipos de células de un organismo,
- ✓ Permite la amplificación y análisis de fragmentos de DNA seleccionados en un tiempo relativamente corto (2 horas).
- ✓ El analista puede seleccionar las diferentes regiones de DNA para analizar índices de mutación inter o intra específico dependiendo de la variabilidad sobre el nivel de resolución requerido.
- ✓ El DNA es más estable que las proteínas, y contiene mas variabilidad genética y además no contiene intrones ^{44, 46}.

Las desventajas de los análisis basados en ácidos nucleicos son:

- ✗ El análisis es relativamente costoso.
- ✗ Es una técnica un poco más compleja ya que necesita de personal mas especializado ^{44, 46}.

1.5 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En los años setenta se desarrollaron los métodos que permitieron de manera simple y relativamente rápida la determinación de secuencias nucleotídicas de cualquier fragmento de DNA. Estos primeros intentos de secuenciar los ácidos nucleicos siguieron los pasos empleados en la secuenciación de proteínas. romper las moléculas en pequeños fragmentos, determinar su composición de bases y deducir la secuencia a partir de fragmentos solapantes. Este método

resulta más o menos sencillo para proteínas que resultan de la combinación de hasta veinte aminoácidos distintos, pero constituye un problema en el caso de los ácidos nucleicos donde la secuencia resulta de la combinación de únicamente cuatro nucleótidos diferentes⁴³.

En Abril de 1983, Kary Mullis dio a conocer la Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction, quien ganó por sus trabajos el premio Nobel de Química en 1993⁴².

La técnica del PCR es bastante simple ya que se trata de una metodología in vitro que permite la reproducción de millares de copias de un determinado fragmento de DNA presente en diferentes muestras biológicas incluso de cantidades diminutas de material genético y aún de material genético dañado, con la cual la insuficiente cantidad de DNA ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de DNA⁴².

La PCR requiere de una molécula de DNA o RNA y la secuencia que se requiere copiar y dos moléculas del primer para conseguir el proceso de copiado.

La técnica se basa en la replicación del DNA en los organismos eucariotes realizada por el DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear ésta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados que constituyen cualquier fragmento de material genético de manera que son complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar⁴².

Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª Desnaturalización del DNA doble cadena

2ª Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

3ª Extensión del primer por actuación del DNA polimerasa

Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo se tienen 4, al final del tercero 8 y así sucesivamente. Si los ciclos se producen un

número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de DNA se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de DNA de $2n$, por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica ²⁷.

Es importante recalcar que los productos obtenidos tras la tercera etapa son de dos tipos: "producto corto" y "producto largo". El producto corto tiene una longitud perfectamente definida por los extremos 5' de los primers y contiene exactamente la secuencia que se desea amplificar. Es el fragmento que se almacena de manera exponencial durante la reacción. El producto largo es el que incorpora las cadenas de DNA originales de la muestra y cuyos extremos 3' no están definidos. Sin embargo, es importante aclarar que al final del PCR, la cantidad del producto corto sintetizado es muy superior en comparación con el producto largo, por lo generalmente para posteriores estudios, a partir del producto de la PCR, se desestima ^{27,28}.

La detección del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realiza normalmente mediante corrido electroforético dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que se desee utilizar para ello se aplican diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de estudio (lámpara de luz UV), tinción de plata, fluorescencia, radioactividad, acorde al medio seleccionado de inicio.

1.5.1 COMPONENTES Y OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

Muestra de DNA

Existen una serie de reglas sencillas para que el DNA molde no sea un problema en la reacción:

- * Se debe procurar la integridad del DNA: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de lo que se requiere amplificar.
- * Origen de la muestra y proceso de extracción: la muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de iones de Mg en la disolución. Tampoco debe haber determinados factores que inhibirían la actividad de la polimerasa como el fenol o los detergentes.
- * Cantidad de la muestra: si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de DNA genómico de copia única se usan cantidades de 100-500 ng. En el caso de zonas repetidas se

puede reducir esta cantidad a 10-50 ng. El mínimo oscila entre 10-100 ng. y el máximo entre 400-500 ng²⁸.

DNA Polimerasa

Existen diferentes tipos de DNA polimerasa que llevan a cabo la replicación del DNA, siguiendo el mismo método de síntesis. Se pueden clasificar en:

- Termolábiles: T^a óptima de 37-42°C. Se desnaturalizan con el calor.
- Termoestables: T^a óptima de 74°C. Resiste durante 40-50' a 96°C.

Inicialmente se usó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* la cual posee actividad 3' → 5' exonucleasa que le proporciona la capacidad de cambiar el nucleótido que ha sido erróneamente incorporado. La importancia de ésta actividad radica en que aumenta la fidelidad de la replicación del DNA original. Sin embargo, se trata de una enzima termolábil por lo que no soporta los ciclos y temperaturas utilizadas en una PCR²⁷.

Actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq polimerasa. Es una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. La Taq polimerasa ha simplificado enormemente la técnica de la PCR, ya que ha permitido su automatización (desarrollo del termociclador)^{28,29}.

Las polimerasas termoestables, como la Taq polimerasa, carecen de actividad 3' → 5' exonucleasa, lo que las hace menos seguras a la hora de comparar las fidelidades. Por ello se deben tener las siguientes consideraciones, para que su actividad aumente.

- No usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de estos. (Normalmente el número de ciclos utilizado es de 25-30)
- La concentración de los deoxinucleótidos (dNTPs) debe ser igual para los 4 y debe ser la más baja posible para que nos permita conseguir la cantidad de DNA necesario.
- Disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa.
- La concentración de Mg²⁺ en la reacción debe oscilar entre 0,50 y 2,5 μM. Se trata de un ión necesario, pero su exceso hace que disminuya la especificidad del PCR²⁹.

Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

Son cuatro: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Como se ha señalado anteriormente se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y los 200 μM . Los dNTPs pueden captar Mg^{2+} , por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. No se debe variar ninguno de ello de manera independiente. Se aconseja que la concentración de Mg^{2+} sea de 0.5 – 1.0 μM veces superior a la concentración de dNTPs ²⁸.

Amortiguador de la reacción

Por lo general está formado por: 10 μM tris-HCl (pH=8.4 a T° ambiente), 50 μM KCl, 0.1% p/v gelatina y 1.5 μM MgCl_2 ²⁸.

Sales

Es de gran importancia la concentración de dos cationes que son añadidos en forma de sales.

Cloruro potásico (KCl). Influye en la desnaturalización del DNA.

Elevadas concentraciones del ión K^+ favorece la desnaturalización de secuencias cortas de DNA.

Bajas concentraciones de K^+ ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de DNA.

Cloruro de magnesio (MgCl_2). Aumenta la temperatura de hibridación del DNA. La concentración de este ion resulta fundamental para la optimización de la reacción.

Altas concentraciones de Mg^{2+} disminuyen la especificidad de la reacción.

Bajas concentraciones de Mg^{2+} aumentan la especificidad de la reacción ²⁸.

Temperaturas y tiempos de los ciclos

Como se ha explicado anteriormente la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realiza en tres etapas que constituyen un ciclo, que repite durante un número determinado de veces. El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de la PCR, por lo tanto modificándolos podemos optimizar la reacción ³⁸.

Las primeras reacciones se realizaban manualmente cambiando continuamente los tubos de un baño María a otro de diferente temperatura (la T^o de desnaturalización, la de hibridación y la de elongación). El proceso resultaba demasiado tedioso y era difícil alcanzar las temperaturas y los tiempos correctos, por lo que se desarrolló el termociclador que lo hace de manera automática²⁸.

En la figura 1 se muestra un termociclador marca Perkin Elmer modelo Gene Amp PCR system 2400, el cual se puede programar para realizar los cambios de temperaturas y los tiempos para la realización de un PCR.



Figura 1. Termociclador

Pasos involucrados en la Reacción en cadena de la polimerasa

1. - Desnaturalización

Se trata de una etapa crítica ya que es muy importante que el DNA molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C durante 30 segundos a 1 minuto. Si tiene alto contenido de G + C puede aumentar la temperatura.

Sin embargo hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación.

En la práctica se suele añadir un periodo de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurar que se produce a lo largo de toda la muestra de DNA. Esta etapa suele ser de 5' a 94°C²⁸.

2. - Hibridación

En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, el tamaño y la concentración.

En la práctica, la temperatura de hibridación puede oscilar entre 45°C y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde. Si el primer es menor a 20 pb, la temperatura de fusión (T_m), se calcula basándose en la siguiente fórmula:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Siendo G, C, T y A el número de cada una de las bases que forman cada uno de los oligos. La temperatura de hibridación debe ser aproximadamente 5° menor que la temperatura calculada²⁸.

3. - Elongación

En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72°C. Teóricamente ésta temperatura puede variar entre 70-72°C. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Se puede estimar un tiempo de 1 minuto para alargar 1 Kb

En la práctica es normal que al final de todos los ciclos se realice una última elongación de 5' a 72°C²⁷.

Número de ciclos

También adquiere gran relevancia a la hora de optimizar una PCR el número de ciclos que se utilizan. Este número depende de la cantidad de DNA que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados.

Es importante no realizar un número alto de ciclos ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones no específicas.

Hay que tener en cuenta que la reacción está producida por una enzima que sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto. Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria. Generalmente cuando el efecto meseta se produce, la cantidad de DNA sintetizado es suficiente para su posterior utilización^{30, 47}.

Contaminación en la PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el DNA no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y se obtenga un resultado que no es real. Se ve que una de sus mayores ventajas de la técnica, se convierte a la vez en el principal inconveniente⁴⁷.

Existen una serie de normas que ayudan a evitar las contaminaciones. En el caso de trabajar con muestras de ARN las precauciones se deben extremar al máximo:

- Lugar físico exclusivo para realizar el PCR
- Uso de instrumental exclusivo para el PCR
- Utilización de reactivos y tubos estériles
- Uso de guantes por el manipulador
- Realización de controles de blanco (se añade agua en lugar de DNA, no debe existir amplificación).

En un tubo de reacción son adicionados los primers, nucleótidos libres de todas las bases nitrogenadas (adenina, guanina, timina y citosina), la muestra de DNA y una enzima especial resistente al calor llamada Taq polimerasa que promueve la síntesis del DNA. La mezcla es calentada a 95 °C lo que provoca la separación de las dos cadenas de DNA; enseguida, la mezcla se enfría a 55 °C para realizar la hibridación de los primers, después se eleva la temperatura a 72 °C, temperatura a la que comienza a trabajar la Taq polimerasa realizando la síntesis de la hebra complementaria del DNA de interés.

La reacción es nuevamente calentada a 95 °C causando nuevamente la separación de todo el DNA en las cadenas simples. Al final del primer ciclo hay dos cadenas de la molécula original del DNA más dos copias de la región de interés. La temperatura es disminuida de nuevo a 55°C y ahora los primers se unirán a los cuatro sitios en las dos copias nuevas y también en la molécula original del DNA. La temperatura del ciclo es nuevamente elevada a 72 °C y se multiplican entonces las cuatro cadenas individualizadas. Estos ciclos son repetidos varias veces, típicamente 30 veces, en un termociclador.

Al final de 30 ciclos de amplificación existen aproximadamente un millón de copias del segmento de DNA de interés por cada molécula molde original de la muestra inicial⁴⁷. Como se puede observar en el esquema de la Figura 2.

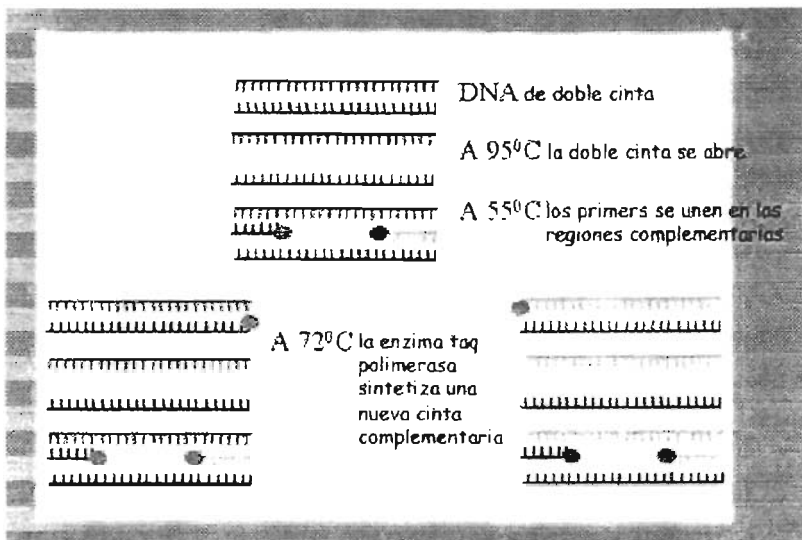


Figura 2. Secuencia de PCR²¹

1.5.2 APLICACIONES DEL PCR

Esta técnica tiene distintas aplicaciones:

- ✓ **Detección de mutaciones:** La técnica de PCR permite localizar mutaciones previamente descritas. Se emplea así en la secuenciación de DNA como un método de diagnóstico: Una vez que se ha caracterizado la relación con una enfermedad de una determinada mutación puntual (mutaciones en el gen de la galactosa 1P uridiltransferasa en la galactosemia, mutaciones en c-Ras y cáncer, etc.) o de una pequeña delección (delección de tres bases en el gen CFTR de fibrosis quística) puede desarrollarse un método de detección rutinario, la secuenciación automática puede implementarse como método de screening para la localización de nuevas mutaciones ^{4, 23}.
- ✓ **Diagnósticas:** se usa para el estudio de enfermedades infecciosas (SIDA, virus del papiloma, hepatitis C, tuberculosis, etc.), de enfermedades genéticas (enfermedad de Duchenne, fibrosis quística, etc.), oncología o en medicina legal identificando paternidad o culpabilidad en personas a través de líquidos biológicos, etc ⁴⁸.
- ✓ **Microbiológicas:** para las enfermedades infecciosas no virales, esta técnica detecta patógenos difíciles de cultivar como: *Mycobacterium tuberculosis*, en tan solo 4 horas en lugar que 6 meses que es lo que tardan las técnicas de cultivo convencional.
- ✓ **Diagnóstico prenatal/Diagnóstico preimplantación:** diagnóstico de enfermedades hereditarias o determinación del sexo del feto previamente a su implantación en procesos de fecundación in Vitro ⁴⁸.
- ✓ **Identificación de especies y control de cruza entre animales:** Las técnicas para identificar especies pueden ser muy importantes para descubrir fraudes comerciales, tales como vender carne de una especie más barata a los precios de otra mas cara, o el comercio ilegal de especies en peligro. Estos estudios pueden realizarse utilizando el DNA mitocondrial, el cual presenta secuencias altamente variables entre especies distintas, aunque sean cercanas entre sí, y bastante conservadas dentro de la misma especie ⁴.

- ✓ Proyecto Genoma Humano: El proyecto genoma humano es un proyecto Internacional cuyo objetivo final es obtener una descripción completa del genoma humano a través de la secuenciación del DNA. El genoma que se investiga es el genoma nuclear. Desde su inicio el proyecto ha sido justificado especialmente por los beneficios médicos que se espera obtener del conocimiento de la estructura de cada gen humano. Esta información proporciona una capacidad de diagnóstico en individuos con riesgo de ser portadores del gen de alguna enfermedad además de proporcionar un marco de trabajo para el desarrollo de nuevas terapias, además de nuevas estrategias para la terapia génica ³⁸.
- ✓ Identificación y autenticación de especies mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR ⁴.
- ✓ Secuenciación de DNAs fósiles: El uso del PCR ha abierto la posibilidad de aislar secuencias de DNA a partir de unas pocas copias intactas presentes en especímenes de museo y descubrimientos arqueológicos en los cuales la mayoría de las moléculas están dañadas o degradadas, para proceder posteriormente a su estudio mediante secuenciación ²³.

1.6 El DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

Las mitocondrias surgieron originalmente, durante la evolución biológica, por la invasión del citoplasma de células procariotas anaerobias mayores por otras procariotas de menor tamaño, que eran capaces de emplear el oxígeno molecular para oxidar sus elementos nutritivos. Las bacterias invasoras según la teoría Endosimbiótica de Virchow, se convirtieron de este modo en parásitos en el interior de las células huésped. Con el tiempo y la evolución, ésta relación se hizo simbiótica, beneficiosa tanto para el huésped como para el parásito. En la actualidad sabemos que durante el proceso de división celular las mitocondrias se dividen. El DNA y los ribosomas de las mitocondrias pueden ser descendientes evolutivos del DNA y de los ribosomas de las bacterias invasoras ⁵⁴.

Las mitocondrias son organelos granulares y filamentosos que se encuentran suspendidos en el citoplasma de todas las células eucariotas. Aunque su distribución dentro de la célula es generalmente uniforme, existen numerosas excepciones. Por otro lado, las mitocondrias pueden desplazarse de una parte a otra de la célula. El tamaño es también variable, pero es frecuente que la anchura sea de media micra, y de longitud, de cinco micras o más. En promedio, hay unas

2000 mitocondrias por célula, pero las células que desarrollan trabajos intensos, como las musculares, tienen un número mayor que las menos activas, como por ejemplo las epiteliales ⁵⁰.

Las mitocondrias son las fábricas de energía de la célula, contienen enzimas que en conjunto catalizan la oxidación de los elementos nutritivos de la célula por el oxígeno molecular con la consiguiente producción de anhídrido carbónico y de agua. Algunas de estas enzimas están localizadas en la matriz (es una sustancia gelatinosa que se encuentra en el compartimento interno de las mitocondrias) y otras en la membrana interna. Durante estas oxidaciones se libera mucha energía química que se emplea en la producción de trifosfato de adenosina (ATP) que es la principal molécula portadora de energía en las células. El ATP sintetizado en las mitocondrias se difunde a todas las partes de la célula en las que se emplea para efectuar el trabajo celular ⁵⁷.

En el interior de las mitocondrias, localizadas en distintas porciones, se encuentran las enzimas que intervienen en el ciclo de Krebs, así como las que participan en las cadenas de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa ²⁹.

La Mitocondria está envuelta en una membrana doble. La membrana exterior lisa está separada de la interior por una película líquida. La membrana interior, repliegada en unas estructuras llamadas crestas, rodea una matriz líquida que contiene gran cantidad de enzimas o catalizadores biológicos. Dentro de esta matriz líquida hay cantidades pequeñas de ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA), que contiene el código para la síntesis de ciertas proteínas específicas de la membrana interna ²⁹.

El genoma mitocondrial consta de un solo cromosoma, dotado de una molécula cerrada circular de dos hebras de DNA enrolladas entre sí. Su tamaño es pequeño, aproximadamente 8000 veces menor que el tamaño medio del DNA de un cromosoma nuclear. Con aproximadamente un tamaño de 16 569 pares de bases (bp). Este tamaño de 16 569 bp corresponde al primer DNA humano secuenciado (secuencia Cambridge) aunque existen otras variantes con un número de pares de bases que oscilan entre 16 559 y 16 570. Sin embargo, mientras que una célula solo posee una copia del DNA de un determinado cromosoma individual, una mitocondria puede tener varias del DNA mitocondrial y en una célula suelen haber varios cientos de mitocondrias. Ello significa que el número de copias del DNA circular mitocondrial en cada célula es de varios miles ⁵⁴.

Los genes presentes en el DNA mitocondrial se distribuyen entre sus dos cadenas. Cuenta con un total de 37 genes de los que la mayor parte han de usarse para la maquinaria de síntesis de proteínas: 22 para RNA de transferencia (que se representan simbólicamente como hojas de trébol), activadores de los aminoácidos que se han de ensamblar como proteínas y 2 para los RNA ribosomales. Por tanto, solo restan 13 genes que sirven para codificar RNA mensajeros y, por tanto, a 13 proteínas. Estas proteínas suelen ser subunidades de enzimas o de componentes proteicos mitocondriales de gran importancia, como son varias subunidades de la enzima NADH deshidrogenasa (esencial para que transcurra el proceso redox en el inicio de la cadena respiratoria); moléculas de citocromo b, componente primordial de la parte media de esa cadena; diversas subunidades de citocromo oxidasa (porción final de la cadena respiratoria) y dos subunidades de la enzima ATPasa, responsable de la obtención de la energía metabólica ATP ⁵⁴.

El DNA mitocondrial es muy parecido al de los cromosomas bacterianos, ésta formado por dos cadenas complementarias, con 16 569 pares de bases, pero con un peso molecular diferente: la cadena pesada H (peso molecular, 5.168.726 daltons) contiene muchas más G que la cadena ligera L (peso molecular, 5.060.609 daltons). La mayor parte de la cadena H constituye el molde para la transcripción de la mayor parte de los genes, mientras que la cadena L es la cadena codificadora ⁵⁴.

La zona del DNA circular conocida como D-loop o lazo D, aloja el origen de replicación de la cadena H, el origen de transcripción de la cadena H, y el origen de transcripción de la cadena L, además de una secuencia codificadora de RNA 7S ⁵⁴.

En la siguiente figura se muestra en la parte interna la cadena pesada H y en la parte externa la cadena ligera L. La zona del D-loop es la zona control. Los orígenes de la transcripción para la cadena pesada está señalado por (OH) y para la ligera (OL). El genoma mitocondrial contiene 37 genes de los cuales 13 genes codifican para RNAs mensajeros, y por lo tanto para 13 proteínas, 22 genes que codifican 22 tRNAs (RNAs de transferencia y 2 genes que codifican para dos rRNAs mitocondriales (RNAs ribosómicos).

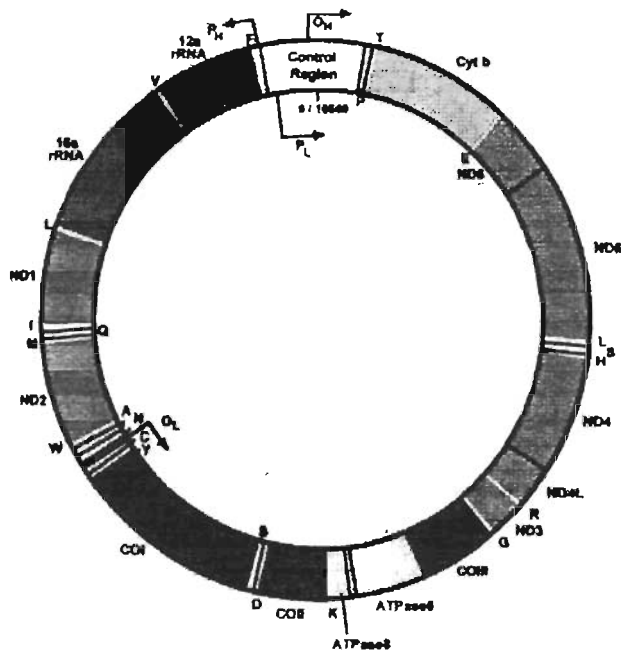


Figura 3. Estructura del mtDNA humano ²³.

1.6.1 SELECCIÓN DE SECUENCIAS DE mtDNA

Para la identificación de especies se han utilizado secuencias del gen que codifica para el citocromo b en el mtDNA, éstas técnicas se han empleado en identificación de especies marinas^{35,39,45}. El uso del mtDNA para identificación de especies por PCR proporciona las siguientes ventajas:

Primero, los genes en el mtDNA están presentes en cientos de copias por célula. Este hecho favorece la posibilidad de amplificar fragmentos de DNA en cantidades apropiadas.

Segundo, la amplia información de la organización genética del mtDNA animal, así como también la disponibilidad de secuencias descritas para muchas especies, hace posible un fácil diseño de primers específicos para la amplificación.

Tercero, la amplia variabilidad del mtDNA permite una precisa identificación de diferentes especies presentes en mezclas. Finalmente, la variabilidad intraespecífica del mtDNA permite la

posibilidad de la apropiada discriminación cuando se utilizan variedades de una misma especie en alguna producción específica ⁴⁶.

El DNA mitocondrial ha sido mayormente usado como molécula patrón para la identificación de especies. La razón de selección de los genes mitocondriales para llevar a cabo este tipo de estudios, es el carácter haploide de la molécula ³⁹.

Un factor importante que hay que tomar en cuenta, es conocer la disponibilidad de secuencias del mtDNA de la especie de interés, que permita seleccionar las zonas de amplificación y el diseño de los primers. Es posible utilizar secuencias génicas de especies conocidas, para localizar regiones conservadas para su amplificación utilizando primers denominados universales, que son aquellos que permiten la amplificación de las mismas zonas en una gran cantidad de especies ^{34, 39}.

Para seleccionar la región del genoma mitocondrial que se va a amplificar se debe considerar lo siguiente:

- ✓ Debe acumular mutaciones con suficiente rapidez para que organismos estrechamente relacionados tengan diferentes secuencias nucleotídicas, pero con la suficiente longitud para que la variación intra específica no sea importante.
- ✓ El tamaño del segmento de DNA ha de ser lo bastante largo para detectar diferencias en la secuencia entre especies próximas pero suficientemente corto para poder secuenciarla en un gel estándar de secuenciación.
- ✓ Debera elegirse un gen que codifique una proteína. De este modo los errores de amplificación y/o secuenciación pueden detectarse traduciendo la secuencia aminoacídica.
- ✓ La secuencia del gen seleccionado en las bases de datos correspondientes a otros organismos es de gran interés, ya que permite comparar dichas secuencias con las obtenidas en nuestro estudio ⁵.

La mayor disponibilidad de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos ha permitido el conocimiento de genes y genomas mitocondriales de diferentes especies de importancia alimentaria que están disponibles en diferentes bases de datos (www.mitomap.org) que pueden ser consultados y analizados con la ayuda de programas bioinformáticos (blast, fasta 33), lo que al mismo tiempo permite de forma más precisa el diseño de primers ⁴⁹.

Para realizar un análisis de autenticación de determinada especie, se verifica la disponibilidad de la secuencia del mtDNA, así como los trabajos similares de investigación anteriormente realizados. De ésta forma se podrán elegir o diseñar los primers específicos o universales que permitan a su vez la elaboración del programa de amplificación a utilizar en la PCR

1.7 DISEÑO Y SELECCIÓN DE PRIMERS

Los Primers (oligonucleótidos, oligos, cebadores) son dos cadenas cortas de DNA. Son complementarios a cada cadena del DNA diana (patrón) y permite seleccionar la zona específica de amplificación. En el extremo 3' de cada primer la DNA polimerasa iniciará la reacción de replicación del DNA. Los primers no sólo se utilizan para amplificar o replicar una región específica de DNA, sino para realizar secuenciación de fragmentos desconocidos de DNA ²¹.

Para que el cebador sea eficiente, es conveniente evitar que tenga tramos auto-complementarios extensos que no permitan la formación de la estructura secundaria.

Los primers que se usan para el PCR deben contener por lo menos 16 nucleótidos y preferentemente entre 20-30 nucleótidos de longitud.

Estos primers son demasiado cortos para formar híbridos estables a la temperatura que se usa para la polimerización (normalmente 72°C), la Taq polimerasa empieza a trabajar, aunque perezosamente a ésta temperatura y los primers se limitan a trabajar a temperaturas más bajas (37-55°C) ²⁹.

Normalmente, se usan primers a una concentración de 1 µM para el PCR. Esta concentración es suficiente para por lo menos 30 ciclos de amplificación. La presencia de concentraciones más altas de primers puede causar síntesis de secuencias indeseables. Recíprocamente, el PCR es sumamente ineficaz cuando la concentración de primers está limitando. Si el rendimiento de producto amplificado es pobre o si la contaminación por sucesiones no deseadas es inaceptablemente alta, entonces se determina las cantidades mínimas de los dos primers exigidas para generar la cantidad deseada de producto amplificado ²⁸.

Condiciones para la selección de los primers:

- ⊗ Deben ser complementarios a la doble cadena del DNA de interés en la región seleccionada.
- ⊗ Deben contener de 20 a 30 nucleótidos.
- ⊗ No deben aparearse entre sí.
- ⊗ Se debe tratar de mantener una proporción similar entre guanina-citosina y adenina-timina.
- ⊗ Se debe tratar que el extremo 5' termine en guanina o citosina ya que estos son más estables.
- ⊗ Se debe tratar que el extremo 3' no tenga polimorfismo y termine en guanina o citosina.
- ⊗ Tratar que sus temperaturas de apareamiento sean similares.
- ⊗ Tratar que su temperatura de anillado o apareamiento annealing este por encima de los 45 °C, para obtener mejores resultados.
- ⊗ Se deben evitar los que tienen estructura secundaria o que puedan hibridar para formar dímeros.
- ⊗ Si el primer es menor a 20 pb, la temperatura de fusión (T_m), se calcula basándose en la fórmula anteriormente mencionada²⁸.

1.8 EXTRACCIÓN DE DNA

La técnica para realizar la extracción es una adaptación al método descrito por Sambrook J. El cual se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasas con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y la precipitación del DNA con etanol²⁷.

Para la extracción de DNA de tejido animal, primero se debe realizar la ruptura del tejido para obtener las células, posteriormente se somete a la acción de detergentes que disuelvan los lípidos y enzimas proteolíticas que cortan las proteínas^{27,28}.

Luego de incubar la mezcla, se produce la ruptura de la estructura celular liberando todo su contenido a la solución. La mezcla se limpia mediante sucesivos lavados con solventes orgánicos (fenol, cloroformo), que coagulan proteínas y extraen los lípidos, y finalmente el DNA se separa por precipitación con alcohol en medio salino^{27,43}.

El DNA es sumamente susceptible a daño por unas enzimas llamadas las DNAsas, las cuales aparentan estar donde quiera: las manos, el equipo, las soluciones, etc. Es por ello que el área de trabajo donde se maneja este material, así como la persona que lo va a manejar debe tener una limpieza apropiada usar bata y guantes y al regresar al área de trabajo cambiarse los guantes, todo debe de ser estéril y preferiblemente desechable ²⁸.

1.9 METODOS COMPLEMENTARIOS PARA EL PCR

1.9.1 ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico como consecuencia de su relación carga / masa. Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. La naturaleza del enlace fosfodiéster de las cadenas polinucleotídicas condiciona la carga de un ácido nucleico, que es aproximadamente igual al número de grupos fosfato ⁵⁷.

La agarosa es un polímero derivado de un polisacárido neutro, que gracias a su poder de gelificación y propiedades fisico-químicas, lo han convertido en el soporte más común para electroforesis en el área de la Biología Molecular.

La electroforesis en gel de agarosa se realiza en cubetas horizontales y requieren de dos elementos indispensables: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio amortiguador que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. La fase estacionaria o soporte, es un polímero de naturaleza gelatinosa (agarosa) que da un tamaño de poro homogéneo que se haya sumergido y embebido en la fase móvil ²⁰.

Es necesario que todos los componentes de la mezcla a separar se encuentren cargados de igual forma, de manera que al hacer el depósito de la muestra sobre el soporte en uno de los polos, se dirijan todas hacia el polo contrario, separándose unos de otros en función de la distinta velocidad de migración, el desplazamiento de los componentes depende de: La carga de la

sustancia, el voltaje creado y el coeficiente de fricción entre el soporte y la sustancia depositado en el mismo ⁵.

Como la tinción con bromuro de etidio, es una sonda fluorescente tras iluminación con luz UV, es un medio generalizado de detección de fragmentos de DNA, ya que la sonda se intercala entre la doble hélice del ADN y emite luz. Es por ello que se usa como marcador del DNA para ver presencia y concentración. Se debe tener manejar con precaución ya que es mutagénico ²⁵.

1.9.2 RFLP

El polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), es un método que fue descrito en 1976 por Kan, este análisis de RFLP de los productos de PCR constituye una alternativa más sencilla para la identificación de especies ^{50,58,59}. Este puede utilizarse para determinar la herencia de determinados genes. Las mutaciones en los centros de restricción producen cambios en el tamaño de los fragmentos y, por lo tanto, en la posición de las bandas en el autorradiograma. La existencia de diversidad genética en una población se denomina polimorfismo. El método usa la secuencia de DNA amplificada por PCR, la cual es tratada posteriormente con enzimas de restricción las cuales reconocen una secuencia muy corta dentro del fragmento amplificado. Normalmente las enzimas de restricción reconocen secuencias de 4-6 nucleótidos y cortan en diferentes puntos, estos son separados por electroforesis.⁵³ Se obtiene una huella digital característica para cada organismo ¹.

Este método permite diferenciar distintos organismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de la ruptura de sus respectivos DNA's. Estos patrones conocidos como perfiles de restricción de DNA, se originan gracias a la actividad de las enzimas de restricción. Las endonucleasas cortan los enlaces fosfodiéster de la molécula de DNA en determinadas secuencias nucleotídicas, específicas para cada enzima, denominadas dianas de restricción. En los distintos individuos hay variación en los lugares del DNA en los que se encuentran las dianas de restricción originándose fragmentos de distinta longitud ⁴⁷.

Las ventajas de este método son:

- ✓ Es una técnica muy simple
- ✓ El costo depende principalmente de la enzima utilizada.
- ✓ Requiere de un fragmento específico de DNA.
- ✓ Produce un patrón específico de RFLP para cada especie ^{53,59}.

Esta técnica es muy sensible y aporta algunas ventajas, ya que muestra una gran especificidad por la secuencia diana, evitando las reacciones cruzadas habituales al detectar los productos de la expresión génica, particulares de cada organismo. Otra de las ventajas es su rapidez ¹.

1.9.3 RAPD

El Análisis de Polimorfismo del DNA amplificado con Cebadores Arbitrarios (RAPD) es una técnica que consiste en un PCR modificado especial. Un PCR clásico, requiere del conocimiento de las secuencias de DNA a amplificar para diseñar los primers. Si no se conoce ésta información, se puede realizar una amplificación al azar, siempre que se utilicen primers pequeños de 10 pb y temperaturas de hibridación de 35-42 °C.

En ésta técnica es importante que el DNA este libre de compuestos polifenólicos como los taninos, ya que lo pueden oxidar. Por ello es recomendable polimerizar primero el fragmento "Stoffel" de la polimerasa AmpliTaq de Applied Biosystems, para poder producir RAPDs más consistentes y reproducibles ⁴⁹.

Las ventajas de RAPD son:

- ✓ No requiere conocimiento de la secuencia
- ✓ Es una técnica basada en el PCR
- ✓ Es de bajo costo
- ✓ Es una técnica rápida
- ✓ Genera mucha información
- ✓ Presenta una genética de segregación dominante
- ✗ Su desventaja principal es la débil reproducibilidad entre diferentes laboratorios.

1.9.4 SSCP

La técnica de Análisis de la Conformación de Cadenas Sencillas (SSCP), es rápida, sencilla y muy sensible para detectar un cambio de base o algunas diferencias en una secuencia corta de DNA, ya que los fragmentos deben ser menores a 300 pb, usualmente se utilizan electroforesis en geles de poliacrilamida, estos deben ser separados bajo un enlace cruzado en una porción de

39:1 de acrilamida y bisacrilamida respectivamente, se debe mantener una temperatura del medio lo más estable que se pueda de preferencia a 4°C, esto para asegurar el éxito del SSCP, también se recomienda el uso de P^{33} dATP para obtener bandas más precisas, estos geles deben correrse durante un tiempo de 3-4 horas para minimizar el riesgo de la ausencia de banda.

Ya que esta técnica se basa en la relación entre la movilidad electroforética de una hebra de DNA monocatenario y su conformación, que es un reflejo de su secuencia nucleotídica. En esta técnica el DNA bicatenario se desnaturaliza a monocatenario y posteriormente se separan las dos hebras mediante electroforesis. Si hay diferencia en la secuencia de DNA se observará un cambio en la movilidad de las moléculas del DNA monocatenario ^{37, 58}.

1.9.5 SECUENCIACIÓN DE DNA

El análisis de la estructura del DNA y su relación con la expresión génica se ha visto también altamente facilitado por el desarrollo de poderosas técnicas para la secuenciación de moléculas de DNA.

Secuenciación de DNA por hidrólisis específica (método de Maxam y Gilbert 1989): parte de una hebra de DNA marcada en un extremo con ^{32}P . En general, se utiliza polinucleótido quinasa para añadir ^{32}P al extremo 5'-hidroxílico. El DNA marcado se puede entonces romper, por métodos específicos, preferentemente a la altura de cada uno de los cuatro nucleótidos. Se escogen las condiciones, para que se produzca una ruptura por cadena. En la mezcla de reacción para destruir una base dada, cada cadena rota origina, en consecuencia, un fragmento radioactivo que se extiende desde el extremo marcado con ^{32}P hasta una de las posiciones de dicha base ²⁷.

Por ejemplo, si la secuencia es:



los fragmentos radioactivos producidos por ruptura específica en el extremo 5' de cada una de las cuatro bases serían:

| | |
|---------------|--|
| Ruptura en A: | $^{32}\text{P-GCT}$ $^{32}\text{P-GCTACGT}$ |
| Ruptura en G: | $^{32}\text{P-GCTAC}$ |
| Ruptura en C: | $^{32}\text{P-G}$ $^{32}\text{P-GCTA}$ |
| Ruptura en T: | $^{32}\text{P-GC}$ $^{32}\text{P-GCTACG}$ |

Los fragmentos de cada mezcla se separan a continuación por electroforesis en gel de poliacrilamida, que puede separar moléculas de DNA que difieren en longitud por un sólo nucleótido. El siguiente paso es examinar un autoradiograma del gel.

Después se leen las bandas en orden ascendente, por tanto, el autorradiograma de un gel producido a partir de cuatro procesos distintos de ruptura química muestra un conjunto de bandas sobre el cual se puede leer directamente la secuencia ²⁷.

Secuenciación por interrupción controlada de la replicación enzimática (método del Didesoxi de Sanger): este método es el más utilizado por su sencillez, se copia una determinada secuencia de DNA de una hebra utilizando la DNA polimerasa. El cebador para la síntesis es un fragmento complementario, que se puede obtener por digestión controlada por una enzima de restricción o por síntesis química. El medio de incubación contiene, además de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (marcados radioactivamente), el análogo 2', 3'-didesoxi de uno de ellos. La incorporación de este análogo impide todo crecimiento posterior de la nueva cadena, porque carece del grupo hidroxilo en 3', que es esencial para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. Así, se producen fragmentos de distinta longitud que contienen el análogo dideoxi en el extremo 3. se separan por electroforesis cuatro series de dichos fragmentos de cadena interrumpida (una por cada análogo dideoxi) y la secuencia de bases del nuevo DNA se lee a partir del autorradiograma de las cuatro calles.

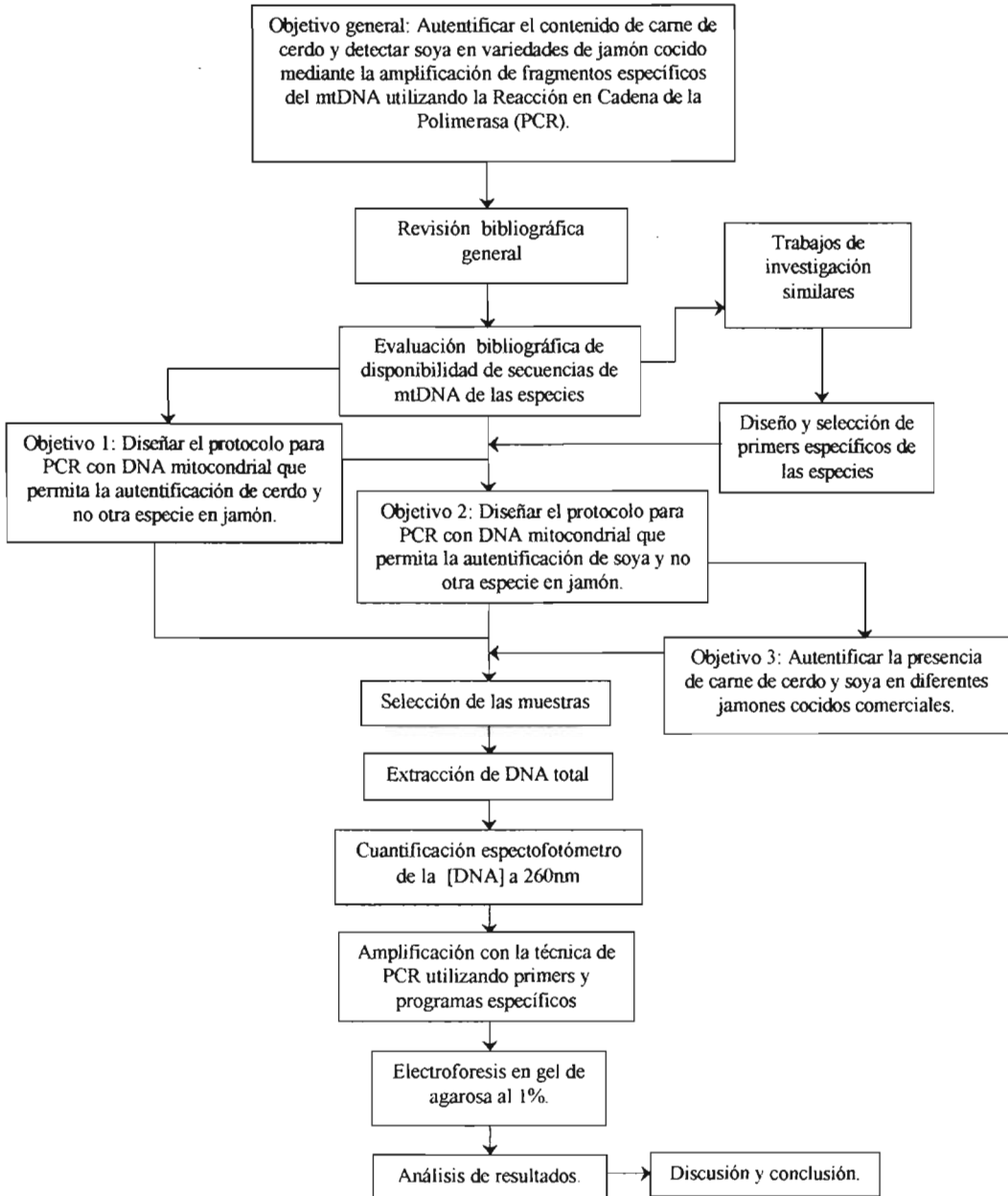
Una alternativa muy eficaz a la autoradiografía es la detección por fluorescencia. Se une un marcador fluorescente al oligonucleótido cebador, de distinto color para cada una de las cuatro mezclas de reacción de cadena interrumpida (marcador que emita luz azul para la mezcla que

produce terminación en A, y uno que emita en rojo para la terminación en C). Las mezclas de reacción se juntan y se someten a electroforesis. Las bandas separadas de DNA se detectan entonces por fluorescencia al salir del gel, y la secuencia de colores nos da directamente la secuencia de bases. De esta manera se pueden secuenciar hasta 500 bases; la detección por fluorescencia es ventajosa ya que se elimina el uso de reactivos radioactivos y el método puede ser fácilmente automatizado ²⁷.

CAPITULO II: MATERIAL Y METODOS

A continuación se presenta un cuadro metodológico acerca de la metodología que se siguió para la realización del presente trabajo.

2.1 CUADRO METODOLOGICO



2.1.1 DESCRIPCIÓN DEL CUADRO METODOLOGICO

Para diseñar el procedimiento que permita la evaluación del contenido de cerdo y soya en diferentes jamones, primero se buscaron las secuencias de DNA de las especies a estudiar para con estas realizar la adecuada delimitación del segmento a amplificar y la selección de los primers, para que este fuera único y específico de la especie a analizar.

2.2 DISEÑO DE LOS PRIMERS

Para la identificación de cerdo se utilizaron los primers descritos por Montiel y col. (2000)⁴⁶, cuyas secuencias se ilustran a continuación y que permiten la amplificación de un fragmento de 531 pb que corresponden a la región del D-loop del mtDNA.

F5 3' AACCCCTATGTACGTCGTGCAT 5' (15 592)

R5 3' ACCATTGACTGAATAGCACCT 5' (16 124)

El genoma mitocondrial de las plantas, que son encontrados en general son principalmente moléculas circulares heterogéneas, altamente complejas comparadas con sus contrapartes animales³³.

Con relación a la soya y al no localizar secuencias del genoma mitocondrial completo y sólo encontrar secuencias parciales de genes mitocondriales se procedió a realizar el diseño de una pareja de primers, y a pesar de la complejidad del genoma mitocondrial de la soya se pudo seleccionar una secuencia específica (primers) en la sección del atp6 y cox2³³, cuya secuencia se muestra a continuación:

Soy F 3' AGCGGGGTAGAGTAATTGGTC 5' (827)

Soy R 3' CAAGGAGCAATCGTGAGGAATAG 5' (1 132)

Estos primers permiten obtener un fragmento amplificado de 305 pb que corresponden a una región entre los genes atp6 y cox2 del mtDNA³³.

2.3 MATERIALES

2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO (selección de las muestras)

Las muestras que se utilizaron en fresco para el estudio fueron:

Cerdo (*Sus scrofa*)

Soya (*Glycine max*)

Pollo (*Gallus gallus domesticus*)

Conejo (*Sylvilagus floridans*)

Bovino (*Bos taurus*)

Las muestras de los jamones fueron seleccionadas en base a los distintos precios que hay en el mercado, tomando 3 muestreos y por triplicado para cada jamón tratando de que los lotes no fueran los mismos para poder asegurar de manera mas certera los resultados obtenidos así como también se revisaron los contenidos de las etiquetas para saber si los contenidos de cerdo y soya estaban reportados, estas muestras fueron recolectadas de 10 marcas comerciales diferentes de la central de abastos de la zona de Tultitlán Estado de México.

Obteniendo un total de 10 muestras de jamón que van de un precio por kilo de \$31.9 hasta \$103.9, con un contenido de proteína reportado en su etiqueta que va del 12% al 18%.

Jamón cocido 1:

\$40 por kilo, 14% de proteína, hecho en México.

Jamón cocido 2:

\$56 por kilo, 16% de proteína, hecho en México.

Jamón cocido 3:

\$90 por kilo, 18% de proteína, hecho en México.

Jamón cocido 4:

\$38 por kilo, 12% de proteína.

Jamón cocido 5:

\$33 por kilo, 12% de proteína, hecho en México.

Jamón cocido 6:

\$103.9 por kilo, 18% de proteína, hecho en México.

Jamón cocido 7:

\$31.9 por kilo, 12% de proteína, hecho en México.

Jamón cocido 8:

\$48 por kilo, 14% de proteína, hecho en México.

Jamón cocido 9:

\$36 por kilo, 12% de proteína, hecho en México.

Jamón cocido 10:

\$42.9 por kilo, 12% de proteína, hecho en México.

De cada una de las muestras se utilizó 0.5g aproximadamente.

2.3.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS

2.3.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA

- ☞ Nitrógeno líquido
- ☞ Solución de lisis (tris-base 50 mM pH 8, SDS 0.5% y EDTA 0.1M)
- ☞ 7µl de proteinasa K (20 mg/ml)
- ☞ Fenol IAC (fenol, cloroformo y alcohol isoamilico 25:24:1)
- ☞ Etanol frío

2.3.2.2 AMPLIFICACIÓN CON PCR

- ☞ kit PCR Master Mix (promega) el cual contenía, Taq DNA polimerasa, dNTP'S, MgCl₂, buffer y agua libre de nucleasas estéril.

- ☒ Pareja de primers para cerdo
- ☒ Pareja de primers para soya

2.3.2.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- ☒ Buffer TAE 1X (se prepara un TAE 50 X con 242g de tris-base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0.5M pH 8 y se diluye)
- ☒ Agarosa
- ☒ Ficol
- ☒ Bromuro de etidio

2.3.3 EQUIPO

- ☒ Micropipetas (Finnpipet Elmer).
- ☒ Termoblok (Lab-Line), modelo Multi Blok.
- ☒ Microcentrifuga refrigerada (Sorvall RMC 14).
- ☒ Balanza analítica electrónica (Ohaus), modelo AS200.
- ☒ Puntas estériles para micropipetas, varias capacidades de 0.5 µl hasta 100 µl.
- ☒ Agitador Vortex (Lab-Line), modelo Super Mixer 1290.
- ☒ Espectrofotómetro (WPA), modelo UV1101 Biotech Fotometer.
- ☒ Termociclador (Perkin Elmer), modelo Gene Amp PCR system 2400.
- ☒ Cámara de electroforesis horizontal pequeña 16cm largo X 4cm alto X 6.5cm ancho, tamaño del gel 7.5cm X largo 5cm ancho.
- ☒ Cámara de electroforesis horizontal grande (BRL), modelo Horizon 11.14.
- ☒ Fuente de poder (EC), modelo EC105.
- ☒ Fuente de poder (Biorad), modelo Power Pac 1000.
- ☒ Horno de microondas (Panasonic).
- ☒ Transiluminador (UVP), modelo M – 15E.
- ☒ Transiluminador (Cole Parmer), modelo 9814 – series tables.
- ☒ Equipo de fotografía para luz UV (Kodak Digital Science), cámara fotográfica DC40, software: Kodak Digital Science ID Versión 2.0.2.

2.4 METODOS

2.4.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Se realizó la extracción de DNA vegetal (soya) y animal (cerdo), con una adecuación del método de extracción de Sambrook (1989), optimizando con ello una técnica para el estudio.

Procedimiento

Pesar 0.125g de tejido en un tubo eppendorf, adicionar 1.25ml de solución de lisis y homogeneizar con ayuda del vortex, adicionar la proteinasa K e incubar a 50 °C durante dos horas, después se aumenta la temperatura a 60°C durante una hora o toda la noche para que se desactive la enzima.

Limpieza

Adicionar 0.25ml de fenol (fenol, cloroformo y alcohol isoamilico 25:24:1) y centrifugar a 10000 r.p.m. por 10 min. Recuperar la fase acuosa (parte de arriba) y adicionar 3 ml de etanol frío (como no cabe en un solo tubo hacerlo en dos) centrifugar a 10 000 r.p.m. por 10 min., decantar el etanol y dejar que se evapore el exceso y por último resuspender el DNA en agua desionizada.

Nota: El tejido se debe enjuagar con agua estéril y no manipularla con las manos, usar guantes. Para meter los tubos a la centrifuga se recomienda perforarlos con una aguja para evitar el estallamiento.

Cuantificación

- Se toma una alícuota del DNA y se mezcla con 50 volúmenes de agua desionizada.
- Se lee en el espectrofotómetro a 260, 280 y 320 nm.
- Se resta la lectura de 320 nm a las de 260 y 280 nm.
- Se divide la lectura de 260/280 nm y los resultados deben de dar entre 1.72 a 2.00 ya que los valores menores a estos indican presencia de proteína o RNA.
- La lectura de 260 nm se multiplica por la dilución (que es de 50) y como se sabe que a 260 nm $DO=1=50 \mu\text{g/ml}$ se obtiene la concentración en μg de DNA extraído/ ml

2.4.2 TÉCNICA DE AUTENTIFICACIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa se utiliza con el fin de amplificar un segmento de DNA a través de una serie de ciclos repetitivos consistentes en tres pasos:

1. El primero es la desnaturalización por calor del DNA en la búsqueda de algún raso genético. Luego de desnaturalizado el DNA, se realiza la separación física de las dos cadenas (de acuerdo al modelo de Watson y Crick (1912) el DNA está formado por 2 cadenas complementarias), mediante la incubación de la muestra con alta temperatura 93-97°C, éstas permanecerán separadas libres en la solución hasta que la reacción pase al paso 2.
2. El segundo paso se lleva acabo a 35-40°C, para permitir que los "primers" se unan a las secuencias blanco y se realice la hibridación.
3. El tercer paso consiste en la polimerización, elongación o extensión del complejo (sondas +DNA) a una temperatura de 72°C, mediante cambios cíclicos de temperatura repetidos un gran número de veces y por la acción de una enzima llamada "Taq DNA polimerasa" la cual es muy termoestable y es la que ha permitido la automatización del proceso de PCR en una forma sencilla.

2.4.2.1 DISEÑO DE PROGRAMAS PARA EL PCR

Se realizaron programas para realizar el PCR uno para la identificación del cerdo y otro para la soya

Programa para el cerdo:

- ∞ Desnaturalización inicial 95°C 10 minutos.
- ∞ Para los 30ciclos:
 - Desnaturalización 92°C 20 segundos
 - Hibridación 58°C 20 segundos
 - Extensión 72°C 30 segundos
- ∞ Extensión final 72°C 10 minutos

Programa para la soya:

☞ Desnaturalización inicial 92°C 5 minutos.

☞ Para los 30 ciclos:

- Desnaturalización 92°C 20 segundos
- Hibridación 64°C 20 segundos
- Extensión 72°C 30 segundos

☞ Extensión final 72°C 5 minutos

Prueba a nivel laboratorio de los primers seleccionados con los diseños del programa elegido uno para la soya y otro para el cerdo.

Para evaluar el contenido de cerdo en distintos jamones.

Se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar la presencia de cerdo con los primers F5' y R5' del D-loop para cada una de las muestras se utilizó un kit PCR Master Mix (promega) el cual contenía, Taq DNA polimerasa, dNTP'S, MgCl₂, buffer y por separado agua libre de nucleasas estéril; utilizando para 25 µl de volumen de reacción; 11 µl de agua libre de nucleasa, 12.5 µl de Master Mix, 0.5 µl de cada primer y 0.5 µl de muestra de DNA. Para la amplificación de cerdo y soya en las distintas marcas de jamón se utilizó el termociclador (Gene Amp PCR system 2400 de marca Roche) utilizando 30 ciclos para cerdo y 30 ciclos para soya; con una temperatura de desnaturalización de 92°C, de apareamiento de 58°C y una temperatura de extensión de 72°C. Con una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min durante 10.

Para evaluar el contenido de soya en distintos jamones.

Se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar la presencia de soya con los primers soy F del atp6 y soy R del cox2, para cada una de las muestras se utilizó un kit PCR Master Mix (promega) el cual contenía, Taq DNA polimerasa, dNTP'S, MgCl₂, buffer y por separado agua libre de nucleasas estéril; utilizando para 25 µl de volumen de reacción; 11 µl de agua libre de nucleasa, 12.5 µl de Master Mix, 0.5 µl de cada primer y 0.5 µl de muestra de DNA. Para la amplificación se utilizó el termociclador (Gene Amp PCR system 2400 de marca Roche) utilizando 30 ciclos; con una temperatura de desnaturalización de 92°C, de apareamiento de 64°C y una temperatura de extensión de 72°C, durando cada ciclo 70

segundos. Con una desnaturalización inicial 92°C durante 5min y una extensión final de 72°C durante 5min.

Al terminar todas las ampliaciones tanto del cerdo como de la soya y los distintos jamones, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar los segmentos amplificados de las muestras con 305pb para la soya; utilizando el marcador de peso molecular Ladder de 1Kb como referencia para el tamaño de los segmentos.

2.4.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis se realizó de la siguiente manera:

Procedimiento para un gel 1%

1. Se pesa 0.4g de agarosa y se agregan 40 ml del amortiguador TAE 50X
2. Se coloca en el microondas a temperatura baja, hasta que inicie la ebullición.
3. Retire el matraz y espere a que se atempere y regule el agua perdida, agregue 2 µl de bromuro de etidio y homogeneice.
4. Transfiera el agar a la charola de electroforesis y coloque el peine.
5. Después de 20 minutos, con el agar solidificado, retire los peines.
6. Coloque la charola en la cámara de electroforesis.
7. Agregue a la cámara la cantidad de amortiguador TAE 1X, hasta que se cubran los pozos.
8. Sobre parafilm 5 µl de la muestra*, 2 µl de azul de bromofenol (Loadine) y 2 µl de bromuro de etidio diluido 1:100.
9. Con el pipeteador automático homogenice la muestra y transfírela a uno de los pozos del gel de agarosa.
10. Repita los 2 pasos anteriores para el resto de las muestras.
11. Encienda la fuente de poder programando el voltaje constante entre 2 y 5 V/cm (aproximadamente 60 V, por 2 horas o hasta que el azul de bromofenol recorra 2/3 de la distancia del gel). Con el menor voltaje se obtiene una mejor resolución de bandas.
12. Apague la fuente de poder y retire cuidadosamente el gel.
13. Visualice el resultado de la electroforesis en un transiluminador U.V.

Nota: *la cantidad de muestra que se agregue variará según la concentración del DNA.

CAPITULO III: RESULTADOS

3.1 EXTRACCION Y CUANTIFICACION DEL DNA

Al realizarse la extracción del DNA de las distintas muestras tanto de jamón como de las materias primas (cerdo, soya), fue necesaria la posterior cuantificación para conocer la concentración de DNA obtenido este al igual que la extracción se hicieron por triplicado para corroborar los datos y en la Tabla 5 se muestran los promedios obtenidos ya que las lecturas de la densidad optica fueron iguales al igual que las replicas realizadas, después se realizó un cálculo para adicionar la cantidad de muestra requerida para el PCR según la concentración del DNA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentración de la extracción del DNA

| Muestra | Densidad optica λ de 260 | Concentración de DNA total $\mu\text{g/ml}$ muestreo 1 | Concentración de DNA total $\mu\text{g/ml}$ muestreo 2 | Concentración de DNA total $\mu\text{g/ml}$ muestreo 3 |
|----------|-------------------------------------|--|--|--|
| Cerdo | 0.564 | 1410 +/- 0 | 1411 +/- 0 | 1410 +/- 0.1 |
| Soya | 0.090 | 1607 +/- 0.2 | 1609 +/- 0.1 | 1606 +/- 0 |
| Jamón 1 | 0.883 | 2207.5 +/- 0 | 2208 +/- 0 | 2205 +/- 0.3 |
| Jamón 2 | 0.723 | 1807.5 +/- 0 | 1807.9 +/- 0 | 1808 +/- 0 |
| Jamón 3 | 0.751 | 1877.5 +/- 0 | 1877 +/- 0 | 1878 +/- 0.5 |
| Jamón 4 | 0.423 | 1057.5 +/- 0 | 1056.45 +/- 0 | 1058 +/- 0 |
| Jamón 5 | 0.652 | 1630 +/- 0 | 1630 +/- 0.2 | 1631 +/- 0 |
| Jamón 6 | 0.731 | 1827.5 +/- 0 | 1827 +/- 0 | 1829 +/- 0 |
| Jamón 7 | 0.583 | 1457.5 +/- 0 | 1458 +/- 0 | 1457 +/- 0 |
| Jamón 8 | 0.699 | 1747.5 +/- 0 | 1746.5 +/- 0 | 1747 +/- 0.09 |
| Jamón 9 | 0.530 | 1325 +/- 0 | 1324 +/- 0 | 1325 +/- 0 |
| Jamón 10 | 0.596 | 1490 +/- 0 | 1490 +/- 0 | 1491 +/- 0 |

La Tabla muestra las concentraciones obtenidas y se puede apreciar que la mas baja es la de soya esto se debe a que es la única muestra de origen vegetal, en las demás muestras las concentraciones son mayores a pesar de que para el estudio se tomó la misma cantidad de muestra esto se debe a que la concentración depende de la cantidad de DNA contenida en los núcleos de las células y el contenido en las mitocondrias, este último es el de nuestro mayor interés.

Al realizar la extracción total y obtener tan buenos resultados esto se asegura una cantidad suficiente de mtDNA para el estudio.

Las concentraciones obtenidas van desde 1325 $\mu\text{l/ml}$ hasta 2207.5 $\mu\text{l/ml}$ éstas variaciones no se deben al tamaño de la muestra ya que se tomó la misma cantidad de tejido de cerdo, jamón y soya para el estudio, se deben a la cantidad de DNA contenida en cada muestra aunque parte del DNA extraído en las muestras de jamón no es de origen animal si no es de algunos de los aditivos que se adicionan, por ello la concentración del DNA de cerdo y soya es muy similar ya que este en su totalidad es DNA puro de la especie.

Todas las muestras se diluyeron para poder tomar alicuotas del DNA debido a que era demasiado para la prueba de PCR ya que esta solo requiere de 25 μg de DNA contenidos en 0.5 μl de muestra que es la que necesita la prueba.

3.2 ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS ELEGIDOS PARA LA DETECCIÓN ESPECIFICA DE CERDO.

En la figura 4 se presenta un gel de electroforesis el cual muestra lo obtenido con la amplificación de PCR que permite observar una sola banda de 531 pb, esta corresponde al carril donde se colocó la muestra de carne de cerdo como era de esperarse no se apreció ninguna banda de amplificación en los demás carriles donde se pusieron las muestras de otras especies como soya, res, pollo y conejo respectivamente. Esto muestra que los primers que se utilizaron para la amplificación del cerdo no amplifican estas otras especies es decir que la presencia de estas especies en los jamones a analizar no interferirán en los resultados obtenidos ya que estas no amplificarán otra especie solo cerdo.

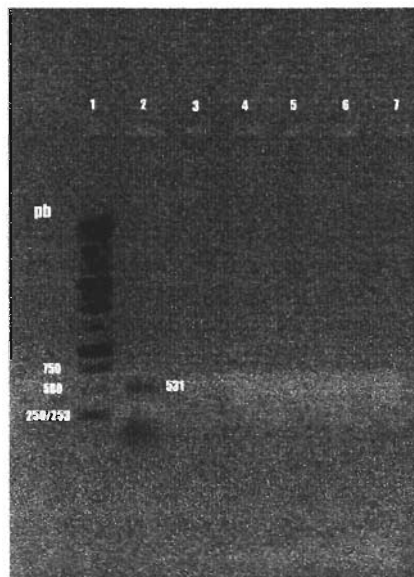


Figura 4. Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de PCR con (2) cerdo, (3) muestra blanco, (4) soya, (5) bovino, (6) pollo, (7) conejo. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb.

3.3 EFECTIVIDAD DE LOS PRIMERS DISEÑADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN ESPECIFICA DE SOYA

En la figura 5 se presenta un gel de electroforesis que permite observar una sola banda de 305 pb, que corresponde al carril donde se colocó la muestra de soya como era de esperarse no se apreció ninguna otra banda en los demás carriles con muestras de otras especies como cerdo, res, pollo y conejo respectivamente. Esto quiere decir que al no aparecer bandas de las otras especies estos primers diseñados para la amplificación son específicos para soya y evitarán amplificaciones erróneas o amplificadas no específicas aún en presencia de estas otras especies las cuales no intervendrán en el estudio.

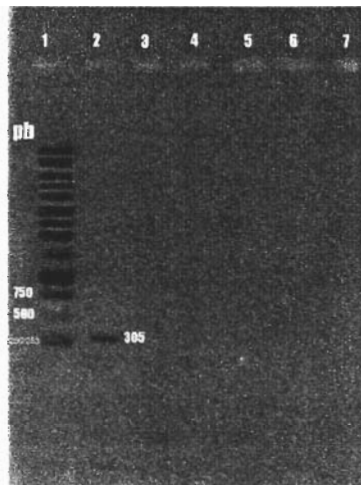


Figura 5. Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de PCR con (2) soya, (3) muestra blanco, (4) cerdo, (5) bovino, (6) pollo, (7) conejo. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb.

3.4 CONFIRMACIÓN DE LA UTILIDAD DE LOS PRIMERS DISEÑADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SOYA, EVALUADA EN DIFERENTES PRESENTACIONES DE LA MUESTRA.

En la figura 6 se observan tres bandas de amplificación de 305 pb que corresponden a las muestras de DNA extraído de frijol de soya, harina de soya y de soya texturizada con sabor.

Al encontrar bandas de amplificado en cada una de las muestras, se puede observar que la soya que se amplifique para las distintas muestras de jamón no depende aparentemente de la presentación de la soya que se le haya adicionado, corroborando con esto la alta especificidad de los primers para la soya, esto se dice considerando que hay otras presentaciones de soya como aislados y concentrados que no fueron estudiados y cuya aplicación en la industria de alimentos es muy amplia.

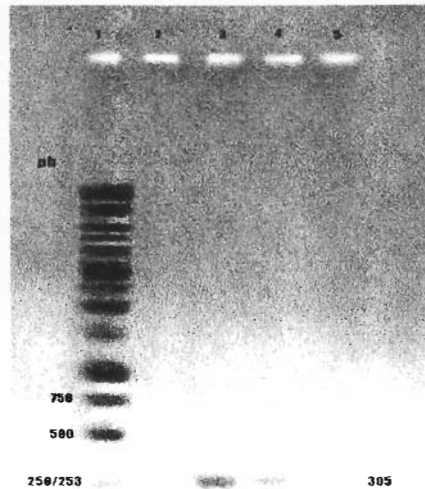


Figura 6. Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de PCR con (2) muestra blanco, (3) frijol de soya, (4) harina de soya, (5) soya texturizada con sabor. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb.

3.5 EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE CERDO Y SOYA EN DIFERENTES JAMONES COCIDOS COMERCIALES.

En las siguientes figuras 7a y 7b se observa un gel de electroforesis al 1% que presenta los resultados obtenidos al realizar la amplificación utilizando los primers elegidos de cerdo y los diseñados para soya en diferentes muestras de jamones cocidos comerciales.

Obteniendo para la Figura 7a bandas de 531 pb los cuales corresponden a los carriles con los amplificados con primers de cerdo para la muestra patrón (carril 2) y los distintos jamones (carriles 5, 7,9,11 y13) también se obtuvieron bandas de 305 pb las cuales corresponden a las amplificaciones de soya de la muestra patrón (carril 3) y las muestras de los jamones (carriles 6, 8, 10, 12 y 14), en los carriles 10 y 12 que corresponden a muestras con primers de soya para la amplificación no hubo amplificado queriendo decir con esto que estas muestras no contienen soya. Los jamones 1, 2 y 5 presentan bandas de amplificación para cerdo y soya , es decir que contienen ambas muestras; los jamones 3 y 4 solo presentan bandas de amplificación para cerdo es decir que no contienen soya. La distribución de las muestras en los carriles se muestra de manera mas clara en la Tabla 5.

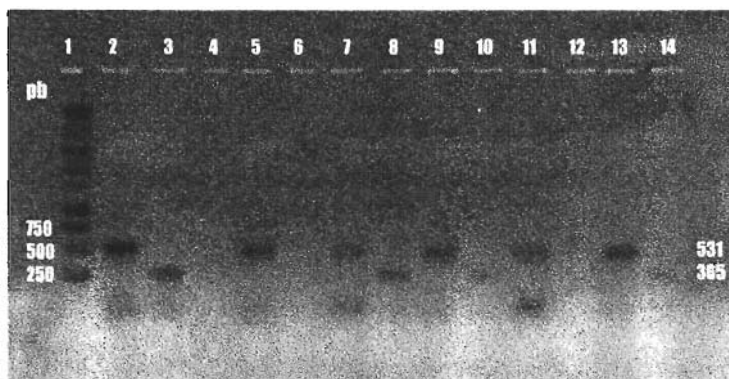


Figura 7a. Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de PCR con (2) muestra cerdo, (3) muestra soya, (4) muestra blanco, (5) muestra jamón 1 con primers de cerdo, (6) muestra jamón 1 con primers de soya, (7) muestra jamón 2 con primers de cerdo, (8) muestra jamón 2 con primers de soya, (9) muestra jamón 3 con primers de cerdo, (10) muestra jamón 3 con primers de soya, (11) muestra jamón 4 con primers de cerdo, (12) muestra jamón 4 con primers de soya, (13) muestra jamón 5 con primers de cerdo, (14) muestra jamón 5 con primers de soya. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb.

En esta tabla se muestra como se colocaron las muestras en los carriles del gel de electroforesis.

Tabla 6. Distribución de las muestras en el gel de electroforesis

| Muestras | Carriles | |
|-------------------------|-------------------|------------------|
| Marcador peso molecular | 1 | |
| Cerdo | 2 | |
| Soya | 3 | |
| Blanco | 4 | |
| | Con Primers cerdo | Con Primers soya |
| Jamón 1 | 5 | 6 |
| Jamón 2 | 7 | 8 |
| Jamón 3 | 9 | 10 |
| Jamón 4 | 11 | 12 |
| Jamón 5 | 13 | 14 |

En la Figura 7b se observan bandas de 531 pb los cuales corresponden a los carriles con los amplificados con primers de cerdo para la muestra patrón (carril 2) y los distintos jamones (carriles 5, 7,9,11 y13) también se obtuvieron bandas de 305 pb las cuales corresponden a las ampliificaciones de soya de la muestra patrón (carril 3) y las muestras de los jamones (carriles 6, 8, 10, 12 y 14), en los carriles 6 y 12 que corresponden a muestras con primers de soya para la ampliificación no hubo amplificado queriendo decir con esto que estas muestras no contienen soya Los jamones 7, 8 y 10 muestran amplificados para soya y cerdo; los jamones 6 y 9 solo presentan amplificado de cerdo es decir que no contienen soya. En la Tabla 6 se muestra la distribución de las muestras en los carriles del gel.

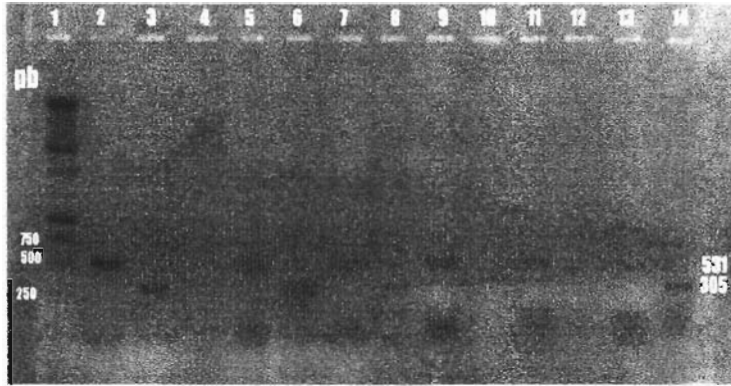


Figura 7b. Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de PCR con (2) muestra cerdo, (3) muestra soya, (4) muestra blanco, (5) muestra jamón 6 con primers de cerdo, (6) muestra jamón 6 con primers de soya, (7) muestra jamón 7 con primers de cerdo, (8) muestra jamón 7 con primers de soya, (9) muestra jamón 8 con primers de cerdo, (10) muestra jamón 8 con primers de soya, (11) muestra jamón 9 con primers de cerdo, (12) muestra jamón 9 con primers de soya, (13) muestra jamón 10 con primers de cerdo, (14) muestra jamón 10 con primers de soya. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb

En esta tabla se muestra la distribución de las muestras en los carriles del gel.

Tabla 7. distribución de las muestras en el gel de electroforesis

| Muestras | Carriles | |
|-------------------------|-------------------|------------------|
| Marcador peso molecular | 1 | |
| Cerdo | 2 | |
| Soya | 3 | |
| Blanco | 4 | |
| | Con Primers cerdo | Con Primers soya |
| Jamón 6 | 5 | 6 |
| Jamón 7 | 7 | 8 |
| Jamón 8 | 9 | 10 |
| Jamón 9 | 11 | 12 |
| Jamón 10 | 13 | 14 |

Todos los estudios se realizaron por triplicado y por fines prácticos solo se muestra un gel de cada prueba ya que los resultados siempre fueron muy similares.

En la siguiente Tabla 7 se presentan las muestras de jamón cocido comercial utilizados en el presente estudio indicando los ingredientes contenidos en su etiqueta, contenido proteico reportado en la etiqueta, costo por kilo y resultados de la amplificación para ambas especies (cerdo y soya).

En la Tabla 7 se ve de manera general los resultados más relevantes que son si amplificó o no, de las 10 muestras de jamones seleccionados y estudiados se puede apreciar que el 100% contienen cerdo y este se encuentra reportado en todas las etiquetas aunque el 30% de las etiquetas no lo reporten como materia prima principal. De estos jamones el 60% contienen soya y como se describe en la columna 2, esta se encuentra reportada en la etiqueta; y el 40% restante no contienen soya ya que no presentaron amplificado y en su etiqueta no está reportado el contenido de soya

Tabla 8. Resultados de las distintas marcas de jamón

| JAMON | INGREDIENTES | Proteína % | COSTO POR KILO | AMPLIFICACIÓN | |
|-------|--|---------------|----------------------|-----------------|----------------|
| | | | | CERDO 531 pb | SOYA 305 pb |
| 1 | Carne de ave, carne de cerdo, agua, proteína de soya, carragenina, sal, azúcar, glucosa, condimentos, humo líquido, fosfato de sodio, antioxidante y nitrito. | 14 | 40 | Si | Si |
| 2 | Pierna trasera de cerdo, carne de ave, proteína de soya, gelificantes, condimentos, sal, azúcar, antioxidantes, fosfato de sodio, acentuadores de sabor y nitrito de sodio. | 16 | 56 | Si | Si |
| 3 | Carne de cerdo, carne de ave. | 18 | 90 | Si | No |
| 4 | Pierna trasera de cerdo, fécula de maíz, sal yodatada, fosfato de sodio, azúcar, condimentos, eritorbato de sodio, nitrito y nitrato de sodio. | 12 | 38 | Si | No |
| 5 | pavo, cerdo, fécula y soya | 12 | 33 | Si | Si |
| 6 | Cerdo | 18 | 103.9 | Si | No |
| 7 | cerdo, pavo, soya y fécula | 12 | 31.9 | Si | Si |
| 8 | Carne de pavo, agua, carne de cerdo, sal refinada, proteína asilada de soya, maltodextrina, fécula de maíz, carragenina, azúcar, fosfatos, saborizantes naturales, sabor humo, eritorbato de sodio, glutamato monosódico y nitrito de sodio. | 14 | 48 | Si | Si |
| 9 | Pierna trasera de cerdo, agua, fécula, sal, carragenina, condimentos, azúcar, fosfato de sodio dihidrogenado, glutamato monosódico, propil paraeno, eritorbato de sodio, nitrito y nitrato de sodio. | 12 | 36 | Si | No |
| 10 | cerdo, ave, soya y fécula | 12 | 42.9 | Si | Si |

CAPITULO IV: DISCUSION

Se realizo la extracción del DNA de 12 muestras distintas por 3 muestreos y con 3 repeticiones cada una de las cuales 10 son muestras de distintas marcas de jamón y una es de carne de cerdo y la ultimo es de soya, obteniendo altas concentraciones de DNA que van desde 1325 $\mu\text{l/ml}$ hasta 2207 $\mu\text{l/ml}$ con variantes casi inexistentes entre las distintas repeticiones y muestreos; debido a las altas concentraciones se diluyeron todas las muestras ya que la cantidad para la realización del PCR es de 0.25 μg el 0.5 μl de muestra.

Por todo lo anterior se puede observar que la técnica de extracción seleccionada y modificada es capaz de extraer el DNA total en cantidades suficientes para asegurar que existe en la muestra el mtDNA suficiente para realizar sin ningún problema la técnica y que esta puede extraer DNA vegetal y animal.

Para rectificar la especificidad de los primers elegidos para la detección de cerdo, se realizó la amplificación con muestras de cerdo, pollo, bovino, conejo y soya para corroborar la amplificación se empleo la electroforesis, sus resultados se muestran en la Figura 4, en este gel se puede observar una sola banda de 531 pb que corresponde a la región del D-loop en el mtDNA del cerdo, ésta corresponde al carril donde se colocó la muestra de carne de cerdo y no se aprecia ninguna otra banda de amplificación en los demás carriles donde se pusieron las muestras de otras especies. Esto muestra que los primers seleccionados demostraron ser efectivos y específicos para la amplificación del cerdo y no amplifican éstas otras especies, es decir que la presencia de éstas especies en los jamones no interferirán en los resultados obtenidos ya que éstas no amplificarán otra especie animal, sino únicamente cerdo.

De la misma forma en la Figura 5 se puede observar la efectividad de los primers diseñados para la amplificación de soya, obteniendo como resultado una banda de amplificación de 305 pb que corresponden a la región del atp6 y cox2 del mtDNA de la soya, de la misma manera no se obtuvo ninguna otra banda con otras especies como soya, cerdo, bovino, conejo.

Los resultados obtenidos muestran la especificidad de los primers diseñados para la soya. Al realizar las amplificaciones con los primers de cerdo con una muestra de soya y viceversa se asegura que los primers solo amplifican la muestra seleccionada y que otras muestras no influyen en los resultados que se obtuvieron.

En la Figura 6 se puede apreciar nuevamente la eficiencia de la pareja de primers diseñados para la amplificación de la soya ya que fue posible obtener la banda de 305 pb tanto para frijol, harina de soya y soya texturizada con sabor. Lo cual confirma la especificidad de los métodos moleculares que utilizan al DNA aún en muestras que han recibido diferentes tratamientos como la transformación a harina y el texturizado. Como se sabe el proceso para la transformación a harina consta básicamente de un descascarillado del frijol, un desengrasado por solventes, seguido de un molido y un cernido fino, el texturizado es harina de soya sin grasa que ha sido procesada y secada para dar a la sustancia una textura y sabor que asemeje a la carne. Esta harina es mezclada después con agua para remover los carbohidratos solubles y el residuo es texturizado. Este método consiste en pasar el residuo caliente 80°C de la soya de un área de alta presión a través de un extrusor que hace que la proteína de la soya se expanda. Después el producto es deshidratado a 50°C 2 horas y puede ser cortado en pedazos o en forma de gránulos⁶¹. Esto muestra que sin importar la presentación de la soya adicionada en el jamón estos primers darán una banda de amplificación de 305 pb.

Se realizó la amplificación de las 10 diferentes muestras de jamón estos resultados fueron realizados por triplicado para obtener mayor confiabilidad, se realizó la amplificación para cada uno de los jamones con los primers de cerdo y otra con los primers de soya, obteniendo como resultado geles de electroforesis como se muestran en las figuras 7a y 7b la evaluación de la presencia de cerdo y soya en diferentes jamones comerciales; al evaluar los 10 jamones cocidos de diferentes marcas comerciales se observaron bandas de amplificación de 531 y 305 pb que corresponden a cerdo y soya respectivamente. Los jamones 1, 2, 5, 7, 8 y 10 muestran la presencia de cerdo y soya y los jamones 3, 4, 6 y 9 muestran presencia de cerdo y ausencia de soya; con esto se puede apreciar que la presencia de las bandas de cerdo se encuentran en el 100% de los jamones analizados, diciendo con ello que todos contienen carne de cerdo, aunque las intensidades de las bandas son distintas esto se puede deber a que las concentraciones de la carne no son las mismas, a simple vista las más intensas son las de mayor costo y estas mismas marcas no detectaron presencia de soya y es acorde con lo establecido en su etiqueta y coincide con lo esperado, a mayor precio, mayor calidad.

Carbonell, Nancy (1995)⁹, implemento una técnica para la evaluación de la adulteración de jamón cocido con proteína de origen no cárnico, con perfiles electroforéticos identificado soya y caseinato de calcio. Obteniendo bandas de proteínas comunes para la soya y el caseinato, con sus respectivos pesos moleculares para su diferenciación entre si, en jamones elaborados que contenían porcentajes de los adulterantes en cuestión en concentraciones de 0.5% hasta el 4%, observando como lo esperaba bandas de amplificación en todos los casos.

Concluye que la técnica es adecuada para la diferenciación de soya y caseinato de calcio aunque requiere una adición mayor o igual al 2% para hacer mas evidente la banda amplificada de soya y que es necesario que el analista busque siempre aquellos geles en los que la definición de las bandas sea la mas clara posible ya que en ocasiones el análisis de bandas e intensidades es confuso.

Este problema no ocurre con la técnica de PCR y con los primer diseñados para la amplificación de soya ya que los geles que se pueden obtener son claros y con una sola banda lo cual es mucho más sencillo de identificar.

Aunque los perfiles electroforéticos pueden complementar la técnica de PCR cuando se amplifican muestras de origen animal ya que esta no es capaz de diferenciar la parte de la cual fue extraído el DNA amplificado.

Los resultados observados en la Tabla 7 muestran que en los diferentes jamones el 60% se detectó la presencia de 305 pb correspondiente a la presencia de soya y en todos los casos ésta había sido declarada en la etiqueta correspondiente, en ésta tabla se puede observar como se mencionó anteriormente que los jamones de mayor costo como el 3 y 6 no presentaron la banda correspondiente a la soya de acuerdo con lo establecido en sus ingredientes reportados.

En los jamones de menor costo que tampoco presentaron la banda de soya como el 4 y 9, reportan en su etiqueta la presencia de fécula de maíz entre otros ingredientes los cuales seria recomendable verificar.

Los resultados obtenidos en trabajos anteriores al igual que en el presente trabajo muestran la importancia de llevar a cabo estudios cada vez más precisos como lo son las técnicas basadas en ácidos nucleicos como ya se mencionó con anterioridad, aunque las técnicas basadas en proteínas también han dado muy buenos resultados pero estas se ven afectadas con la temperatura y no distinguen entre una especie y otra.

El proceso de PCR es mucho más barato que otros métodos basados en inmunodifusión, RFLP-PCR los cuales requieren equipo costoso y detecta cerdo y soya procesada y sin procesar. Al complementarse la técnica de PCR con los primers seleccionados de las secciones del mtDNA se obtuvieron resultados de amplificación mucho más específicos para cada una de las especies analizadas.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró aislar el DNA de la soya, cerdo y de las distintas marcas de jamón, para la realización del análisis con el PCR, al encontrar amplificados se demuestra que no hubo degradación del DNA y la técnica se pudo realizar sin ningún problema, con esto también se demostró la especificidad de los primers seleccionados, ya que estos solo amplificaban soya y cerdo según el caso.

La identificación de secuencias de soya y cerdo en alimentos sometidos a procesos como el del cocimiento del jamón, sugiere que las secuencias de las secciones del *cox2*, *atp6* y *D-loop* respectivamente permanecen intactas y en condiciones óptimas para realizar de manera adecuada y con resultados favorables la técnica del PCR.

La técnica diseñada para la autenticación de la soya es tan específica que no amplifica otras especies como cerdo, res, conejo y pollo; es tan sensible que detecta cantidades de soya aunque se han sometido a un proceso térmico como el jamón, el cual se somete a un cocimiento a una temperatura de 80 °C por 6 horas aproximadamente, también se demuestra que la técnica amplifica la soya aún si está ha sufrido de procesos como el texturizado y la transformación a harina.

La técnica de autenticación para detectar la presencia de cerdo en los diferentes jamones, resultó muy específica ya que no amplifica otras especies como soya, conejo, res y pollo; y así éstas no intervinieron en la autenticación.

El cocimiento en las condiciones antes mencionadas no degrada de manera importante el DNA contenido en las mitocondrias en la sección del *cox2* y *atp* para la soya, y *D-loop* para el cerdo.

Las muestras analizadas de jamón cocido se certificaron como no adulteradas, ya que en su DNA contienen secuencias de las secciones antes mencionadas, mostrando con esto la presencia de cerdo y soya y el contenido de estas se encuentra reportado en su etiqueta.

En los jamones estudiados se encontró que la presencia de soya disminuye el precio, es decir, que al comparar los precios de los jamones, los que no contienen soya presentaron el costo mas alto, aunque en otros que no reportan soya y su precio es bajo contiene fécula de maíz y ésta también sirve para disminuir los costos de producción, se recomienda realizar un análisis para cuantificar de igual manera la presencia de fécula de maíz y también de otras especies animales distintas a las aquí mencionadas como el caballo, avestruz u otras que puedan ser adicionadas al jamón. Seria importante también poder contar con un lector de geles que permita ayudar a cuantificar la concentración de proteína de soya o DNA en aquellos productos que la contienen, para poder checar la concentración contra los niveles permitidos en la NOM vigente, realizando una curva patrón para compararla con las muestras.

Se recomienda realizar un estudio con enzimas de restricción (RFLP) que permita la cuantificación del contenido de cerdo y soya en los diferentes tipos de jamones incluso en otros productos y la identificación de otros aditivos como fécula de maíz y otras especies animales como caballo y avestruz.

BIBLIOGRAFIA

1. Aranda E.; A. Martín; M. C. Díaz; M.M. Rodríguez; F. Núñez; J. J. Córdoba. 1999. "Técnicas de ácidos nucleicos para la detección de *C. botulinum* en alimentos". Alimentaria, Pág. 45.
2. Badui Dergel Salvador. 1998. Diccionario de tecnología de los alimentos. Editorial Addison Wesley Longman, primera edición, Pág. 300.
3. Bellagamba Federica, Moretti Vittorio M., Comincini Sergio y Valfre Franco. 2001. "Identification of Species in Animal Feedstuffs by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA". J. Agric. Food Chem, Pág. 49.
4. Bert Popping. 2002. "The Application of biotechnological methods in authenticity testing". Journal of Biotechnology, Pág. 98.
5. Calvo J. H., P. Zaragoza, and R. Osta. 2001. "Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment" Journal Animal Science. 79:2108-2112
6. Calvo J. H., Zaragoza P., & Osta R. 2002. "Random amplified polymorphic DNA fingerprintings for identification of species in poultry paté". Poultry Science 80: 522-5224
7. Calvo Jorge H., Osta Rosario, And Zaragoza Pilar. 2002. "Quantitative PCR Detection of Pork in Raw and Heated Ground Beef and Pate" J. Agric. Food Chem., 50, 5265-5267
8. Calvo Jorge H.; Rodellar Clementina; Zaragoza Pilar; Osta Rosario. 2002. "Beef- and bovine derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification". Journal of Agricultural and food chemistry, Pág.50.
9. Carbonell, Guadarrama Nancy; 1995. "Implementación de una técnica para la evaluación de la adulteración de jamón cocido con proteína de origen no cármico". Tesis; Cuautitlán Izcalli México.

10. Chen F. C., Hsieh Y. H. P., & Bridgman R. C. 1998. "Monoclonal antibodies for porcine thermalstable muscle protein for detection of pork in raw and cooked meat". *Journal of food Science* 63(2): 201-205.
11. Dieter B, Hans-Grosch, 1985. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
12. Elizarraras Najera Luz María; 2003. "Aditivos empleados en la industria cárnica". Tesis; Cuautitlán Izcalli México.
13. Espinoza, Piñón Aide; 2000. "Requisitos de calidad en la fabricación de un jamón cocido". Tesis; Cuautitlán Izcalli México.
14. Freixanet, Ll. , Lagares, J., 1995. *Elaboración de jamón cocido*. Rev. *Industria Alimentaria*. Vol. 6.
15. Frey Werner. 1989. *Embutidos curados y cocidos*. *Die Fleischerei*, no. 6,7,8. Zaragoza, España.
16. Hart; 1971. *Análisis moderno de los alimentos, "Fundamentos, métodos y aplicaciones"*. Ed. Acribia; Zaragoza España.
17. Hayes; 1993. "Microbiología e higiene de los alimentos". Ed. Acribia; Zaragoza España.
18. Helen Charley, 1991. "Tecnología de alimentos". Ed. Limusa, México.
19. <http://usinfo.state.gov/journals/ites/0502/ijes/label.htm>
20. <http://www.bioq.unizar.com.hsa/servicios/ap/biomol>
21. <http://www.es.emdnet.org/Doc/ETC-1998-04/primer>
22. <http://www.fao.org>
23. <http://www.sciencemagazine.com>

24. Hughes Christopher. 1994. Guía de aditivos. Editorial Acribia Zaragoza, España, Pág. 190.
25. Información recabada de la red. <http://www.um.es/bmbi/ayudasdocentes> y <http://www.pearsoneducación.com/mathews/paginas/guiaestudio>
26. Ishikawa, Karou. 1994. "Introducción al control de calidad". Ed. Díaz de santos; Madrid España.
27. J. Sambrook y Rossel D. 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual. EVA, Cold Spring. Garbor Laboratory Press.
28. J. Sambrook; E.P. Fritch; T. Manistis. 1989. "Molecular Cloning". Tomo 2, Ed. Centennial, USA.
29. J.H. Otto A. Towle. 1995. Biología Moderna. México. Mc Graw-Hill, Pág. 621.
30. Jaques Monod, Jacob Francois 1996, Biología Molecular décimo segunda edición Editorial Ciencia y Desarrollo México D.F. Pp 9-10
31. Jasso Sánchez Ana Luisa; 1998. "Evaluación del tipo de proteínas presentes en embutidos comerciales tipo jamón cocido expandidos en la ciudad de México mediante patrones electroforeticos en geles de poliacrilamida". Tesis; Cuautitlán Izcalli México.
32. Jennings J. C., Kolwyck D. C., Kays S. B., Whetsell A. J., Surber J. B., Cromwell G. L., Lirette R. P., and Glenn K. C. 2003. "Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal". J. Anim. Sci. 81:1447-1455
33. Kanasawa Akira; Azumi Tozuca; Sumie Kato; Tetsuo Mikami; Jun Abe; Yoshiya Shimamoto. 1998. "Small interspersed sequences that serve as recombination sites at the cox2 and atp6 loci in the mitochondrial genome of soybean are widely distributed in higher plants". Curr Genet, 33.

34. Kingombe CeÀ sar Isigidi Bin, thi LuÈ Elisabeth, Schlosser Heidi, Howald Denise, Kuhn Monika, Jemmi Thomas. 2001. "A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an efective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy". *Meat Science* 57 Pàg. 35-41
35. Kocher, T. D.; Thomas, W. K.; Meyer, A.; Edwards, S. V.; Pabo, S.; Villablanca , F. X.: Wilson, A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolutions animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 86, 6196 – 6200.
36. Lahiff S., Glennon M., Brien L. O., Lyng J., Smith T., Mather M. And Shilton N. 2000. "Species specific PCR for the identificacion of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM)". *Molecular and cellular Probes* 15: 27-35.
37. Laube I, Spiegelberg I A., Butschke I A., Zagon I J., Schauzu I M., Krohl L. & Broll H. 2003. "Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction". *International Journal of Food Science and Technology* 38, 111–118
38. Lisker Rubén, Armendares Salvador 2000, *Introducción a la Genética Humana*, primera edición, Editorial El Manual Modemo México D.F.
39. Lockley Andrew K. y Ronald G. Bardsley. 2000. "Novel method for the discrimination of Tuna (*Thunnus thynnus*) and Bonito (*Sarda sarda*) DNA". *J. Agric. Food Chem.* 48, 4463-4468.
40. Manuales para la educación agropecuaria. 1983. "Elaboración de productos cármicos". Editorial Trillas, México.
41. Martinez Iciar and Malmheden Yman Ingrid. 1999. "Species identification in meat products by RAPD analysis". *Meat Science.* 31,459-466.
42. Mas Eva, Poza Julio; Ciriza Jesús. 2001. Fundamento de la reacción en cadena de la Polimerasa. *Revista Acuatic* No. 15. Universidad de Zaragoza España, pag 154-158.
43. Matisset, Reinhard; 1992. Análisis de los alimentos, "Fundamentos, métodos y aplicaciones". Ed. Acribia; Zaragoza España.

44. Matsunaga, T.; Chikuni, K.; Tanabe, R.; Muroya, S.; Shibata, K.; Yamada, J.; Shinmura, Y. 1999. "A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay". *Meat Science*, 51.
45. Meyer A.; Kocher, T. D.; Basasibwaki, P.; Wilson, A. C.; 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria Cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347, 550 – 553.
46. Montiel – Sosa J. F.; Ruiz- Pesini E.; Montoya J.; Roncales P.; López Pérez M. J.; Pérez – Martos A. 2000. "Direct and Highly Species-Specific Detection of Pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA". *J. Agric. Food Chem.* 48, 2829-2832.
47. Puertas M.J. 1992. "Métodos de estudio del DNA". *Genética: fundamentos y perspectivas*. Ed. Interamericana. McGraw Hill. pp310-345
48. Rodríguez T. Gemma, Santiago Matz. Ma. Concepción. 2000. Estudio del ADN, Secuenciación automática de ADN Publicación del Instituto de Investigaciones Biomédicas. pag 325-331.
49. Saez R., Sanz Y., Toldra F. 2004. "PCR-based gerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products". *Meat Science* 66, 659–665
50. Sanjuan A. J., Raposo-Gillan and Comesaña A.S. 2002. "Genetic identification of *Lophius budegassa* and *L. piscatorius* by PCR-RFLP Analysis of a Mitochondrial *Tma^{Gta}/Cytocrome b Segment*". *Journal of food Science* 67(7): 2644-2648.
51. SECOFI. 2003 Norma Oficial Mexicana. NOM-158-SCFI-2003, Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial.
52. SECOFI. 1990. "Pirámide de calidad". Secretaría de patrimonio y fomento industrial.

53. Sun Yu-Ling, And Lin Chich-Sheng. 2003. "Establishment and Application of a Fluorescent Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Method for Identifying Porcine, Caprine, and Bovine Meats". *J. Agric. Food Chem.* 51, 1771-1776
54. Taanman Jan-Willem. 1999. "The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication". *Biochimica et Biophysica Acta*, 103-123.
55. Vamam; Carne y productos cárnicos. 1995. "Tecnología, química y microbiología". Ed. Acribia; Zaragoza España.
56. Walker Jerilyn A., Hughes David A., anders Bridget A., Shewale Jaiprakash, Sinha Sudnir K., and Batzer Mark A. 2003. "Quantitative intra-short interspersed element PCR for Species-specific DNA identification". *Analytical Biochemistry*. 316, 4332-4336.
57. White, A, P. 1982. "Principios de Bioquímica". Ed. Mc Graw Hill, México, pág. 107.
58. Wolf Christian, Juerg Luethy. 2001. "Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA". *Meat Science* 57 161-168
59. Wolf Christian, Rentsch Ju"rg, and Hu"bner Philipp. 1999. "PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification". *J. Agric. Food Chem.* 47, 1350-1355
60. www.sagarpa.gob.mx
61. www.smn.com.mx