



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Determinar la presencia de carne de caballo (*Equus caballus*) en productos cárnicos comercializados en México, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A:

**VELÁZQUEZ MORALES ALDO EBANY**

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa

COASESOR: I. A. Ana Elvia Sánchez Mendoza



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.



*Ingeniería en alimentos*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Determinar la presencia de carne de caballo (Equus caballus) en productos cárnicos comercializados en México, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Que presenta el pasante: Aldo Ebany Velázquez Morales  
Con número de cuenta: 306315192 para obtener el Título de: Ingeniero 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 ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Octubre de 2013.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
<b>VOCAL</b>	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Carolina Moreno Ramos	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
<b>2do. SUPLENTE</b>	IA. Miriam Álvarez Velasco	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



---

*Ingeniería en alimentos*

***“Porque la vida  
es más fuerte que la muerte  
y la fe más poderosa que la duda”***

(Hermann Hesse)



## *Ingeniería en alimentos*

### DEDICATORIAS

*Gracias, Dios por regalarme la vida, una hermosa familia y brindarme la oportunidad de ejercer una profesión maravillosa.*

*A mis padres, nunca podré pagarles todo el amor, sus consejos y todo lo que han sacrificado en sus vidas por darnos la mejor educación.*

*Hermanitos, el tenerlos a mi lado siempre me impulsa a ser mejor persona, los quiero como no se imaginan.*

*Por sus palabras de aliento y cariño, abuelitos los amo.*

*Jesús Morales Rodríguez, siempre estarás en mi corazón y sólo puedo decir que eres increíble. †*

*Alejandra, Bianca, Ismael, Miguel y Julio, nunca voy a olvidar cada momento divertido que pasamos juntos.*

*Amigos de la facultad: Laura, Karina, Dannira, Araceli, Lesli, Karen, Karla, Rosalba, Marco, Manuel, Absalon, Erick, Ademir y compañeros de la generación 33 sólo les puedo desear que todo en sus vidas se colme de éxito.*

*Amigos del taller: Claudia, Johanny, Karla, Charal, Dalia y españoles, nunca olvidaré todas aquellas frases memorables que me hicieron reír tanto.*

*Confío plenamente que soy un instrumento de Dios, que él me permitirá mantener el corazón en su lugar y ser un mexicano de bien.*



## **AGRADECIMIENTOS**

*Hago un especial agradecimiento a cada persona e institución que me acompañaron en este largo camino del conocimiento.*

*Dr. José Francisco Montiel Sosa, gracias por su apoyo y asesoría en el presente proyecto, pero sobre todo por compartir su invaluable conocimiento.*

*Dra. Susana Patricia Miranda Castro, gracias por ser auténtica.*

*Ing. Ana Elvia Sánchez Mendoza, por su tiempo, dedicación, paciencia y amistad, muchas gracias.*

*Gracias, a cada uno de los sinodales que se hicieron partícipes en la presente tesis con cada revisión y tiempo invertido.*

*Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME 202513) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN211413), por apoyar la superación y desarrollo del personal académico.*

*Siempre estaré eternamente agradecido con la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi casa, forjar mi humanidad, pero indudablemente por brindarme la oportunidad de formar parte de su familia.*



**CONTENIDO**

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>TERMINOLOGÍA</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1: GENERALIDADES DE LA CARNE</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Composición química</b>	<b>15</b>
1.1.1 Agua	15
1.1.2 Contenido de proteína en la carne y valor proteico	16
1.1.3 Lípidos	17
1.1.4 Carbohidratos	17
1.1.5 Vitaminas y minerales	17
<b>1.2 Tecnologías de elaboración de la carne</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Derivados cárnicos</b>	<b>19</b>
1.3.1 Productos cárnicos procesados crudos	19
1.3.2 Productos cárnicos curados	19
1.3.3 Productos cárnicos crudos – cocidos	20
1.3.4 Productos cárnicos precocinados – cocinados	20
1.3.5 Embutidos crudos – fermentados	21
1.3.6 Productos cárnicos secos	21
<b>1.4 Carne de caballo</b>	<b>21</b>
<b>1.5 La carne de caballo en México</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Adulteraciones en productos a base de carne</b>	<b>26</b>
<b>1.7 Etiquetado de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-213-SSA1-2002)</b>	<b>27</b>
<b>1.8 Técnicas de autenticación de especies</b>	<b>28</b>
1.8.1 El DNA	29
1.8.2 DNA mitocondrial	29
1.8.3 Desnaturalización de DNA	30
1.8.4 Hibridación de DNA	31
1.8.5 Secuenciación de DNA	32
1.8.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	32
1.8.7 Electroforesis	34
1.8.8 PCR múltiplex	36
1.8.9 Determinación de la autenticidad de los alimentos mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA)	37



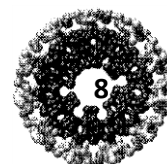
<b>CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivo general</b>	<b>38</b>
2.1.1 Objetivo particular 1	38
2.1.2 Objetivo particular 2	38
2.1.3 Objetivo particular 3	39
<b>2.2 Cuadro metodológico</b>	<b>40</b>
<b>2.3 Material biológico</b>	<b>41</b>
2.3.1 Muestra de sangre	41
2.3.2 Muestras de productos frescos o bajo proceso	41
<b>2.4 Extracción de DNA de las muestras a trabajar</b>	<b>42</b>
2.4.1 Disgregación del tejido	42
<b>2.5 Cuantificación de DNA por medición de la absorbancia (260/280nm)</b>	<b>44</b>
<b>2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b>	<b>45</b>
2.6.1 Preparación de la reacción	45
2.6.2 Etapas y ciclos de la reacción	46
<b>2.7 Electroforesis en geles de agarosa</b>	<b>47</b>
<b>2.8 Análisis de los resultados de electroforesis</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Seleccionar y corroborar secuencias reportadas de primers para la identificación de <i>Equus caballus</i>.</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Establecer a partir de sangre de caballo un control positivo que permita la identificación de carne de caballo y definir las condiciones de PCR para su amplificación.</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Evaluar la presencia de carne de caballo en muestras comerciales, mediante la técnica propuesta.</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>72</b>





## ÍNDICE DE TABLAS

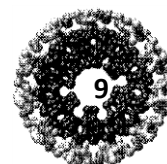
<i>Tabla 1 Aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales (Wu, G., 2009).</i>	16
<i>Tabla 2 Fracción principal y contenidos en 100g de una proporción comestible.</i>	23
<i>Tabla 3 Componentes de la PCR</i>	46
<i>Tabla 4 Etapas y condiciones programadas en el termociclador</i>	46
<i>Tabla 5 Cuantificación de la concentración y pureza de DNA de caballo</i>	57
<i>Tabla 6 Cuantificación de la concentración y pureza del DNA de carne de seis especies distintas a la carne de caballo.</i>	59
<i>Tabla 7 Cuantificación de la concentración y pureza de quince muestras comerciales antes y después de su dilución para alcanzar una concentración de DNA a 60ng/<math>\mu</math>L</i>	61
<i>Tabla 8 Cuantificación de la concentración y pureza del DNA de las mezclas con caballo y res.</i>	66





## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Principales destinos de las exportaciones de carne de caballo entre 2008-2010.</i>	24
<i>Figura 2 DNA mitocondrial del humano.</i>	30
<i>Figura 3 Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.</i>	34
<i>Figura 4 Evaluación del correcto funcionamiento de los primers SIM y reverso de caballo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo).</i>	58
<i>Figura 5 Evaluación de la especificidad del primer reverso de caballo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, BT = Res, CD = Cerdo, P = Pollo, MZ = Maíz, S = Soya, T = Trigo, C+ = Control positivo (sangre de caballo).</i>	60
<i>Figura 6 Evaluación de las primeras cuatro muestras comerciales para corroborar si efectivamente se está comercializando carne de caballo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo), 1 = Hamburguesa, 2 = Res de Walmart, 3 = Res del mercado, 4 = Chilorio.</i>	62
<i>Figura 7 Evaluación de las siguientes seis muestras comerciales para corroborar si efectivamente se está comercializando carne de caballo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo), 5 = Burger, 6 = Cecina de res de Walmart, 7 = Cecina de res de la Merced, 8 = Cecina de res de Yecapixtla, 9 = Res de la Merced, 10 = Taco de cecina de res.</i>	63





*Figura 8 Análisis de electroforesis al 1.5% en gel de agarosa, obteniendo el amplificado de la PCR de las muestras: (11-15) cuatro muestras de bistec de res y una de carne molida de res, respectivamente; M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo).\_\_\_\_\_ 64*

*Figura 9 Prueba de electroforesis para corroborar el correcto amplificado de las muestras que marcaron positivo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo), 7 = Cecina de res de la Merced, 15 = Carne molida de res, 9 = Res de la Merced. \_\_\_\_\_ 65*

*Figura 10 Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos de la PCR, para mezcla diferentes de DNA mitocondrial de caballo y res: M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo); (líneas 100-5) 100% caballo, 75% caballo/25% res, 50% caballo/50% res, 20% caballo/80% res, 10% caballo/90% res y 5% caballo/95% res, respectivamente. \_\_\_\_\_ 67*



## TERMINOLOGÍA

<b>Adulteración</b>	Falsificación de la calidad o pureza de algo, por la adición de una sustancia extraña.
<b>Amplificado</b>	Producto resultante de la PCR. Fragmentos específicos de DNA multiplicados durante la reacción.
<b>Autenticidad</b>	Calidad y carácter de verdadero o autorizado.
<b>BrEt</b>	Bromuro de etidio.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>DNA molde</b>	DNA diana, plantilla, template. Fragmento al que se dirige la PCR, delimitado por primers.
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleosidos trifosfato.
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>mtDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>PCR</b>	<i>"Polymerase Chain Reaction"</i> Reacción en cadena de la Polimerasa.
<b>Primers</b>	Cebadores, oligonucleótidos complementarios a una de las dos hebras del DNA. Los cuales son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal.
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferencia.



## RESUMEN

El presente proyecto se llevó a cabo para demostrar la presencia de carne de caballo en productos cárnicos frescos y procesados, principalmente en carnicerías donde la probabilidad de que se encuentre en venta carne de caballo como de res, es alta.

Se tiene presente que el precio por tonelada de carne de caballo es la mitad que la de otras especies como lo son la bovina y la porcina, y que el problema no es que nos vendan carne de equino, ya que diversos estudios demuestran muchas ventajas que tiene, si no que en el mercado se encuentre ofertada con el doble de su precio original y que no nos digan la especie que realmente es.

Para la detección de adulteraciones se utilizó la técnica de PCR que permite identificar de forma simultánea varias dianas de DNA con ventajas de rendimiento y reducción de costos en la detección.

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante el protocolo de Sambrook, J., y Russel, D., 2001, la cuantificación de estas muestras se realizó en un espectrofotómetro, los primers y las condiciones del programa para la PCR en el termociclador fueron tomadas de lo reportado por Matsunaga, T., y col., 1999, con ciertas adecuaciones y fueron corroborados en programas bioinformáticos, así como la identificación a través de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Se demostró que las muestras (7, 9 y 15) amplificaron para la especie de caballo, es decir a 439pb.



## INTRODUCCIÓN

La carne es una fuente importante de proteína animal en muchas regiones del mundo. El consumo promedio anual por persona se ha incrementado en más de 20kg en América Latina, el Caribe y el oriente de Asia. Por otro lado el consumo de carne se elevó, aproximadamente a 90kg por año, en América del Norte y en la mayoría de los países industrializados. La carne en sí comprende aproximadamente del 10-20% de la ingesta de energía en la mayoría de los países donde se consume (Valsta, L., y col., 2005).

La antropología ha previsto reconocidamente la importancia de los alimentos y las variaciones de la dieta entre los periodos de tiempo. Es posible resumir el perfil de consumo de carne durante la evolución humana en cuatro periodos: el primero podría caracterizarse por una caza oportunista, mientras en el segundo, la caza había crecido a una escala más grande y duradera de entre 2 a 3 millones de años; en el tercer periodo, los hombres comenzaron a domesticar animales y plantas, comenzado hace 10,000 años; durante el cuarto y último periodo estudiado se determinó que la carne contenía componentes que podrían aumentar el riesgo de enfermedades (Cardoso, P. P. M., y Baltazar, V. A. F., 2013).

Hoy en día, la carne sigue siendo un alimento fundamental para el correcto desarrollo del organismo y forma parte del plato del buen comer por su alta calidad nutritiva. Aporta principalmente macronutrientes como las proteínas de alto valor biológico (miosina, actina, mioglobina, colágeno y elastina), vitaminas, en especial del grupo B, tiamina (B1), niacina (B3), riboflavina (B2), piridoxina (B6) y cianocobalamina (B12), además de vitamina A. La carne contiene algunos nutrimentos inorgánicos como hierro, cobre, zinc, selenio entre otros minerales. Al hierro que contiene la carne se le caracteriza por tener una biodisponibilidad alta (es más fácil de integrar al cuerpo). Está demostrado que una de las bondades de la carne es que su consumo aumenta la absorción de hierro de alimentos vegetales de dos a cuatro veces. Este efecto de mejoramiento es conocido con el nombre de "factor de la carne." La carne tiene también ácidos grasos, que al igual que las proteínas son necesarios para la vida (Consejo Mexicano de la Carne, 2011).



## *Ingeniería en alimentos*

Por ello, un número de enfoques se han tomado a fin de explotar el contenido de DNA residual de productos cárnicos frescos o procesados con los fines de especificación y autenticación. La mayoría de los primeros métodos se basan en la hibridación de pruebas específicas, pero el objetivo de la amplificación de especies-específicas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado tener mayor sensibilidad y ser una técnica rápida. Siendo específico o conservando los pares de primers de oligonucleótidos, secuencias en DNA mitocondrial o genómico que han sido amplificadas para distintas especies, que enseguida pueden ser discriminadas por tamaño, secuenciación, digestión de la enzima de restricción (descomposición de amplificación de sitios polimórficos, CAPS) o de un único polimorfismo conformacional de cadena (SSCP) analizado (Hopwood, A. J., y col., 1999).

Alternativamente, basados en primers no específicos o en secuencias de oligonucleótidos breves se han amplificado simultáneamente numerosas secuencias no identificadas, que conducen a patrones reproducibles de productos de la PCR después de una electroforesis en gel (Hopwood, A. J., y col., 1999).

Algunos, pero no todos, de los métodos anteriores pueden ser utilizados para identificar más de una especie en un producto de carne o pescado, en unos pocos casos que dan una medida cuantitativa de la extensión de adulteración (Hopwood, A. J., y col., 1999).



## **CAPÍTULO 1: GENERALIDADES DE LA CARNE**

La carne sigue siendo un grupo importante de alimentos en la dieta de muchos consumidores, sobre todo en el mundo desarrollado. Muchos factores tales como la riqueza, el volumen de la producción ganadera y la situación socioeconómica de los consumidores podrían explicar el elevado consumo de la carne en las poblaciones occidentales (McAfee, A. J., y col., 2010).

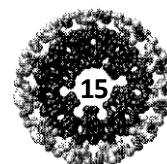
La carne es el producto pecuario de mayor valor. Posee proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos. Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alta calidad, que contienen todos los aminoácidos esenciales, así como de sus minerales y vitaminas de elevada biodisponibilidad. Mientras que el Codex Alimentarius define a la carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin” (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).

Las fuentes más frecuentes de suministro de carne son las especies de animales domésticos como el ganado vacuno, los cerdos y las aves de corral y, en menor medida, los búfalos, ovejas y cabras. En algunas regiones se consume también carne de otras especies animales como los camellos, yaks, caballos, avestruces y animales de caza (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).

### **1.1 Composición química**

#### **1.1.1 Agua**

Es el medio fluido del organismo y, en parte, se asocia a las estructuras celulares, especialmente, a las moléculas proteicas coloidales. El agua sirve de medio de transporte de nutrientes, metabolitos, hormonas y productos de deshecho por todo el cuerpo. También es el medio en el que ocurren la mayoría de las reacciones químicas y de los procesos metabólicos del organismo (Forrest, J. C., 1979).







### 1.1.2 Contenido de proteína en la carne y valor proteico

El rol de la carne, especialmente carne roja, es una fuente de proteína única. Sin embargo, el contenido de proteína en la carne puede variar substancialmente. El contenido medio de proteínas es de 22%, sin embargo este puede ser tan alto como con un 34.5% (pechuga de pollo) o tan baja con un 12.3% (carne de pato) (Cardoso, P. P. M., y Baltazar, V. A. F., 2013).

Adicionalmente, las proteínas de la carne se han distinguido por su contenido de aminoácidos esenciales. Hay ciento noventa aminoácidos conocidos aunque solamente veinte son necesarios para sintetizar proteínas. Dentro de estos veinte, ocho no pueden ser producidos por el cuerpo humano lo que los hace esenciales, por lo tanto tienen que ser suministrados por dieta. Además de su riqueza, la proteína de la carne se distingue en poseer todos los aminoácidos esenciales, sin limitación de estos como se presenta en la Tabla 1 (Cardoso, P. P. M., y Baltazar, V. A. F., 2013).

**Tabla 1 Aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales (Wu, G., 2009).**

<b>Aminoácidos esenciales</b>	<b>Aminoácidos no esenciales</b>
	Alanina
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Arginina
Lisina	Cisteína
Metionina	Ácido aspártico
Triptófano	Ácido glutámico
Treonina	Prolina
Valina	Histidina
Fenilalanina	Tirosina
	Serina
	Glicina



### **1.1.3 Lípidos**

El organismo animal contiene diversos tipos de lípidos, si bien predominan los *lípidos neutros* (ácidos grasos y glicéridos). De los distintos lípidos orgánicos algunos sirven de fuente de energía celular, otros contribuyen a la estructura y funcionalidad de la membrana celular, y todavía existen otros que, como algunas hormonas y vitaminas, están implicados en funciones metabólicas. La mayoría de los lípidos del organismo se presentan en los diversos depósitos grasos en forma de *triglicéridos*, es decir, ésteres de glicerina y ácidos grasos de cadena larga (Forrest, J. C., 1979).

### **1.1.4 Carbohidratos**

El organismo animal es una fuente pobre de carbohidratos, pero la mayoría de los existentes se localizan en los músculos y en el hígado. El más abundante, el *glucógeno*, alcanza en el hígado un porcentaje del 2 al 18% en peso de este órgano fresco y en el músculo generalmente sólo existen cantidades muy pequeñas. Otros carbohidratos encontrados en el cuerpo animal son los intermediarios del metabolismo carbohidratado y los mucopolisacáridos de los tejidos conectivos. Aunque los carbohidratos constituyen una pequeña porción del peso corporal ejercen importantísimas funciones en el metabolismo energético y en los tejidos estructurales (Forrest, J. C., 1979).

### **1.1.5 Vitaminas y minerales**

La carne roja proporciona alrededor del 25% de la ingesta diaria recomendada de riboflavina, niacina, vitamina B6 y ácido pantoténico cada 100g y prácticamente dos tercios de los requerimientos diarios (DR) de vitamina B12 en la misma proporción. La carne también es una de las mejores fuentes de zinc, fósforo selenio y hierro. Los cortes magros proporcionan alrededor del 37% de selenio DR, el 26% de zinc DR y 20% de potasio DR en una porción de 100g (Cardoso, P. P. M., y Baltazar, V. A. F., 2013).



## **1.2 Tecnologías de elaboración de la carne**

Las tecnologías de elaboración de la carne son una serie de técnicas y procedimientos utilizados en la fabricación de productos cárnicos elaborados. La elaboración de la carne aprovecha al máximo la carne y subproductos de la matanza. Las mezclas de carne que contienen recortes de carne de calidad inferior e ingredientes adicionales no cárnicos son una valiosa fuente de proteínas de origen animal en las dietas. Los tejidos animales, la carne del músculo y la grasa son los ingredientes principales. En ocasiones se usan otros tejidos como vísceras, piel y sangre, los cuales se complementan con ingredientes de origen vegetal (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).

Todos los productos cárnicos elaborados presentes en el mercado han sido tratados física y/o químicamente. Estos tratamientos van más allá del simple despiece de la carne en cortes o piezas de carne y su posterior preparación como platos de carne cocinada. La moderna elaboración de la carne incluye una serie de métodos de tratamiento físico y químico. Si bien puede utilizarse uno solo, en general se usa una combinación de varios métodos, tales como (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012):

- ❖ Despiece, triturado y picado
- ❖ Mezclado y volteado
- ❖ Salazón y curado
- ❖ Salazón y aplicación de ingredientes no cárnicos
- ❖ Embutido de tripas u otras fundas similares con mezclas de carne de relleno
- ❖ Secado y fermentación
- ❖ Ahumado en caliente o en frío
- ❖ Tratamiento térmico (pasteurización, esterilización)



### **1.3 Derivados cárnicos**

A lo largo del tiempo se han ido desarrollando en todo el mundo una enorme variedad de productos cárnicos elaborados o semielaborados con diferentes características gustativas. En algunas regiones existen cientos de productos cárnicos distintos, con nombres y sabores diferentes. Pese a la diversidad de formas y sabores, muchos de estos productos usan tecnologías de elaboración similares. Estos productos pueden clasificarse como sigue (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012):

#### **1.3.1 Productos cárnicos procesados crudos**

Estos productos consisten en carne cruda y tejido adiposo a los que se añaden especias, sal común y, a veces, aglutinantes. En los productos a bajo costo se añaden diluyentes o relleno para aumentar el volumen. Los productos se comercializan como productos cárnicos crudos, si bien para resultar apetitosos han de someterse a fritura o cocción antes de su consumo. Si las mezclas de carne fresca se embuten en tripas, el producto se conoce como salchicha. Si es habitual otra distribución, los productos se conocen como hamburguesa o como kebab. Algunos productos crudos típicos son: merguez, longaniza, bratwurst, embutido para el desayuno, hamburguesa o souvlaki (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).

#### **1.3.2 Productos cárnicos curados**

En estos productos se usan las partes del músculo. Pueden subdividirse en carnes curadas crudas y carnes curadas cocidas. El proceso de curado es similar para ambos tipos. La carne se trata aplicando pequeñas cantidades de sal bien por vía seca, bien inyectando la carne y/o sumergiéndola en una solución salina. Las carnes curadas crudas son productos sometidos a curación, secado, fermentación y maduración sin tratamiento térmico posterior. Generalmente se consumen crudos. Productos típicos de este grupo son el jamón serrano o el jamón de Parma. Las carnes curadas cocidas se someten siempre a tratamiento térmico después de un breve proceso de curación a fin de obtener la palatabilidad deseada.



## *Ingeniería en alimentos*

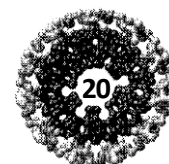
Productos típicos de este grupo es el jamón de York o el jamón tipo Virginia (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).

### **1.3.3 Productos cárnicos crudos – cocidos**

En este grupo de productos, la carne del músculo, la grasa y otros ingredientes no cárnicos se elaboran primero mediante triturado, picado y mezclado. Se obtiene así una masa viscosa, que se distribuye en salchichas o en forma de barras y se somete después a tratamiento térmico, lo que da como resultado la coagulación de las proteínas, una textura firme y elástica, palatabilidad y un cierto grado de estabilidad bacteriana. Las salchichas suelen someterse a un proceso de cocción o a un baño de vapor y, cuando están embutidas en tripas permeables, también a un proceso de ahumado en caliente. Las barras generalmente se hornean. Productos típicos de este grupo son la mortadela, los perritos calientes, las salchichas de Frankfurt, las salchichas de Viena y las albóndigas o pasteles de carne (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).

### **1.3.4 Productos cárnicos precocinados – cocinados**

Estos productos pueden contener mezclas de recortes de músculo de calidad inferior, tejidos adiposos, carne de la cabeza y piel del animal, hígado y otras partes comestibles. En general, el proceso de fabricación comprende dos fases de tratamiento térmico. La primera fase consiste en el precocinado de los materiales cárnicos crudos y la segunda en la cocción de la mezcla resultante final. Los productos cárnicos precocinados-cocinados son los que hacen uso de la mayor variedad de carnes, subproductos animales e ingredientes no cárnicos. Productos típicos de este grupo son los patés de hígado, las morcillas y carne tipo corned beef (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).





### **1.3.5 Embutidos crudos – fermentados**

Los embutidos crudos-fermentados consisten en una masa de carnes magras y tejidos adiposos mezclada con sal de curado, azúcares, especias y otros ingredientes no cárnicos, que suele embutirse en tripas. Su sabor, textura y color característicos se deben a la fermentación unida a la reducción de la humedad. Los productos finales no se someten a tratamiento térmico y se distribuyen y consumen crudos. Productos típicos de este grupo son el chorizo y las salchichas de verano tipo salami (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).

### **1.3.6 Productos cárnicos secos**

Estos productos son el resultado de la simple deshidratación de carne magra. Su elaboración se basa en la experiencia de que la carne no se deteriora fácilmente cuando una parte sustancial del fluido tisular evapora. Las piezas de carne magra se cortan en su mayor parte dándoles una forma uniforme determinada, lo que permite una deshidratación gradual e idéntica de todas las partidas. La carne seca tiene una vida útil significativamente más larga que la carne fresca. El valor nutricional del contenido en proteínas permanece inalterado. Productos típicos de este grupo son las tiras de carne como el jerky o el biltong, el charqui o la pastirma (Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, 2012).

## **1.4 Carne de caballo**

El caballo (*Equus caballus*) es un mamífero herbívoro, perisodáctilo, que pertenece a la familia de los équidos. A la hembra se le llama yegua y a las crías, potros o potrillos si son machos y potrancas si son hembras. La cría y utilización del caballo por parte del hombre se conoce como ganadería equina o caballar, y su domesticación se remonta 9,000 años atrás en la península arábiga (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, 2012).



## *Ingeniería en alimentos*

Los caballos ancestralmente fueron cazados evidentemente para proporcionar carne a los seres humanos en la prehistoria. Desde tiempos históricos, el consumo de la carne de caballo por las personas ha variado con las diferentes economías y culturas de las sociedades humanas. Así, la leche y la carne de las manadas de caballos esenciales para el transporte han sido y son importante en la dieta de los pueblos nómadas de la estepa euroasiática; pero el consumo de la carne de caballo en Europa Occidental fue por mucho tiempo restringida, en parte porque comerla era asociado con algunos ritos paganos o festivales. Sin embargo, incluso en las sociedades donde la carne de caballo no se considera como un alimento adecuado para los seres humanos, las personas pueden consumir la carne en considerables cantidades, a sabiendas o no (Gill, C., 2005).

El consumo de carne de caballo se denomina hipofagia, y el hombre la practica desde mucho tiempo antes de aprender a utilizarlo como cabalgadura. El consumo estuvo muy extendido en Egipto, Grecia, Rumania, Francia, Alemania, China, Mongolia, Medio Oriente y muchos países africanos. La aparición del cristianismo impuso fuertes restricciones, en virtud de que la Biblia sólo permite comer carne de animales con pezuña. Así, durante los primeros siglos de la era cristiana en gran parte de Europa fueron excluidos de la dieta el caballo, el mulo y el asno. Actualmente el consumo de carne de caballo se mantiene en muchos países europeos, especialmente Francia, Italia, Alemania, Inglaterra y Bélgica; así como en Estados Unidos y Japón (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, 2012).

Entre las características organolépticas de la carne de caballo podemos mencionar su bajo contenido de grasa, como se puede observar en la Tabla 2, un elevado porcentaje de ácido oleico que determina su alta digestibilidad y su alto contenido de glucógeno, que le otorga un sabor dulce. El color de la carne es rojo oscuro, principalmente en animales adultos, debido a su alto contenido de mioglobina. Se le considera una carne saludable debido a su elevado contenido de hierro y de proteínas de alto valor biológico. Es considerada la más tierna de las carnes de consumo y su olor particular se debe al contenido de ácidos grasos volátiles (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, 2012).





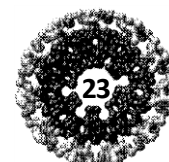
## Ingeniería en alimentos

La carne de caballo se exporta de otras regiones, principalmente a Europa Occidental. Sólo cuatro países de Europa Occidental y Japón importan más de diez mil toneladas de carne cada año. La carne de caballo es considerada como un alimento humano en todos los países y al parecer la mayor parte de la carne de caballo es importada y destinada para consumo humano (Gill, C., 2005).

**Tabla 2 Fracción principal y contenidos en 100g de una porción comestible.**

Componente	Caballo	Vacuno	Cerdo	Avestruz	Pavo	Pollo	Cordero
Energía (kcal)	107 – 121	129 – 150	151	104	160	112 – 124	121 – 216
Humedad (%)	73 – 75	53 – 74	52 – 74	76	70	75	58 – 68
Proteínas (g)	21 -23	15-21	14-20	18	21	20-22	15-20
Colesterol (mg)	20	65	60	38	68	78	70
Grasa (g)	1 -3	13-28	23-32	2	8	11	16-26

Fuente: FAO 2000; USDA, Febrero 1997 (Depto. de Agricultura de EE.UU.); Horse and Ostrich Meat, 2000; DISTRIVA, 2000; Horsemeat as Precious Nutrition, 2000.

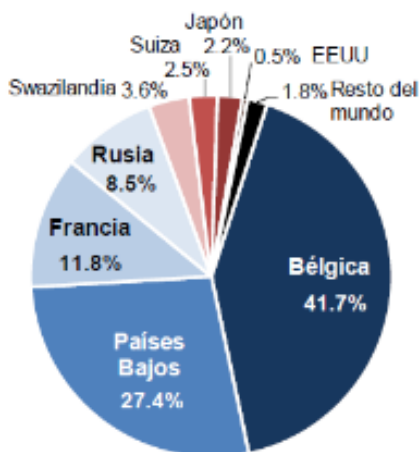






### 1.5 La carne de caballo en México

Anualmente México obtiene 60 millones de dólares por exportaciones de carne de caballo en cortes finos a Europa, principalmente Bélgica, Holanda, Italia y Francia, ubicándose como el segundo exportador mundial de este alimento después de China, como lo muestra la Figura 1. Anualmente se sacrifican en promedio 40 mil equinos para la comercialización de la carne, misma que se procesa principalmente en el rastro Tipo Inspección Federal (TIF) ubicado en el municipio de Jerez, Zacatecas (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2011).



Fuente: INEGI y Secretaría de Economía.

**Figura 1 Principales destinos de las exportaciones de carne de caballo entre 2008-2010.**

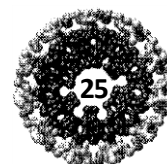
Por ejemplo, en México se creyó al parecer que la “carne de caballo rara vez se utiliza para el consumo humano” sin embargo, el país produce unas 70,000 toneladas por año y pequeñas exportaciones. Cuales quiera que sean las cantidades de la disposición de la carne de caballo que se consumen por los seres humanos y animales, las estadísticas muestran que la carne que se produce más en un país es la que se consume (Gill, C., 2005).



## *Ingeniería en alimentos*

La carne de caballo procesada en instalaciones de rastros TIF de varias entidades del país, continúa como un producto de gran prestigio en mercados internacionales muy exigentes. El volumen acumulado de este tipo de carne para el mercado de exportación supone anualmente el sacrificio de 100 mil animales. Las plantas TIF más importantes en la matanza de los caballos para los cortes de exportación se concentran en el occidente del país y concretamente en las ciudades de Aguascalientes, además de Jerez y Fresnillo, en el estado de Zacatecas. Entre los principales mercados destinos para la exportación de la carne de los équidos, figuran Bélgica y Francia, lugares en donde existe una demanda permanente para este producto y destinado a la elaboración de diversos platillos. Este panorama no existía en el pasado, donde este tipo de carne no contaba con un sistema de trazabilidad acorde a las exigencias de la Organización Mundial del Comercio (OMC) y especialmente de la Unión Europea (UE), principal destino de la misma. Por ello el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica) optó por hacer una prueba piloto sobre la trazabilidad de la carne de caballo, contando para ello con el apoyo del Proyecto de Facilitación del Tratado de Libre Comercio entre México y la Unión Europea (PROTLCUEM) (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2011).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el precio de la carne de caballo en México fue en 2009 de 1,577.2 dólares por tonelada, mientras que los precios futuros de los bovinos en pie y los cortes de bovino se han incrementado en 61% y 67%, respectivamente entre el cierre de febrero de 2009 y mediados de febrero del año 2012. Ubicándose actualmente en 2,858 y 3,457 dólares por tonelada, respectivamente. Tanto que entre el cierre de octubre de 2010 y junio de 2011 se observa un incremento importante del precio futuro de porcino en pie en la Bolsa de Chicago, de cerca de 41%, ubicándose en 2,054.1 dólares por tonelada al cierre de junio, por lo que se puede suponer que es rentable utilizarlo como sustituto o en mezcla de diversos productos que poseen carne de especies más caras como lo son las de bovino y así disminuir costos de producción, trayendo beneficios económicos (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, 2012).





## **1.6 Adulteraciones en productos a base de carne**

En la cadena de la carne, un gran número de factores de pre- y post-mortem influye en las propiedades intrínsecas de la carne. Por ejemplo, en las exportaciones, las múltiples interacciones entre la alimentación de los animales, la raza y la edad entre otros, son factores que están relacionados con la calidad intrínseca de la carne. Con respecto a los demás aspectos relacionados con la producción animal, por ejemplo, la región de origen, que no son perceptibles por señales intrínsecas, la calidad puede ser denotada por señales extrínsecas, por ejemplo, el etiquetado (Sepúlveda, W. S., y col., 2011).

Hoy en día, muchos consumidores están preocupados por la carne que comen, y el etiquetado preciso es importante informando la elección del consumidor. La elección de uno u otro producto puede reflejar aspectos de estilo de vida (por ejemplo, vegetarianismo y los alimentos orgánicos), la religión (por ejemplo, ausencia de carne de cerdo en algunas dietas), la dieta y la salud (por ejemplo, ausencia de alérgenos). Además el preciso etiquetado es importante para apoyar el comercio justo. Informar adicionalmente en etiquetas descriptivas se puede añadir como una consecuencia de marca, con fines de comercialización de productos y los reglamentos. Mientras que la normativa consagrada en la legislación nacional e internacional sustenta información de la etiqueta obligatoria, por desgracia, los reglamentos no son suficientes para prevenir el fraude alimentario. Para garantizar el cumplimiento de reglamentos y hacer cumplir las medidas punitivas en caso necesario, se requieren pruebas analíticas robustas. La prevalencia de fraude en carne hoy en día es difícil de medir (Ballin, N., 2010).

En caso de problemas con la simplicidad de autenticación, respecto a la carne y sus productos se agrupan dentro de cuatro grandes categorías: origen de la carne, la sustitución de la carne, el tratamiento de procesado de la carne y sin carne adición de ingredientes (Ballin, N., 2010).



## **1.7 Etiquetado de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-213-SSA1-2002)**

### **Generales**

Cuando en las etiquetas se declaren u ostenten en forma escrita, gráfica o descriptiva que los productos, su uso, ingredientes o cualquier otra característica, están recomendados, respaldados o aceptados por centros de investigación, asociaciones, entre otros, los cuales deberán contar con reconocimiento nacional o internacional de su experiencia y estar calificados para dar opinión sobre la información declarada. Se deberá contar con el sustento técnico respectivo, el que estará a la disposición de la Secretaria en el momento que lo solicite. Dichas declaraciones deben sujetarse a lo siguiente (NOM-213-SSA1-2002):

- La leyenda debe describir claramente la característica referida
- Estar precedida por el símbolo o nombre del organismo
- Figurar con caracteres claros y fácilmente legibles

### **Específicas**

Cuando se trate de productos con modificaciones en su composición, referentes a menor contenido de sodio, grasa, grasa saturada, colesterol, calorías o adionados, deben ostentar las denominaciones establecidas en la NOM-086-SSA1-1994. En el caso de que el producto haya sido objeto de algún tipo de tratamiento, se puede indicar el nombre de éste (NOM-213-SSA1-2002).

### **Lista de ingredientes**

En la lista de ingredientes debe emplearse el nombre específico de los mismos, incluyendo la especie o especies. Los aditivos empleados en la elaboración de los productos objeto de esta Norma, deben reportarse con el nombre común o los sinónimos establecidos en el Acuerdo y sus modificaciones, a excepción de los saborizantes, los cuales pueden figurar con la denominación genérica (NOM-213-SSA1-2002).



## **Productos empacados en punto de venta**

- Nombre o denominación del producto
- Declaración de contenido
- Fecha de envasado y en su caso, de caducidad
- Cualquier indicador que permita la rastreabilidad del producto, si no está considerado en los datos del punto anterior

### **1.8 Técnicas de autenticación de especies**

Para identificar la especie de la que proceden determinados productos de origen animal, tradicionalmente se han venido estudiando proteínas, ya fuese mediante la electroforesis de proteínas solubles, la separación mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), y/o métodos inmunoenzimáticos. Sin embargo, con los tratamientos culinarios de rutina empleados en la preparación de los alimentos, las proteínas se desnaturalizan, lo que no ocurre con la molécula de DNA, dado que es más estable a tales tratamientos (calor, salado, ahumado, etc.), ya que no es degradada en la cadena de producción de los alimentos y más termoestable que las proteínas (Aranguren, M. J., y col., 2009).

En la actualidad, estas técnicas convencionales han sido desplazadas por el uso de metodologías mediante el estudio de DNA, la cual permite determinar de manera más exacta el origen y la identificación de todos los productos que llegan al consumidor aunque ya estén procesados. Debido a que dicha información genética se encuentra en todas las células nucleadas de cualquier tejido o fluido del animal (sangre, pelo o fibra, músculo, leche, entre otros) y lo más resaltante es que, la información del DNA permanece invariable a lo largo de la vida del animal y tras su sacrificio (Aranguren Méndez, y otros, 2009).



Los codones que codifican un aminoácido pueden diferir en alguna de sus tres posiciones, dando ventaja en la identificación de diferentes especies se puede hacer únicamente con el análisis del DNA. Además cuando se compara con el método de proteínas, el DNA tiene una mayor estabilidad térmica, está presente en todas las células y permite obtener información idéntica del mismo animal, independientemente del origen del tejido, (Ballin, Vogensen, & Karlsson, 2009).

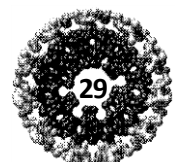
### **1.8.1 El DNA**

EL DNA es un polinucleótido de doble cadena cuya misión es conservar la información genética, especificando la secuencia de aminoácidos de todas y cada una de las proteínas celulares. En su composición entran a formar parte: Nucleótidos de bases púricas (Adenina y Guanina) y pirimidínicas (Citosina y Timina), en los que la pentosa es la desoxirribosa, diferente de la ribosa por carecer de oxígeno en el carbono 2', lo que contribuye a una mayor estabilidad en la cadena. La presencia de Timina y no de Uracilo en el DNA, junto con la desoxirribosa constituyen las principales diferencias de composición con respecto a RNA (Teijón, R. J. M., y Garrido, P. A., 2005).

### **1.8.2 DNA mitocondrial**

El DNA mitocondrial ha sido utilizado ampliamente como un marcador de especies, en particular la región 12s RNAr, dado que cumple una serie de requisitos para identificación. Esta región posee una longitud aceptable, suficiente diferenciación entre especies congénicas o próximas, además que acumula puntos de mutación interesantes que originan cambios puntuales capaces de diferenciar géneros o especies, ideal para este tipo de estudios (Aranguren, M. J., y col., 2009).

Las mitocondrias humanas contienen un genoma circular de aproximadamente 17,000 pares de bases. Los genes mitocondriales codifican algunas de las proteínas asociadas con la cadena de transporte de electrones. Esto desempeña un papel importante en el tipado de DNA debido a su patrón hereditario y a su alta tasa de mutación (Kreuzer, H., y Massey, A., 2004).







Se denomina temperatura de fusión,  $T_m$ , a lo que provoca, en una disolución de DNA, la desnaturalización de la mitad de la doble cadena, proceso que puede seguirse, midiendo el incremento de absorbancia que tiene lugar (efecto hipercrómico), a medida que van desapareándose bases. No todas las moléculas de DNA experimentan el fenómeno de la desnaturalización de igual manera, por el contrario, depende de la composición de bases. Las cadenas con una alta proporción de pares G-C muestran una temperatura de fusión más elevada que las que poseen proporciones inferiores. La temperatura de fusión de DNA, en la mayoría de la especies, varía linealmente entre  $70^{\circ}$ - $100^{\circ}$ , cuando la proporción de G-C sobre el total de nucleótidos aumenta entre el 20%-80%. La explicación a este comportamiento se encuentra en la mayor estabilidad de las uniones G-C con tres puentes de hidrógeno, frente a las de A-T que poseen dos. De ello se deduce que las regiones en la cadena de DNA, ricas en pares A-T, son las primeras en desnaturalizarse. Estos fenómenos de separación de filamentos tienen lugar, en las células vivas, durante los fenómenos de transcripción o replicación del DNA y su iniciación debe coincidir con secuencias ricas en pares A-T (Teijón, R. J. M., y Garrido, P. A., 2005).

#### **1.8.4 Hibridación de DNA**

Cuando la temperatura desciende por debajo de la de fusión, las hebras de DNA desnaturalizadas tienen la oportunidad de aparearse nuevamente. Este fenómeno, conocido como hibridación o annealing, reproduce la cadena original intacta y tiene lugar rápidamente cuando la desnaturalización no es completa, permaneciendo, como mínimo, un segmento de algo más de una docena de nucleótidos del dúplex original. Cuando la desnaturalización es completa la hibridación tiene lugar en dos fases, una primera muy lenta que forma al azar un fragmento corto en doble hélice y, posteriormente, una segunda fase más rápida de apareamiento a partir del fragmento inicial, reproduciendo finalmente la doble cadena completa (Teijón, R. J. M., y Garrido, P. A., 2005).





La formación de dúplex híbridos de DNA entre especies distintas, pone de manifiesto la universalidad del mecanismo de expresión genética, pero, además, evidencia el parentesco más o menos próximo entre los seres vivos, como expresión clara del proceso de evolución (Teijón, R. J. M., y Garrido, P. A., 2005).

#### **1.8.5 Secuenciación de DNA**

En el método de Sanger, la secuenciación identifica a la cadena complementaria del fragmento de DNA a estudiar. Se basa en la obtención de una hebra complementaria de DNA, utilizando como molde el filamento a secuenciar. En este método se utiliza enzima DNA-polimerasa para la síntesis de DNA. Las DNA-polimerasas son las enzimas encargadas de la replicación y reparación de DNA, elongando la cadena de un oligonucleótido que actúa como cebador, siguiendo la complementaridad de una hebra que representa el molde a copiar, añadiendo nucleótidos al extremo 3' del cebador, en dirección 5' del molde, para lo cual debe disponer de los diferentes nucleótidos trifosfato (Teijón, R. J. M., y Garrido, P. A., 2005).

#### **1.8.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

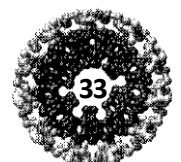
La PCR es un procedimiento muy inteligente que aprovecha enzimas DNA-polimerasas y oligonucleótidos sintéticos para hacer copias de un segmento específico de DNA, como se observa en la Figura 3. De manera breve, se diseñan dos cebadores o primers que hibridan con hebras opuestas de una molécula de DNA en los extremos del segmento que se desea copiar. La DNA polimerasa copiará las dos hebras comenzando desde los cebadores. Debido a que la mezcla de reacción contiene cebadores complementarios a ambas cadenas de DNA, los productos de la síntesis de DNA pueden a su vez ser copiados con el cebador complementario. La PCR es una reacción en cadena que origina miles de millones de copias de una secuencia dada de DNA. Es utilizada para amplificar DNA para clonar, detectar DNA que se encuentra en mínimas cantidades, y diferenciar muestras de DNA distintas (Kreuzer, H., y Massey, A., 2004).



## *Ingeniería en alimentos*

Su desarrollo se debe a Kary Mullis, en 1984, quién de una forma sencilla ideó un proceso repetitivo para la duplicación de moléculas de DNA previamente seleccionadas, multiplicando las cadenas existentes en cada ciclo, lo que permitía la obtención de cantidades considerables del fragmento designado (más de 100 de millones en pocas horas), partiendo de porciones iniciales minúsculas, incluso de una sola molécula (Teijón, R. J. M., y Garrido, P. A., 2005).

Lo original del método es la utilización de dos oligonucleótidos que actúan como cebadores, situados en las proximidades de la secuencia diana que se quiere amplificar, en cada una de las hebras complementarias, las cuales han sido previamente separadas. Así, cada filamento completa el resto de la cadena, a partir del cebador, gracias a la acción de la DNA-polimerasa. Se inicia cada ciclo con la separación de los filamentos de DNA por calentamiento; seguidamente se añaden los oligonucleótidos cebadores, diseñados para que se sitúen en posiciones de adyacentes a la secuencia que se quiere amplificar, y se enfría para permitir que éstos se acoplen adecuadamente. A continuación, usando DNA-polimerasa termoestable y nucleótidos trifosfato, se completan los filamentos incorporándose los distintos nucleótidos a partir del extremo 3' del cebador, en dirección 5' del filamento molde. La repetición del ciclo multiplica exponencialmente las cadenas existentes, puesto que los nuevos filamentos formados son utilizados como moldes en los ciclos sucesivos, en razón de  $2^n$ , siendo n el número de interacciones ejecutadas (Teijón, R. J. M., y Garrido, P. A., 2005).



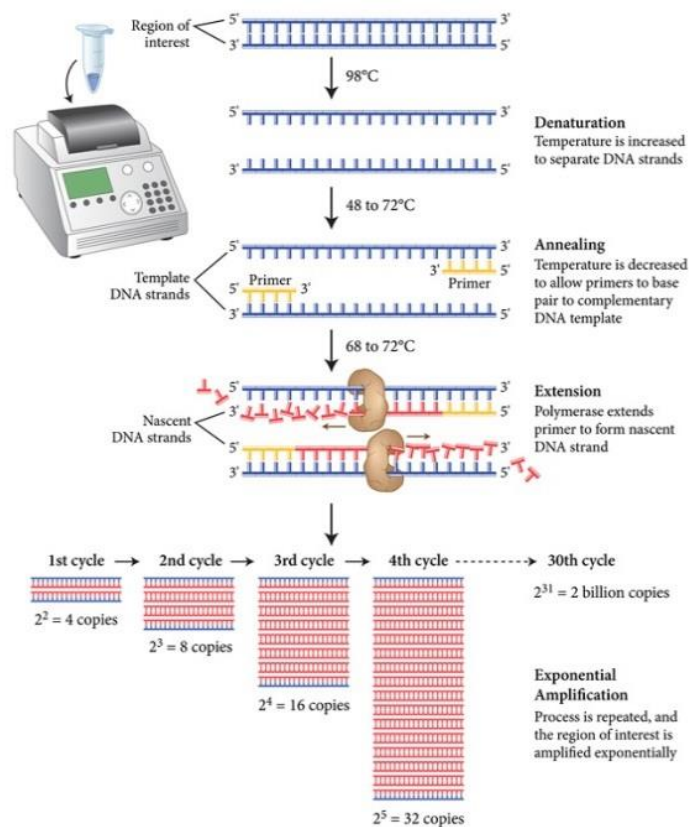


Figura 3 Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.

### 1.8.7 Electroforesis

La electroforesis en gel, en donde la fase dispersa contiene como gel un polímero, es adoptado con frecuencia para analizar/separar biocoloides tales como proteínas y ácidos nucleicos (Hsu, J. P., y col., 2012).

Las moléculas de DNA (cargadas negativamente) migran en el campo eléctrico hacia el ánodo. Al pasar a través de la red de agarosa o acrilamida, se separan según su tamaño: las moléculas mayores se retienen más que las moléculas pequeñas y migran lentamente en el gel. La acrilamida tiene una capacidad separadora superior, sin embargo, dado su toxicidad su uso es más delicado (Tagu, D., y Moussard, C., 2006).



Para visualizar los fragmentos de DNA después de la electroforesis, el gel se sumerge en una solución que contiene bromuro de etidio. Esta molécula se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y emite fluorescencia roja-naranja cuando se excita con la luz ultravioleta. Una vez teñido, el gel se analiza bajo una lámpara U. V. y las moléculas de DNA unidas al bromuro de etidio se vuelven visibles. Dado que las distancias de migración son proporcionales al logaritmo del número de bases, se puede determinar el tamaño de los fragmentos de restricción comparando su movilidad electroforética con la de fragmentos de DNA de tamaño conocido (Tagu, D., y Moussard, C., 2006).

La fase líquida en una electroforesis convencional es una solución electrolítica acuosa, y las partículas son libres de migrar en todas las direcciones posibles. En contraste, la electroforesis en gel contiene una reticulación, una estructura polimérica tridimensional, y necesita partículas que migren a través de los poros de la estructura. Comparándola con la electroforesis convencional, la electroforesis en gel tiene las siguientes ventajas. Primero, debido a que el gel introducido presenta un elevado calor específico superior al del agua, los problemas asociados con el efecto de calentamiento Joule durante la electroforesis pueden ser aliviados. Después, la estructura formada por el gel sirve como un tamiz molecular, aumentando la estabilidad de la separación y, por lo tanto, una mejora en el análisis de la resolución, especialmente a entidades tales como proteínas y ácidos nucleicos. Por último, la presencia del gel retarda tanto el movimiento difusivo como el convectivo de especies iónicas, allí inmediatamente se da la mejora mediante el estrechamiento de las entidades (Hsu, J. P., y col., 2012).

La electroforesis es la técnica más ampliamente utilizada en biología molecular y en estudios bioquímicos de ácidos nucleicos. Además, es la base de muchas aplicaciones de tecnología de ácidos nucleicos para pruebas de diagnóstico biológico. El poder de la electroforesis como una herramienta analítica para DNA y el RNA es inherente a una alta densidad de carga uniforme de estas moléculas a través de intervalos de tamaños muy grandes con una buena resolución (Smith, C. L., 1991).



Un análisis típico de DNA por electroforesis comienza con separaciones sobre cualquiera de estos geles, agarosa o acrilamida. Los DNA de genomas simples pueden ser detectados por una tinción directa con bromuro de etidio, en la mayoría de los casos se requiere una especie de hibridación para centrarse sobre una fracción pequeña de la muestra de DNA total (Smith, C. L., 1991).

Las limitaciones de la tecnología de electroforesis en la corriente de ácidos nucleicos son que ofrece una resolución insuficiente, cubre un intervalo de rango de tamaño insuficiente del DNA, no permite una detección lo suficientemente sensible (Smith, C. L., 1991).

### **1.8.8 PCR múltiplex**

Hasta la fecha la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y en particular la PCR múltiplex, se utiliza a menudo para la identificación simultánea de varias dianas de DNA con las ventajas tales como el aumento del rendimiento y la reducción del costo en la detección (Kim, J. H., y col., 2013).

Como un método de alto rendimiento, la PCR multiplex podría simultáneamente amplificar la mezcla de DNA molde y disminuir el costo, conquistando el único inconveniente de la PCR que era detectar sólo una carne a la vez. Sin embargo, los únicos obstáculos para la aplicación y estandarización de la PCR múltiplex en pantalla de especies son la relativamente baja sensibilidad y la eficiencia de amplificación desigual de primers diferentes. En el análisis de alimentos procesados adicionales, la PCR múltiplex y la electroforesis pueden conducir a resultados negativos falsos porque el DNA es ampliamente degradado (Zhang, C., 2013).



### **1.8.9 Determinación de la autenticidad de los alimentos mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA)**

Los métodos genéticos son los más específicos y métodos sensibles para la autenticación de los componentes de los alimentos. Sin embargo, ellos requieren equipo de laboratorio costoso y cierto grado de especialización. Como una alternativa, los ensayos inmunológicos se pueden usar para reducir el tiempo de prueba y el costo. Entre estos últimos métodos, el Ensayo de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA, para abreviar) ha sido la técnica más ampliamente utilizada para efectos de regulación en la detección de autenticidad de alimentos debido a su especificidad, simplicidad y sensibilidad, entre otras ventajas (Asensio, L., y col., 2008).

En general, ELISA es una técnica inmunológica que consiste en una enzima (una enzima que cataliza una reacción bioquímica) para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra. Las dos variantes más utilizadas de ELISA para la autenticación de los alimentos son el indirecto y el sándwich. El ELISA indirecto utiliza dos anticuerpos, uno de los cuales es específico para el antígeno y el otro el cual está acoplado a una enzima. Este segundo anticuerpo proporciona al ensayo su nombre de “ligado a enzimas”, y será la causa de que un sustrato cromogénico o fluorogénico produzcan una señal. A veces, este segundo anticuerpo puede estar vinculado a una proteína tal como avidina o estreptavidina, si el anticuerpo primario está marcado con biotina. En el ELISA de tipo sándwich el antígeno está unido entre dos anticuerpos: el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección puede estar acoplado a una enzima o se puede unir el conjugado (anticuerpo ligado a enzima) que producirá la reacción bioquímica (Asensio, L., y col., 2008).



## CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1 Objetivo general

Emplear un estudio molecular que permita evaluar la presencia de carne de caballo en productos cárnicos comercializados en México, mediante la técnica de PCR.

#### 2.1.1 Objetivo particular 1

Seleccionar y corroborar secuencias reportadas de primers para la identificación de *Equus caballus*.

- Una vez seleccionada la secuencia con base en diferentes artículos, es necesario corroborar a través de NCBI que efectivamente la secuencia de primers corresponda a la especie de interés y que permita identificar la diana a amplificar.

#### 2.1.2 Objetivo particular 2

Establecer a partir de sangre de caballo un control positivo que permita la identificación de carne de caballo y definir las condiciones de PCR para su amplificación.

- Extracción de DNA total a partir de tejido o sangre de la especie de estudio, mediante el protocolo de Sambrook (2001).
- Determinar la pureza con una relación de absorbancia de 260/280nm y valor aproximado de 1.8, así como la concentración en ng/ $\mu$ L.
- Establecer las condiciones y aplicar una PCR tiempo final (desnaturalización, apareamiento y polimerización).
- Evaluar los productos de la PCR, mediante electroforesis en gel de agarosa.



### **2.1.3 Objetivo particular 3**

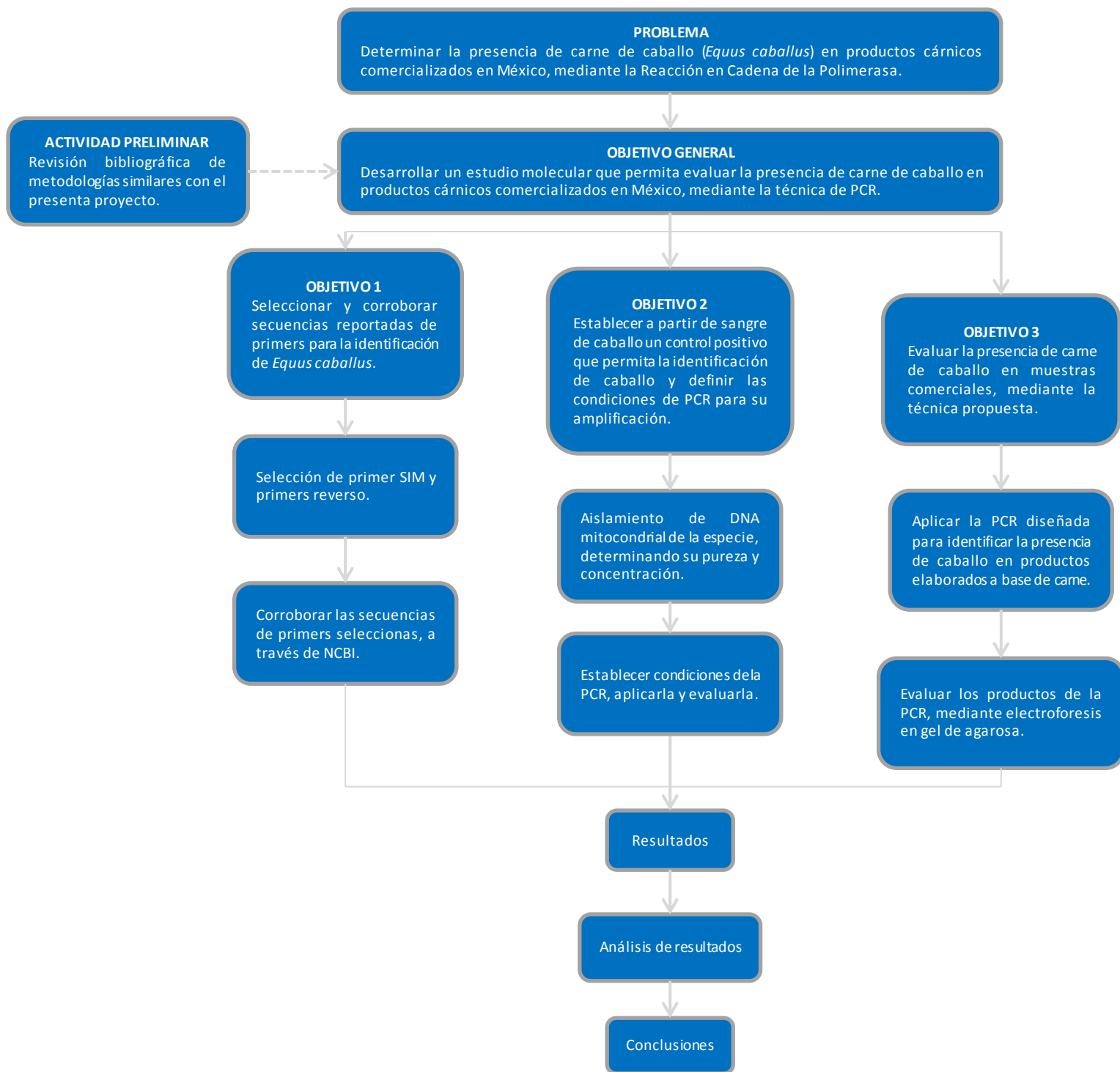
Evaluar la presencia de carne de caballo en muestras comerciales, mediante la técnica propuesta.

- Aplicar la PCR diseñada para identificar la presencia de caballo en productos elaborados a base de carne.
- Evaluar los productos de la PCR, mediante electroforesis en geles de agarosa.





## 2.2 Cuadro metodológico





## **2.3 Material biológico**

Para dar solución al problema, así como a los objetivos planteados, fue necesario contar con las siguientes muestras:

### **2.3.1 Muestra de sangre**

- Caballo (*Equus caballus*)

### **2.3.2 Muestras de productos frescos o bajo proceso**

1. Hamburguesa comercial
2. Bistec de res de Walmart
3. Bistec de res del mercado de Cuautitlán
4. Chilorio de cerdo procesado
5. Hamburguesa Burger King
6. Cecina de res de Walmart
7. Cecina de res de la Merced
8. Cecina de res de Yecapixtla
9. Bistec de res de la Merced
10. Tacos de cecina de res
11. Bistec de res, carnicería a
12. Bistec de res, carnicería b
13. Bistec de res, carnicería c
14. Bistec de res, carnicería d
15. Carne molida de res de Tlalnepantla

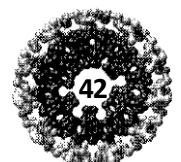


## **2.4 Extracción de DNA de las muestras a trabajar**

Para la extracción de DNA de las muestras objetivo, se empleó el protocolo clásico de Sambrook, J., y Russel, D., 2001. Este protocolo se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y una enzima proteinasa, extracción de proteínas y de polisacáridos mediante fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, seguido de la precipitación de DNA con etanol frío. Enseguida se muestra descrito el protocolo:

### **2.4.1 Disgregación del tejido**

- Primero se enjuagó el tejido con agua libre de nucleasas con ayuda de un purificador de agua, *Direct-Q 3 Millipore* sin que este sea tocado con las manos, por ello se deben usar guantes.
- Después se congeló una porción del tejido enjuagado en un congelador, *Revco*.
- A continuación se maceró el tejido congelado en un mortero con pistilo, hasta tener un polvo.
- Enseguida se pesó 0.125g de la muestra en un tubo eppendorf con ayuda de una balanza analítica, *Cole-Parmer PR 410*.
- Posteriormente se adicionó 1,250 $\mu$ L de solución lisis (Tris base 50mM, pH= 8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%).
- Entonces se agitó con ayuda del agitador, *Vortex-Genie K-550-G* hasta disolver completamente.
- Después se adicionó 7 $\mu$ L de la enzima proteinasa K, *Invitrogen* previamente concentrada a 20mg/mL.
- A continuación se incubaron los tubos eppendorf que ya poseen la muestra macerada de tejido, la solución lisis y la enzima proteinasa a 50°C en la incubadora, *Termomixer Compact Eppendorf* por un periodo de 2h a 300rpm.
- Posteriormente se inactivó la enzima en el mismo equipo del paso anterior manteniendo una temperatura de 60°C por 1h a 300rpm.





#### **2.4.2 Extracción de proteínas y polisacáridos**

- Enseguida se adicionó a la muestra, ya con la enzima inactiva 250µL de la mezcla fenol – cloroformo – alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1.
- Después se mezcló el tubo suavemente de forma manual.
- Posteriormente se centrifugó a 10,000rpm por 10 minutos en una microcentrífuga, *Mini Spin Plus Eppendorf*.
- Enseguida se observó una separación de fases, de la cual se recuperó la fase acuosa superior en la que está presente el DNA, evitando cualquiera de las otras fases.
- A continuación se trasladó la fase recuperada a 2 tubos eppendorf nuevos previamente esterilizados en esterilizador eléctrico de presión de vapor, *All American*.

#### **2.4.3 Precipitación de DNA**

- Primero se adicionó 1,000µL de etanol frío a cada uno de los tubos que contienen la fase de DNA recuperada.
- Después se mezcló el tubo suavemente de forma manual.
- Enseguida se centrifugó a 10,000rpm durante 10min.
- Se prosiguió a decantar el etanol y evaporar el restante a 37°C en la incubadora. El DNA se observó como una pastilla blanca pegada en el fondo del tubo.
- Posteriormente fue resuspendido el DNA, agregando 50µL de agua libre de nucleasas y se agitó suavemente hasta su completa disolución.
- Cuando la solución presenta partículas insolubles, se reintenta la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol – cloroformo – alcohol isoamílico, y se vuelve a precipitar con etanol frío.

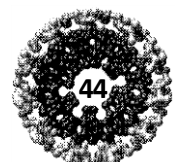


## **2.5 Cuantificación de DNA por medición de la absorbancia (260/280nm)**

Este método es útil para preparaciones de ácidos nucleicos altamente puros, pues se detecta cualquier compuesto que absorbe luz significativamente a 260nm. Lo cual incluye; DNA, RNA, EDTA y fenol. La relación de absorbancia a 260nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA y RNA con proteínas puesto que los aminoácidos aromáticos absorben luz a 280nm. En este caso, solo un nivel significativo de proteína en la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia de ambas longitudes de onda (Sambrook, J., y Russel, D., 2001).

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260nm y 280nm. La lectura de 260nm permite conocer la concentración de ácidos nucleicos que contiene la muestra analizada. La relación entre las lecturas a 260 y 280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tienen valores de 1.8, mientras que valores por encima de 2.0 muestran la existencia de preparaciones puras de RNA. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.7, entonces no es posible cuantificar el DNA presente en la muestra (Winder, F., y Beffa, R., 2000). Enseguida se describe el método:

- Fue necesario calibrar el nanoespectrofotómetro, *Accesolab* colocando 2 $\mu$ L de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo.
- Después se ingresó al programa *NanoDrop ND-1000 3.6.0* y se seleccionó la opción de ácidos nucleicos.
- Enseguida se colocó nuevamente 2 $\mu$ L de agua libre de nucleasas para registrarlo como blanco.
- Se corrió el programa.
- A continuación se colocó 2 $\mu$ L de la muestra de DNA a cuantificar y corrió el programa.
- La concentración de DNA debe ser aproximadamente de (60ng/ $\mu$ L) y la relación (260/280nm) de 1.8, son proporcionadas por el programa y deben ser registradas.
- Para finalizar se limpió adecuadamente el equipo.





## 2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los primers de la marca *Integrated DNA Technologies* y el tamaño del amplificado que a continuación se muestran fueron tomados de forma bibliográfica de Matsunaga, T., y col., 1999:

### Primers

- Primer SIM
  - (5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3')
  
- Primer reverso
  - Caballo (5'-CTCAGATTCACCTCGACGAGGGTAGTA-3')
  - *Amplificado de 439pb*

### 2.6.1 Preparación de la reacción

Es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes principales de la reacción (primers y DNA). Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 250nM, mientras que el DNA requiere una concentración baja puesto que, teóricamente, una sola copia de DNA debería ser suficiente para la adecuada amplificación, sin embargo, la extracción del DNA implica la colecta de millones de cadenas originales (Sánchez, M. A. E., 2011).

La preparación de las muestras se estandariza a 25µL de acuerdo con el protocolo que precisa *Promega* para el kit de PCR. Tal como se muestra en la Tabla 3:



Tabla 3 Componentes de la PCR

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
Mezcla master mix	12.5	1X
Primer frontal	0.25 - 2.5	0.1 – 1.0Mm
Primer reverso	1.25 – 2.5	0.1 – 1.0Mm
DNA	1 – 5	< 250ng
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar 25μL	N.A.

### 2.6.2 Etapas y ciclos de la reacción

El diseño de las condiciones a programar en el termociclador, *Apollo instrumentation ATC 401*, fueron tomadas bibliográficamente de acuerdo a lo reportado por Zhang, C., 2013, y se pueden observar en la Tabla 4:

Tabla 4 Etapas y condiciones programadas en el termociclador

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	94	3min
Etapa que se repite cíclicamente	94	30s
Etapa que se repite cíclicamente	60	30s
Etapa que se repite cíclicamente	72	30s
Etapa final	72	7min
Conservación del producto	4	∞

**35 ciclos de amplificación**



## 2.7 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis es una técnica bioquímica estándar para la separación de moléculas sobre la base del tamaño y la carga eléctrica. Hay diferentes tipos de electroforesis; para separar las moléculas de DNA se utiliza la electroforesis en gel. El gel es sometido a un paso de corriente, dado que el grupo fosfato de cada nucleótido de DNA posee una carga negativa, los fragmentos de DNA migran hacia el extremo positivo del gel y la movilidad de estos dependerá de su tamaño (Perera, J., 2002). El método fue el siguiente:

1. Pesar 0.75g de agarosa, *Invitrogen* y agregar 50mL de amortiguador Tris base, ácido acético y EDTA (TAE 1X) para preparar un gel al 1.5%.
2. Colocar en el microondas, *Mirage JMI-010* a baja temperatura, para disolver la agarosa evitando la ebullición.
3. Enfriar la solución de agarosa hasta alcanzar la temperatura ambiente.
4. Agregar una gota de Bromuro de Etidio, *Gene Choice* y homogeneizar de forma manual.
5. Transferir la solución de agar a la charola de electroforesis y colocar el peine.
6. Esperar a que el agar solidifique y retirar el peine.
7. Colocar la charola en la cámara de electroforesis, *Apollo instrumentation by CLP*.
8. Agregar a la cámara la cantidad necesaria de amortiguador TAE 1X, para cubrir el gel.
9. Colocar sobre Parafilm 5 $\mu$ L de la muestra, 3 $\mu$ L de azul de bromo fenol, y 3 $\mu$ L BrEt con ayuda de las micropipetas, *Rainin*.
10. Transferir la muestra homogeneizada a uno de los pozos del gel de agarosa.
11. Repetir los tres pasos anteriores con el resto de las muestras.
12. Encender la fuente de poder, *Bio-Rad Power Pac 1000* y programar la energía potencial eléctrica a 80V y dejar correr hasta que el azul de bromo fenol recorra 2/3 partes del gel.
13. Apagar la fuente de poder y retirar cuidadosamente el gel.





## **2.8 Análisis de los resultados de electroforesis**

La visualización de los resultados de los geles de electroforesis se llevó a cabo en un transiluminador de luz UV marca *Cleaver Scientific LTD*, la captura de estas imágenes se logra utilizando un equipo de fotografía para luz UV marca *Kodak digital science*. Estas condiciones son esenciales para la detección del Bromuro de Etidio intercalado en los fragmentos de DNA presentes en el gel, esto es debido a que la radiación UV es absorbida a 254nm por el DNA y transmitida al colorante, el cual unido por sí mismo absorbe la luz a 302nm y 366nm. En ambos casos, la energía es reemitida a 590nm en la región rojo-naranja del espectro visible.



## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de llevar a cabo cualquier tipo de experimentación, fue necesario hacer una revisión bibliográfica de varios artículos, libros y páginas web con relación al presente proyecto. Esta revisión sirvió para dar forma a la introducción, marco teórico, selección de primers y diseño del programa de la PCR para el termociclador.

### 3.1 Seleccionar y corroborar secuencias reportadas de primers para la identificación de *Equus caballus*.

Para corroborar primers tanto SIM, como el reverso del caballo, fue necesario usar programas bioinformáticos, verificando que efectivamente los primers publicados por Matsunaga, efectivamente pertenezcan a la especie de estudio de interés (*Equus caballus*) y a la zona de amplificación de la PCR que en este caso es el citocromo b, mediante el análisis de la secuencia de DNA mitocondrial (Matsunaga, T., y col., 1999).

Para corroborar la existencia de primers fue necesario utilizar la siguiente secuencia en el programa bioinformático **BLAST**.

Para ello se debe ingresar a la a la base de datos a través del buscador GOOGLE, escribiendo WebHome < MITOMAP < MITOWEB.

Enseguida, se selecciona la opción **Complete Mitochondrial Genome Sequences**:

MITOWEB  
MITOMAP MITOMASTER MITOWIKI

Search

MITOMAP  
Log In  
Register  
Reset Password

MITOMAP  
MITOMASTER  
MITOWIKI

Tools  
Help  
Search  
Feedback  
Index

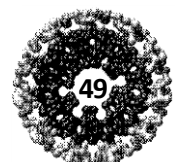
MITOMAP  
A human mitochondrial genome database  
A compendium of polymorphisms and mutations in human mitochondrial DNA

MITOMAP reports published and unpublished data on human mitochondrial DNA variation. Most of the data is hand-curated and, due to the massive volume of sequencing data being produced world wide, there is always a backlog of papers and data to be added. If you would like to fast-track inclusion of a paper and its data into MITOMAP, please email a pdf to [mitomap@email.chop.edu](mailto:mitomap@email.chop.edu). We appreciate your help. Thanks.

MITOMAP Quick Reference

- To search for point mutations, click [here](#). The info button on the search page has more information.
- The rCRS is GenBank number [NC\\_012920](#). Click [here](#) for details.

General References	Illustrations:
<a href="#">The Annotated Human Mitochondrial DNA Sequence</a>	<a href="#">View Figures</a>
<a href="#">The rCRS &amp; other mtDNAs</a>	-Mitochondrial DNA Map
<a href="#">Amino Acid Translation Tables</a>	-Eleven pathological mutations in tRNA
<a href="#">Mitochondrial References, ALL (very large file)</a> • <a href="#">A-L only</a> • <a href="#">M-Z only</a>	-Mitochondrial energetics
<a href="#">Haplogroup Markers &amp; Frequencies</a> • <a href="#">Simpler mtDNA Tree: Europe, Asia, Africa</a>	-Diabetes metabolism & the mitochondria
<a href="#">Mitochondrial DNA Function Locations (Gene Loci)</a>	-World migrations
<a href="#">Mitochondrial DNA Polypeptide Assignments</a>	-mtDNA Trees
<a href="#">Complete Mitochondrial Genome Sequences</a>	





Seleccionar nuevamente la opción Complete Mitochondrial Genomes, localizada al final de la nueva página a la que nos envió la opción anterior:

MITOWEB Search

MITOMAP

Log In Register Reset Password

MITOMAP MITOMASTER MITOWEB

Tools Help Search Feedback Index

### Complete Mitochondrial DNA Sequences

The revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) is GenBank number [NC\\_012920](#). Please use this new number when citing the rCRS in publications. The rCRS is a reference sequence, not a "consensus" sequence. It is a single reference individual from haplogroup H2a2 and has been used as a standard for reporting variants for over 30 years. View MITOMAP's fully annotated rCRS sequence [here](#).

The Cambridge Reference Sequence, revised & original:

Version	GenBank #	Fasta format	Article links
Revised Cambridge Reference Sequence ("rCRS") Two identical versions of the rCRS are available on Genbank. NC_012920, formerly AC_000021.2, is in Genbank's RefSeq database. It is the most commonly used rCRS and is the standard comparison sequence for human mtDNA research. For new publications, please cite NC_012920 as the rCRS. J01415.2 is a fully corrected update of the original Cambridge sequence and is identical to NC_012920.	NC_012920 gi:251631106	<a href="#">rCRS.fasta</a>	<a href="#">Andrews et al 1999</a> (PubMed) • <a href="#">Read the paper</a> (PDF) • <a href="#">Summary table</a> of corrections.
Original Cambridge Reference Sequence ("CRS")	J01415 gi:337168	<a href="#">CRS1981.fasta</a>	• <a href="#">Anderson et al 1981</a> (PubMed) • <a href="#">Read the paper</a> (PDF)

Other comparison *hmtDNAs* in GenBank & elsewhere:

African (Yoruba) Sequence [AF347016](#), formerly NC\_001807.4. This sequence has over 40 variant nucleotides from the rCRS.  
 African (Uganda) Sequence [U38112](#). This sequence has over 90 variant nucleotides from the rCRS.  
 Swedish Sequence [S03324](#). This sequence has over 30 variant nucleotides from the rCRS.  
 Japanese Sequence [AB265592](#). This sequence has over 50 variant nucleotides from the rCRS.  
 Root Sequence of [Bahar et al., 2010](#). This is an artificial sequence constructed for rooting phylogenetic trees, the "RSRS".

To find >17,000 complete human mtDNAs in GenBank: [execute search](#)  
 \*Includes sequences that are complete coding region but minus the control region (15400 nucleotides minimum).

To find >9,000 other complete eukaryote (non-human) mtDNA genomes in GenBank: [execute search](#).

Partial and full sequences are also available for *Homo sapiens neanderthalensis* and *Homo sp. Altai* mtDNA.

Representative **Complete Mitochondrial Genomes** > 3200 different organisms are listed at NCBI.

Después se localiza la especie de interés, para este estudio en específico (*Equus caballus*) y se selecciona su número de acceso:

<a href="#">Epigonichthys maldivensis</a>	<a href="#">NC_006465</a>	14975 nt	13	24	11/23/2004	02/01/2010
<a href="#">Epinephelus akaara / Hong Kong grouper</a>	<a href="#">NC_011113</a>	16795 nt	13	24	08/05/2008	10/27/2009
<a href="#">Epinephelus areolatus mitochondrion complete genome / areolate grouper</a>	<a href="#">NC_020785</a>	16893 nt	13	24	04/04/2013	04/04/2013
<a href="#">Epinephelus awoara / yellow grouper</a>	<a href="#">NC_018773</a>	16802 nt	13	24	10/12/2012	10/14/2012
<a href="#">Epinephelus bruneus / longtooth grouper</a>	<a href="#">NC_013820</a>	16686 nt	13	24	02/16/2010	05/09/2012
<a href="#">Epinephelus coioides / orange-spotted grouper</a>	<a href="#">NC_011111</a>	16418 nt	13	24	08/05/2008	10/27/2009
<a href="#">Epinephelus fasciaticulosus / rock grouper</a>	<a href="#">NC_020782</a>	16682 nt	13	24	04/04/2013	04/04/2013
<a href="#">Epinephelus fuscoguttatus / brown-marbled grouper</a>	<a href="#">NC_020046</a>	16648 nt	13	24	12/31/2012	12/31/2012
<a href="#">Epinephelus lanceolatus / giant grouper</a>	<a href="#">NC_011715</a>	16574 nt	13	24	12/17/2008	12/18/2008
<a href="#">Epinephelus latifasciatus / striped grouper</a>	<a href="#">NC_020784</a>	16389 nt	13	24	04/04/2013	04/04/2013
<a href="#">Epinephelus moara / kelp grouper</a>	<a href="#">NC_017891</a>	16696 nt	13	24	05/09/2012	05/24/2012
<a href="#">Epinephelus septemfasciatus / convict grouper</a>	<a href="#">NC_013829</a>	16558 nt	13	24	02/16/2010	02/24/2010
<a href="#">Epinephelus stictus / black-dotted grouper</a>	<a href="#">NC_021133</a>	16524 nt	13	24	04/23/2013	04/23/2013
<a href="#">Epiplatys biolleyi</a>	<a href="#">NC_009082</a>	14411 nt	13	15	03/02/2007	10/22/2007
<a href="#">Epiplatys fumidus / Taiwan brown-toothed shrew</a>	<a href="#">NC_003040</a>	17488 nt	13	24	07/05/2001	02/01/2010
<a href="#">Eptatretus burgeri / inshore hagfish</a>	<a href="#">NC_002807</a>	17168 nt	13	24	06/17/2001	02/01/2010
<a href="#">Epthianura albitrons / white-fronted chat</a>	<a href="#">NC_019664</a>	16868 nt	13	24	12/03/2012	04/15/2013
<a href="#">Equus asinus / ass</a>	<a href="#">NC_001788</a>	16670 nt	13	24	08/24/1998	02/01/2010
<a href="#">Equus caballus / horse</a>	<a href="#">NC_001640</a>	16660 nt	13	24	08/24/1998	02/01/2010
<a href="#">Equus grevyi / Grevy's zebra</a>	<a href="#">NC_020432</a>	16407 nt	13	24	02/28/2013	03/05/2013
<a href="#">Equus hemionus / onager</a>	<a href="#">NC_016061</a>	16634 nt	13	24	10/13/2011	10/20/2011
<a href="#">Equus kiang / kiang</a>	<a href="#">NC_020433</a>	16380 nt	13	24	02/28/2013	03/05/2013





## Ingeniería en alimentos

Se debe copiar el número **GI: 5835107** y se debe ingresar en la opción **Run BLAST**:

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Limits Advanced Help

Display Settings: GenBank Send: Change region shown Customize view

### Equus caballus mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC\_001640.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS NC\_001640 16660 bp DNA circular MAM 01-FEB-2010  
DEFINITION Equus caballus mitochondrion, complete genome.  
ACCESSION NC\_001640  
VERSION NC\_001640.1 **GI:5835107**  
DBLINK Project: [19129](#)  
BioProject: [FRJNA19129](#)

KEYWORDS .  
SOURCE mitochondrion Equus caballus (horse)  
ORGANISM [Equus caballus](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; Equus.

Analyze this sequence  
**Run BLAST**  
Pick Primers  
Highlight Sequence Features  
Find in this Sequence

LinkOut to external resources  
BOLD Link [GBMA0524-06] [Barcodes of Life]

Se debe escribir el número GI y el primer frontal, en este caso es el primer SIM, seleccionamos la opción More dissimilar sequences y seleccionamos BLAST, como se muestra a continuación:

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/ BLAST/ blastn suite Align Sequences Nucleotide BLAST

blastn blasto blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide subjects using a nucleotide query. [more...](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear Query subrange

5835107 1 From To

Or, upload file Examinar...

Job Title Enter a descriptive title for your BLAST search

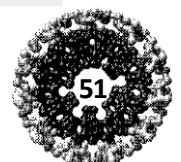
Align two or more sequences

Enter Subject Sequence

Enter accession number, gi, or FASTA sequence Clear Subject subrange

GACCTCCAGCTCCATCAACATCTCATCTTGATGAA 2 From To

Or, upload file Examinar...





**Program Selection**

Optimize for

- Highly similar sequences (megablast)
- More dissimilar sequences (discontiguous megablast) **3**
- Somewhat similar sequences (blastn)

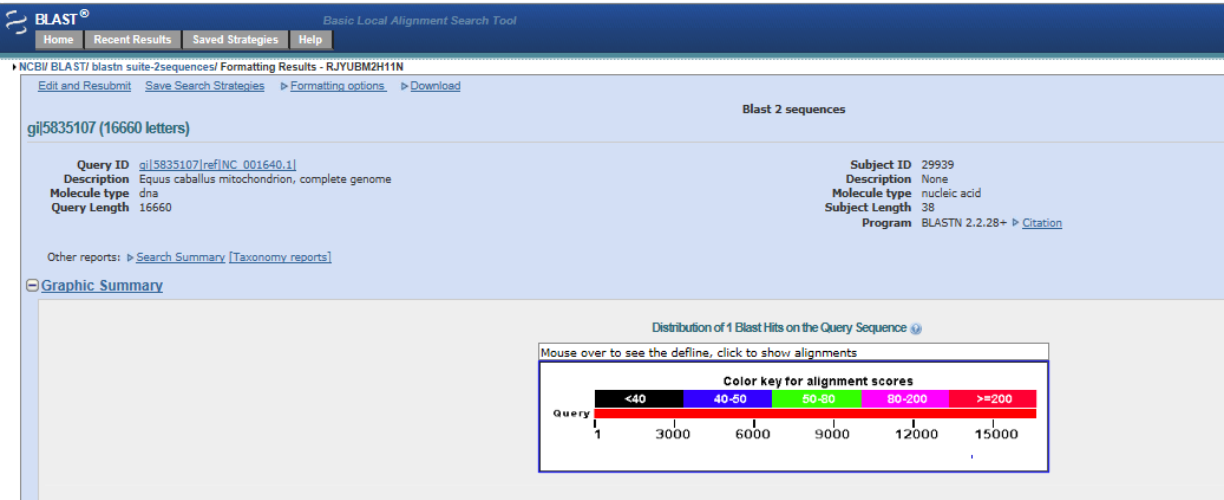
Choose a BLAST algorithm [?](#)

**BLAST** Search nucleotide sequence using Discontiguous megablast (Optimize for highly similar sequences)

Show results in a new window **4**

[+ Algorithm parameters](#)

Con los datos obtenidos se puede entonces corroborar la existencia de secuencias de primers:





## Ingeniería en alimentos

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [Graphics](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">None provided</a>	46.4	46.4	0%	5e-09	87%	29939

**Alignments**

[Download](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Sequence ID: [lcl|29939](#) Length: 38 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 38 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
46.4 bits(50)	5e-09	33/38(87%)	0/38(0%)	Plus/Plus

Query 14245 GACCTACCAGCCCOCTCAAACATTCATCATGATGAAA 14282  
|||||  
Sbjct 1 GACCTOCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA 38

Este primer cuenta con el 87% de similitud al SIM, pero Matsunaga expresa que como los cambios de bases nitrogenadas no se encuentran en los extremos es seguro que amplifique, sobre todo cuando este cambio no es en el extremo 3'.

Para verificar lo anterior volvemos a la página donde se muestra completamente el genoma mitocondrial del *Equus caballus* y seleccionados la opción **Find in this Sequence**:

NCBI Resources [How To](#) [Sign in to NCBI](#)

Nucleotide  [Search](#) [Limits](#) [Advanced](#) [Help](#)

[Display Settings](#):  GenBank [Send](#):  [Change region shown](#) [Customize view](#)

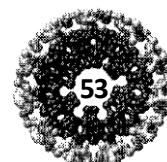
### Equus caballus mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC\_001640.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to](#):

LOCUS NC\_001640 16660 bp DNA circular MAM 01-FEB-2010  
DEFINITION Equus caballus mitochondrion, complete genome.  
ACCESSION NC\_001640  
VERSION NC\_001640.1 GI:5835107  
DBLINK Project: [19129](#)  
BioProject: [FRJNA19129](#)

[Analyze this sequence](#)  
Run BLAST  
Pick Primers  
Highlight Sequence Features  
**Find in this Sequence**





## Ingeniería en alimentos

Se debe escribir en la herramienta de búsqueda que aparece al final de esta página el primer original del caballo, es decir aquel que posee el 87% de similitud al SIM y seleccionamos buscar:

**Equus caballus mitochondrion, complete genome**  
 NCBI Reference Sequence: NC\_001640.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

---

Go to:

LOCUS NC\_001640 16660 bp DNA circular MAM 01-FEB-2010  
 DEFINITION Equus caballus mitochondrion, complete genome.  
 ACCESSION NC\_001640  
 VERSION NC\_001640.1 GI:5835107  
 DBLINK Project: [19129](#)  
 BioProject: [PRJNA19129](#)

KEYWORDS .  
 SOURCE mitochondrion Equus caballus (horse)  
 ORGANISM [Equus caballus](#)  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; Equus.

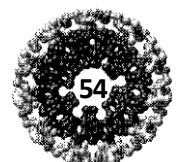
REFERENCE 1 (bases 1 to 16660)  
 AUTHORS Xu,X. and Arnason,U.  
 TITLE The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, Equus

Deberá mandarnos a la secuencia en el gen que corresponde a este primer original para poder corroborar su existencia:

```

13981 ataataatac cacaacctac ccctccactt acaatcagca ctaaaccoccc ataaataggt
14041 gaagggtttg aagaaaaccc cacaaaacta acaacaaaaa taactactcaa aataaacaca
14101 atatatgtca tcattattcc cactgtggaat ctaaccacga ccaatgacat gaaaaatcat
14161 cgttgtatth caactataag aacaccaatg acaaacatcc ggaaatctca cccactaatt
14221 aaaatcatca atcactcttt tattgaccta ccagccccct caaacatttc atcatgatga
14281 aacttctggct cctcctagga aatctgccta atcctccaaa tcttaacagg cctattccta
14341 gccatacact acacatcaga cagacaact gccttctcat ccgtcactca catctgccga
14401 gacgttaact acggatgaat tattcgctac ctccatgcca acggagcacc aatatttttt
14461 atctgcctct tcattcacgt aggacgcggc ctctactacg gctcttacac attcctagag
14521 acatgaaaca ttggaatcat cctacttttc acagttatag ctacagcatt catgggctat
14581 gtectacatc gaggccaaat atccttttga ggagcaacag toatcacgaa cctcctatca
14641 gcaattccct acatcggtac taccctcgtc gactgaaatc gagggtgatt ctcagtagac
14701 aaagccaccc ttacccgatt ttttgcttcc cacttcatcc tacccttcat catcacagcc
14761 ctggtagtctg tacatttact atttcttcac gaaacaggat ctaataaccc ctcaggaatc
14821 ccatccgata tggacaaaaa cccattccac ccatattata caattaaaga catcctagga
14881 ctccctctcc tgatctgtct cctactaact ctagtattat totccccoga cctcctagga
14941 gacccagaca actacacccc agctaaccct ctcagcactc cccctcatat taaaccagaa
15001 tqtactctcc tttttqcta ccccatccta cctccatcc ccaacaaaact aqccqccqta

```





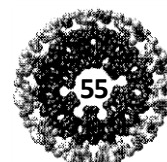
## Ingeniería en alimentos

Ahora, para corroborar el primer reverso reportado bibliográficamente, primer reverso de caballo (5'-CTCAGATTCAGCTCGACGAGGGTAGTA-3'), este debe ser complementado y transcrito en dirección 3'-5', utilizando la anterior secuencia en **Find in this Sequence**.

```
14161 cgttgatatt caactataag aacaccaatg acaaacatcc ggaaatctca cccactaatt
14221 aaaatcatca atcactcttt tattgaccta ccagccccct caaacatttc atcatgatga
14281 aacttcggct cctcctagg aatctgccta atcctccaaa tcttaacagg cctattccta
14341 gccatacact acacatcaga cagcacaact gccttctcat ccgtcactca catctgcoga
14401 gacgttaact acggatgaat tattcgctac ctccatgcca acggagcacc aatatttttt
14461 atctgcctct tcattcacgt aggacggggc ctctactacg gctcttacac attcctagag
14521 acatgaaaca ttggaatcat cctacttttc acagttatag ctacagcatt catgggctat
14581 gtcctacatc gaggccaaat atccttttga ggagcaacag tcatcacgaa cctcctatca
14641 gcaattccct acatcgggtac taccctcgtc gactggaatct gaggtggatt ctcagtagac
14701 aaagccaccc ttaccogatt ttttgctttc cacttcatcc tacccttcat catcacagcc
14761 ctggtagtgc tacatttact atttcttcac gaaacaggat ctaataaacc ctcaggaatc
14821 ccatccgata tggacaaaat cccattccac ccatattata caattaaaga catcctagga
14881 ctctcctccc tgatcttgct cctactaact ctagtattat tctccccga cctcctagga
14941 gaccagagaca actacacccc agtaaccct ctcagcactc cccctcatat taaaccagaa
15001 tggtagtctc tgtttgcta cgccatccta cgctccattc ccaacaaact aggcgcgcta
```

Tamaño de amplificado de 439pb

```
14161 cgttgatatt caactataag aacaccaatg acaaacatcc ggaaatctca cccactaatt
14221 aaaatcatca atcactcttt tattgaccta ccagccccct caaacatttc atcatgatga
14281 aacttcggct cctcctagg aatctgccta atcctccaaa tcttaacagg cctattccta
14341 gccatacact acacatcaga cagcacaact gccttctcat ccgtcactca catctgcoga
14401 gacgttaact acggatgaat tattcgctac ctccatgcca acggagcacc aatatttttt
14461 atctgcctct tcattcacgt aggacggggc ctctactacg gctcttacac attcctagag
14521 acatgaaaca ttggaatcat cctacttttc acagttatag ctacagcatt catgggctat
14581 gtcctacatc gaggccaaat atccttttga ggagcaacag tcatcacgaa cctcctatca
14641 gcaattccct acatcgggtac taccctcgtc gactggaatct gaggtggatt ctcagtagac
14701 aaagccaccc ttaccogatt ttttgctttc cacttcatcc tacccttcat catcacagcc
14761 ctggtagtgc tacatttact atttcttcac gaaacaggat ctaataaacc ctcaggaatc
```







Ingeniería en alimentos

A continuación se muestran las secuencias de nucleótidos de los primers y la región de destino en el citocromo b. Las cajas abiertas indican la secuencia del SIM, primer frontal común y el primer reverso de específicas especies. Los puntos y cajas cerradas indican diferentes nucleótidos en la secuencia del primer, las secuencias marcadas en rojo son los primers que se emplearon (Matsunaga, T., y col., 1999).

SIM GACCTCCGAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAA
G ATAAACAGCATTCCCTCTGTAACACTCACATTTGTCGAGATGTAATTATGGCTGAATCATCCGATACATACACGCAAACGG...
C TCCTAGCCTTCT...
B ACAACAGCATTCT...
S ACAACAGCATTCT...
P ACAACAGCTTTCT...
H ACAACTGCCTTCT...
G CGAGGTC...
C CGAGG...
B CGAGGCTTATATTACGGGCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATGGAGTAATCCTTCTGCTCAAGT...
S CGAGG...
P CGAGGTC...
H CGGG...
G TTTTGAGGGCA...
C TTCTGAGGGCA...
B TTCTGAGGAGCA...
S TTCTGAGGAGCA...
P TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAATCTACTATCAGGTATCCCTTATATCGGAAGA...
H TTTTGAGGAGCA...
120
240
360
439



### 3.2 Establecer a partir de sangre de caballo un control positivo que permita la identificación de carne de caballo y definir las condiciones de PCR para su amplificación.

Para la extracción de DNA de carne de caballo se utilizó como muestra sangre de esta especie, se empleó el protocolo de Sambrook, J., y Russel, D., 2001, se determinó su concentración y pureza, mediante un espectrofotómetro apoyado del programa *NanoDrop ND-1000 3.6.0*.

Una vez corroboradas las secuencias, se comprobó que efectivamente el primer SIM y primer reverso de caballo mandados a diseñar efectivamente funcionarían. Para ello se realizó PCR con DNA que se tenía ya aislado y cuantificado de la muestra que se tiene como control positivo, a través de las condiciones programadas en el termociclador que se expresaron en el Capítulo 2.

Tabla 5 Cuantificación de la concentración y pureza de DNA de caballo

Muestra	260/280	[ng/ $\mu$ L]	Dilución a 60ng/ $\mu$ L	260/280 diluido
Control + de caballo	1.58	834.3	62.8	1.52

La Tabla 5 muestra purezas del control positivo favorables aunque con un poco de contaminación de fenol y/o proteínas por tener valores por debajo de 1.7, por otro lado la primera concentración de DNA de la sangre de caballo fue elevada por lo que requirió ser ajustada a una concentración de 60ng/ $\mu$ L y se verificó nuevamente la pureza, donde no se observaron cambios drásticos.

Enseguida se prosiguió a evaluar los resultados de PCR a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en una cámara de 50mL y los resultados se muestran a continuación en la Figura 4, donde efectivamente se observó que los primers funcionaron, amplificando a 439pb como efectivamente Matsunaga, T., y col., 1999, lo establece en su publicación, a través de la imagen de electroforesis en gel de agarosa al 4%, así también con las otras cinco muestras de carne de otras especies (res, cerdo, pollo, oveja y cabra) con amplificadas de 157, 227, 274, 331 y 398pb, respectivamente.

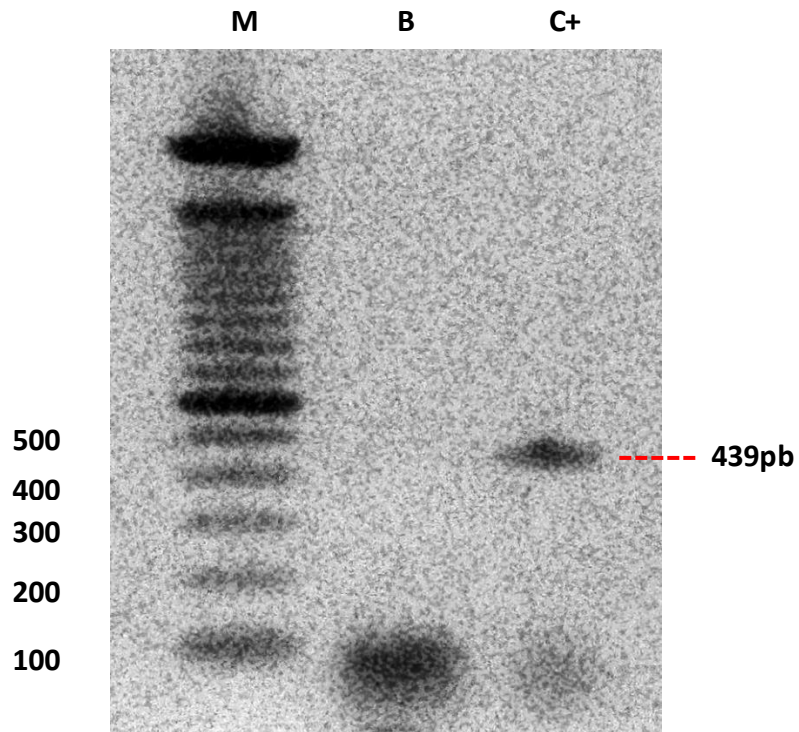


Figura 4 Evaluación del correcto funcionamiento de los primers SIM y reverso de caballo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo).

Después se procedió a corroborar la especificidad del primer reverso de caballo, para lo cual fue necesario tener aislado DNA de seis diferentes muestras, las cuales debían ser efectivamente de especies distintas, fueron empleadas muestras de res, cerdo, pollo, maíz, soya y trigo.

Cabe mencionar que el DNA ya había sido extraído y se encontraba almacenado bajo condiciones de congelación, sólo fue necesario cuantificar su pureza y concentración, mediante un espectrofotómetro apoyado del programa *Nano Drop ND-1000 3.6.0*.



**Tabla 6 Cuantificación de la concentración y pureza del DNA de carne de seis especies distintas a la carne de caballo.**

Muestra	260/280	[ng/ $\mu$ L]
Res	1.72	89.2
Cerdo	1.54	46.9
Pollo	1.85	109.5
Maíz	1.89	54.7
Soya	1.58	97.2
Trigo	1.48	85.5

En la Tabla 6 se puede observar que el DNA de estas especies contó con la pureza necesaria y la concentración adecuada para su posterior amplificación, mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

En la Figura 5 se puede observar que efectivamente el primer reverso de caballo es específico sólo para esta especie, ya que se aprecia la banda totalmente definida para el control positivo y que efectivamente amplifica a 439pb.

Zhang, C., 2013, por otro lado empleó el DNA de carne de caballo, asno, pescado y soya como control negativo, examinando su concentración y pureza por espectrofotometría a 260 y 280nm, como resultado muestra una imagen de electroforesis en gel de agarosa al 2%, haciendo visible que sus primers fueron específicos para cada una de las muestras de carne que utilizó como control positivo (cerdo, res, pollo, cabra y oveja), así como mezcla entre estas.



## *Ingeniería en alimentos*

Por otro lado Aranguren, M. J., y col., 2009, utilizando primers diferentes y un marcador de peso molecular de 50pb, obtuvo para carne de caballo un amplificado de 292pb. Menciona la ventaja de trabajar con mtDNA y en especial con el gen 12S en vertebrados, dado que el material biológico es demasiado estable, y se requiere tan sólo una pequeña cantidad de DNA molde, además que puede detectarse el origen del producto a partir de muestras frescas o cocidas y con el mtDNA, la integridad que se presenta es de mayor grado en él, que en el DNA nuclear.

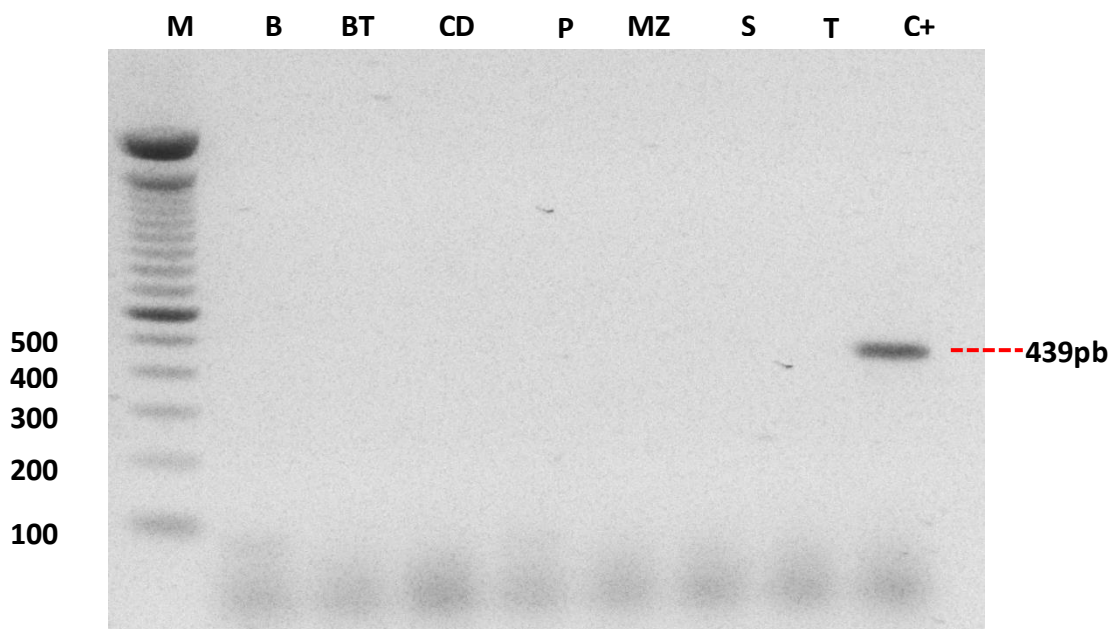


Figura 5 Evaluación de la especificidad del primer reverso de caballo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, BT = Res, CD = Cerdo, P = Pollo, MZ = Maíz, S = Soya, T = Trigo, C+ = Control positivo (sangre de caballo).



### 3.3 Evaluar la presencia de carne de caballo en muestras comerciales, mediante la técnica propuesta.

En la Tabla 7 se muestra la pureza y concentración de las 15 muestras que fueron evaluadas. Los resultados fueron adecuados para utilizar el DNA aislado en una posterior PCR.

**Tabla 7 Cuantificación de la concentración y pureza de quince muestras comerciales antes y después de su dilución para alcanzar una concentración de DNA a 60ng/μL.**

Muestra	260/280	[ng/μL]	Dilución a 60ng/μL	260/280 diluido
Hamburguesa comercial (1)	1.65	3,034.2	78.8	1.63
Bistec de res de Walmart (2)	1.82	904.6	79.0	1.79
Bistec de res de Cuautitlán (3)	1.85	798.6	70.5	1.82
Chilorio de cerdo procesado (4)	1.64	1,703.7	72.1	1.59
Hamburguesa Burger King (5)	1.79	1,803.8	83.2	1.68
Cecina de res Walmart (6)	1.47	448.6	78.5	1.75
Cecina de res de la Merced (7)	1.79	1,169.3	86.1	1.79
Cecina de res de Yecapixtla (8)	1.78	923.7	73.6	1.80
Bistec de res de la Merced (9)	1.81	583.4	64.8	1.80
Tacos de cecina de res (10)	1.95	1,500	72.1	1.91
Bistec de res, carnicería a (11)	1.92	625.8	51.6	1.83
Bistec de res, carnicería b (12)	1.85	880.9	84.5	1.83
Bistec de res, carnicería c (13)	1.72	1,284.1	71	1.69
Bistec de res, carnicería d (14)	1.79	921	58.6	1.73
Carne molida de res Tlalnepantla (15)	1.80	1,223.9	58.8	1.76



En la Figura 6 se puede observar la electroforesis de las cuatro primeras muestras a ser evaluadas, después de haber sido sometidas a PCR, estas no amplificaron por lo que se puede concluir que no son de la especie de interés y que efectivamente la prueba ha sido realizada correctamente, debido a que el blanco no amplificó y por otro lado que el control positivo, sí.

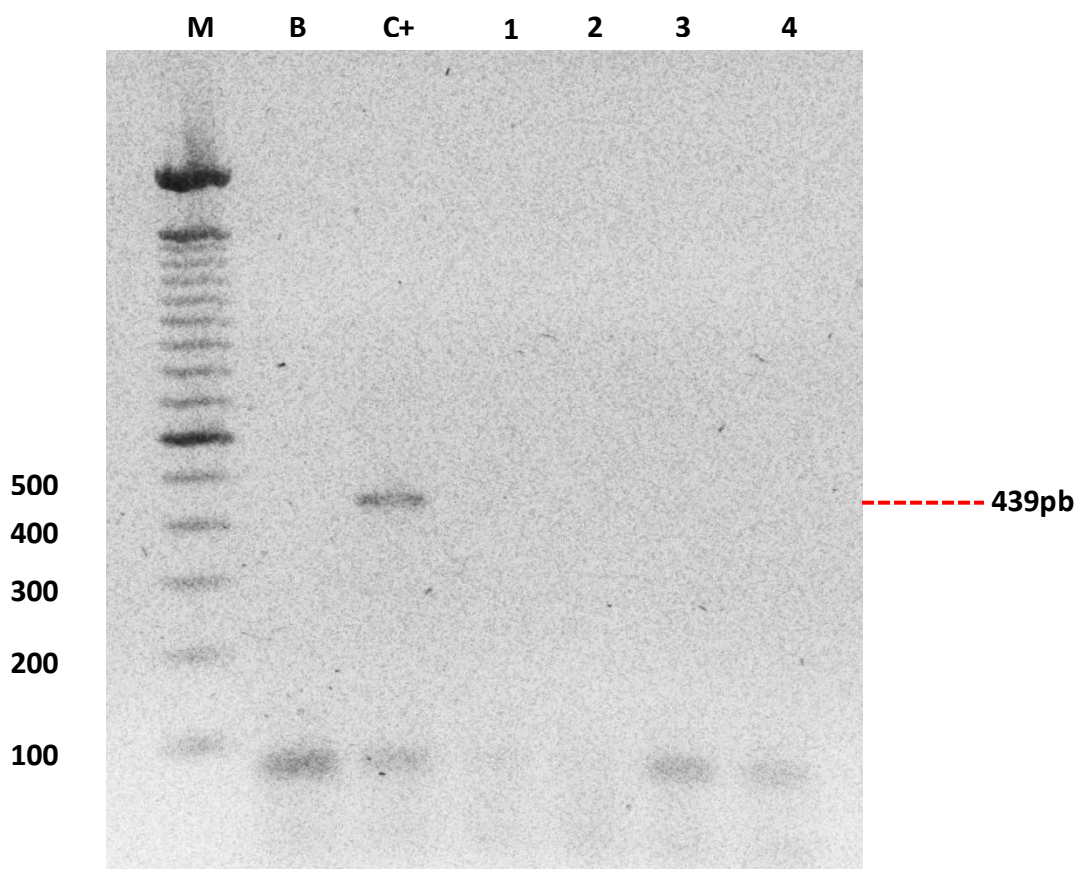


Figura 6 Evaluación de las primeras cuatro muestras comerciales para corroborar si efectivamente se está comercializando carne de caballo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo), 1 = Hamburguesa, 2 = Res de Walmart, 3 = Res del mercado, 4 = Chilorio.



## Ingeniería en alimentos

En la Figura 7 se observa que únicamente la muestra número siete amplifica a 439pb, por lo que efectivamente la cecina de res, obtenida del centro de distribución de carne de la Merced es caballo, cabe mencionar que su precio por kilogramo es bajo, siendo de 50 pesos.

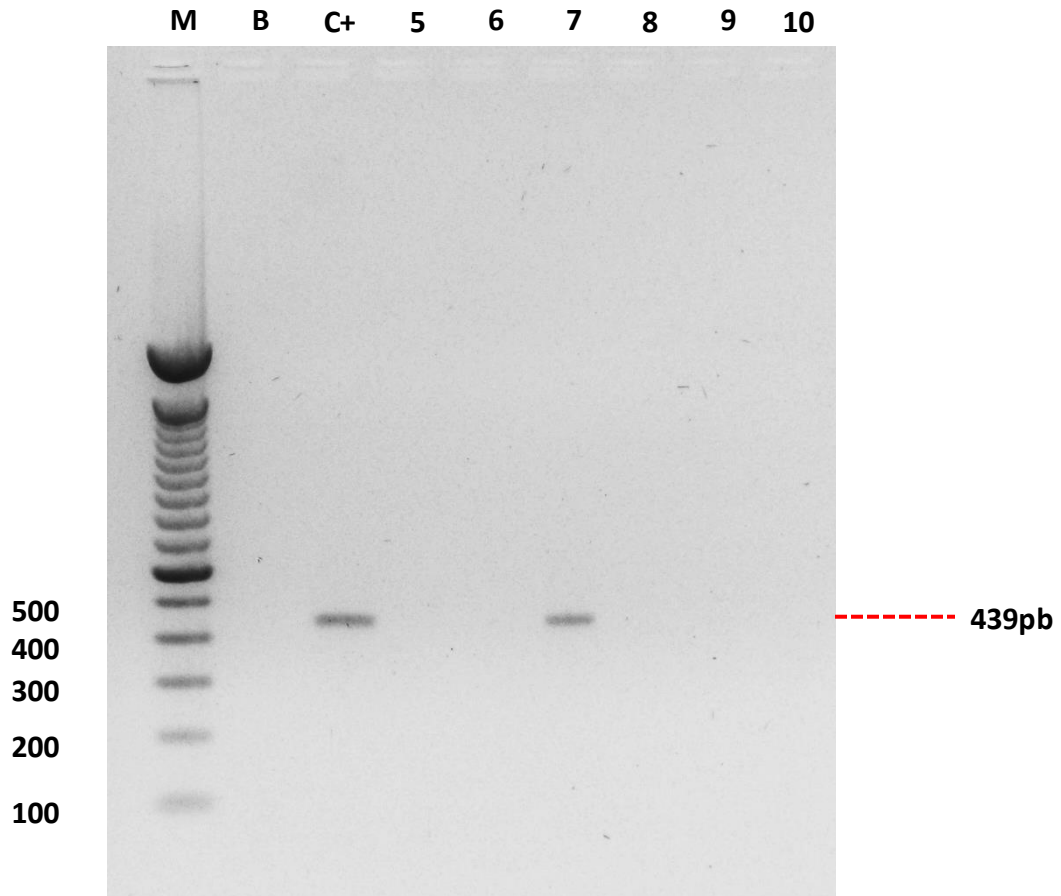
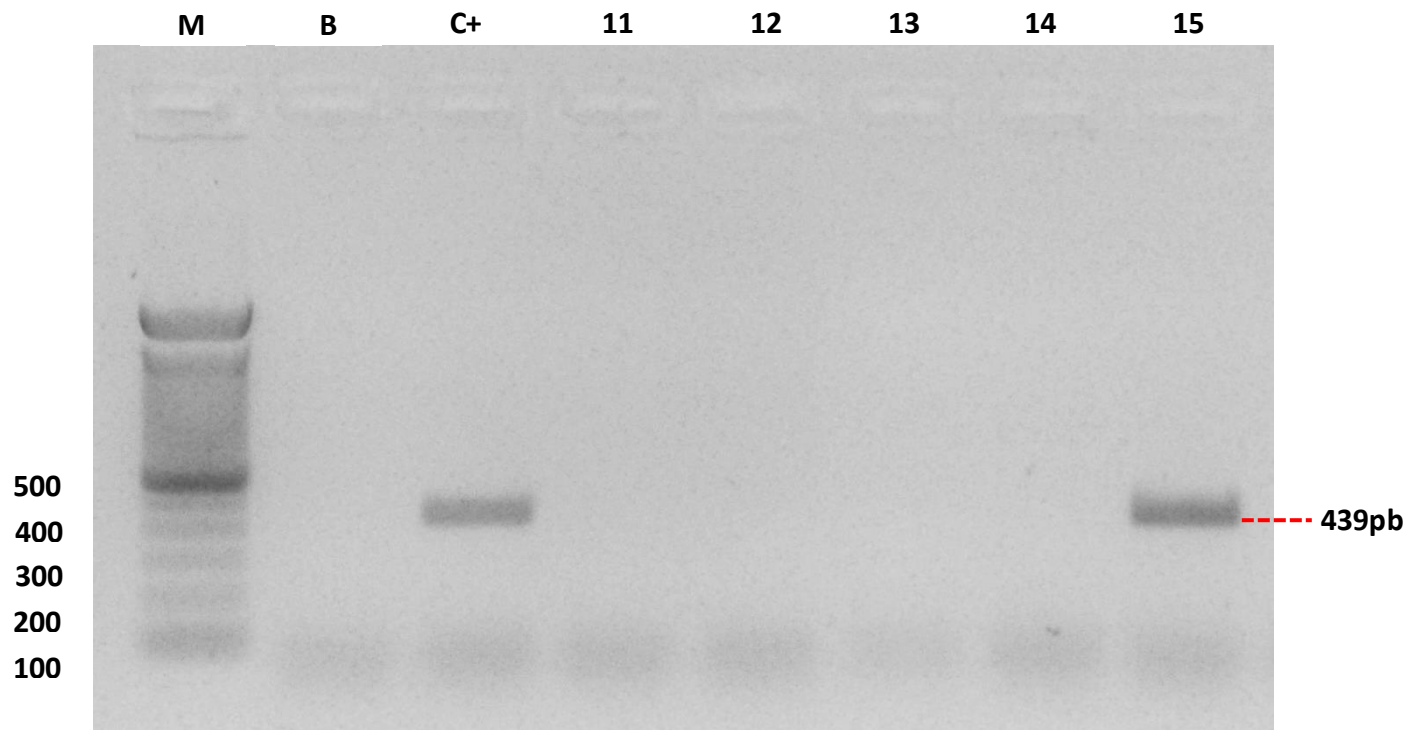


Figura 7 Evaluación de las siguientes seis muestras comerciales para corroborar si efectivamente se está comercializando carne de caballo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo), 5 = Burger, 6 = Cecina de res de Walmart, 7 = Cecina de res de la Merced, 8 = Cecina de res de Yecapixtla, 9 = Res de la Merced, 10 = Taco de cecina de res.

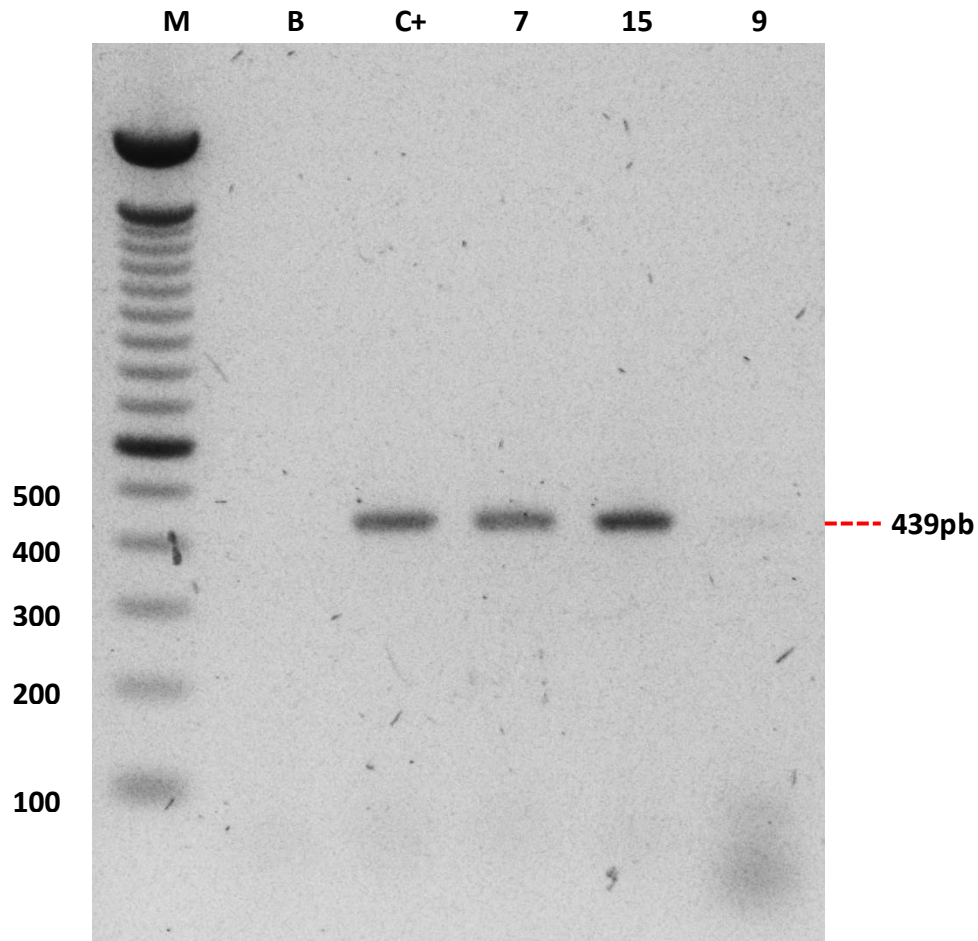
En la Figura 8 se observa que las muestras 11, 12, 13 y 14 no amplificaron, pero la muestra 15 de carne molida de res obtenida del rastro de Tlalnepantla con un costo de 40 pesos el kilogramo, amplificó a 439pb, por lo que podemos deducir que parte de la carne molida o en todo caso su totalidad pertenecen a la especie de interés, carne de caballo.





**Figura 8** Análisis de electroforesis al 1.5% en gel de agarosa, obteniendo el amplificado de la PCR de las muestras: (11-15) cuatro muestras de bistec de res y una de carne molida de res, respectivamente; M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo).

En la Figura 9 se observa en una sola electroforesis en gel de agarosa al 1.5% como las muestras 7 y 15 efectivamente son carne de caballo y la muestra 9 fue cargada nuevamente, debido a que en una prueba anterior se notaba un amplificado muy tenue, ahora en esta nueva prueba se nota mucho mejor el amplificado, aunque en comparación con la intensidad de las otras muestras, esta sigue siendo la más tenue.



**Figura 9 Prueba de electroforesis para corroborar el correcto amplificado de las muestras que marcaron positivo. M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo), 7 = Cecina de res de la Merced, 15 = Carne molida de res, 9 = Res de la Merced.**

Aunque en el presente proyecto se utilizó un primer SIM, no se empleó específicamente la técnica de PCR múltiplex, ya que no se introdujeron primers reversos de otras especies diferentes al del caballo, sin embargo, si se pueden presentar los principales obstáculos en la aplicación y estandarización de una PCR múltiplex en pantalla de las especies que son relativamente sensiblemente bajas y eficiencia de amplificación desigual de primers diferentes. En el análisis de futuros alimentos procesados, la PCR múltiplex y análisis de electroforesis puede conducir a falsos resultados negativos porque el DNA es ampliamente degradado (Zhang, C., 2013).



Por lo tanto fue necesario evaluar la sensibilidad de las diferentes metodologías empleadas a partir de la extracción de DNA en base a diferentes mezclas, cuyas proporciones fueron obtenidas de lo reportado por Montiel, S. J. F., y col., 2000, para después ser sometidas a PCR y un análisis de electroforesis.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la cuantificación de la concentración y pureza del DNA de las mezclas de carne de caballo con res en sus diferentes proporciones, proporcionando resultados muy cercanos a 1.8, con lo cual las diferentes mezclas poseen la pureza máxima, aunque como en los casos anteriores debió ser ajustada su concentración a 60ng/ $\mu$ L.

**Tabla 8 Cuantificación de la concentración y pureza del DNA de las mezclas con caballo y res.**

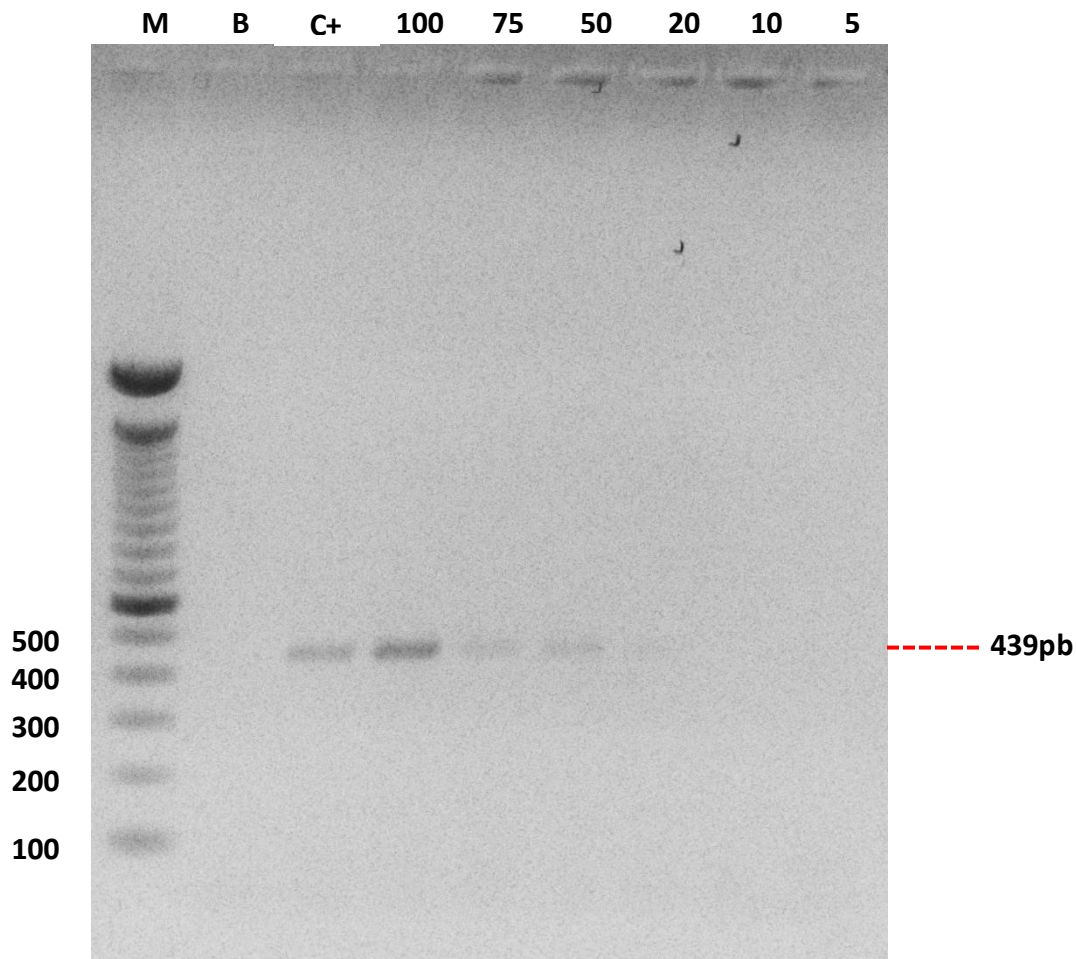
Mezclas caballo/res (%)	260/280	[ng/ $\mu$ L]	Dilución a 60ng/ $\mu$ L	260/280 diluido
<b>5/95</b>	1.82	1,306.4	46.8	1.77
<b>10/90</b>	1.83	1,547.6	52.8	1.78
<b>20/80</b>	1.79	1,308.8	51.8	1.77
<b>50/50</b>	1.85	1,577.2	60.8	1.82
<b>75/25</b>	1.87	2,473.0	88.4	1.85
<b>100/0</b>	1.81	1,729.9	63.2	1.79

Para saber si la intensidad de la banda obtenida, usando un primer SIM y un primer reverso de caballo era fiable de forma cuantitativa. Se preparó DNA y se amplificó para mezclas diferentes de carne de caballo y carne de res como se muestra en la figura 10, que muestra una correspondencia visible entre la intensidad de la banda y la cantidad de DNA de carne de caballo utilizado en cada amplificación. Estos resultados demostraron la ausencia de eventos competitivos entre el DNA mitocondrial de carne de caballo y el DNA de carne de res que podría evitar la amplificación del DNA de carne de caballo en mezclas de ambas especies, al menos, con >10% de la proporción de carne de caballo.



## *Ingeniería en alimentos*

Montiel, S. J. F., y col., 2000, confirma la efectividad de trabajar con mtDNA y describe que el método que utilizó, permite fácilmente identificar la presencia de carne de cerdo y grasa en productos cárnicos. Por otra parte, la presencia de DNA de otras especies (res), no evitó que el DNA de cerdo amplificara con una sensibilidad del 5%.



**Figura 10** Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos de la PCR, para mezcla diferentes de DNA mitocondrial de caballo y res: M = Marcador de peso molecular de 100pb, B = Blanco, C+ = Control positivo (sangre de caballo); (líneas 100-5) 100% caballo, 75% caballo/25% res, 50% caballo/50% res, 20% caballo/80% res, 10% caballo/90% res y 5% caballo/95% res, respectivamente.



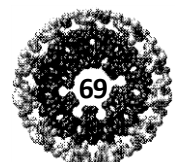
## CONCLUSIONES

- Un etiquetado correcto en los alimentos, regido bajo la legislación normativa nacional o internacional, precisa una elección informada del consumidor, en base a su estilo de vida, religión y/o salud, además de un comercio justo.
- En todo caso, de que se tengan sospechas de que ciertos productos no sigan estas normas, se han desarrollado una gran variedad de técnicas que permiten identificar adulteraciones o en un caso más extremo un fraude. Siendo las técnicas moleculares basadas en el análisis del DNA como la PCR las que mayormente son utilizadas, ya que al ser específicas, poseen mayor sensibilidad y rapidez.
- El DNA aislado de cada una de las diferentes muestras, contó con la pureza adecuada para ser trabajada en una PCR, siendo únicamente necesaria ajustar su concentración, debido al exceso de DNA y que probablemente inhibiría la reacción.
- A través de la técnica desarrollada se evidenció que en las muestras trabajadas en este estudio efectivamente se está llevando a cabo una adulteración económica, siendo ofertada carne de caballo como res, principalmente en rastros y mercados de gran distribución. Todo esto debido a los beneficios para el comerciante y aunque el consumir la carne de ésta especie no repercute en nuestra salud y además posee algunas ventajas ante carne de otras especies, en realidad culturalmente no se consume en México.
- Se puede discutir el hecho si es que en realidad estamos siendo víctimas de una adulteración o un total fraude, ya que la muestra de carne molida de res, que resultó positiva como de caballo, probablemente podría ser una mezcla de ambas especies, pero sin duda en los que eran totalmente cortes se puede considerar que el fraude es notorio.
- Ante estos fraudes, es preciso crear organismos que regulen y vigilen en mayor proporción este tipo de engaños, protegiendo sobre todo al consumidor.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aranguren, M. J., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil, O. Y., Yáñez, L., Borjas, L., y Zabala, W. (2009). IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL MEDIANTE PCR. *Redalyc*, 19(2), 159-164.
- Asensio, L., González, I., García, T., y Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19(1), 1-8.
- Ballin, N. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577–587.
- Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., y Karlsson, A. H. (2009). Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83(2), 165–174.
- Cardoso, P. P. M., y Baltazar, V. A. F. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586–592.
- Chisholm, J., Conyers, C., Booth, C., Lawley, W., y Hird, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Science*, 70(4), 727–732.
- Consejo Mexicano de la Carne. (2011). *Historia de la Carne*. Obtenido de <http://www.comecarne.org/historia-de-la-carne/>
- Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. (2012). *Fuentes de Carne*. Obtenido de [http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr\\_sources.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_sources.html)
- Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. (2012). *Monografía del Ganado Equino*. Obtenido de [http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaEquino\(sep12\).pdf](http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaEquino(sep12).pdf)
- División de Infraestructuras Rurales y Agroindustrias. (2013). *Grupos de Productos Cárnicos*. Obtenido de <http://www.fao.org/ag/ags/industrias-agroalimentarias/carne-y-leche/grupos-de-productos-carnicos/es/>
- DNA Amplification & PCR*. (27 de Marzo de 2013). Obtenido de <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>
- Forrest, J. C. (1979). *Fundamentos de Ciencia de la Carne*. *Ciencia y Tecnología de la Carne*. Zaragoza (España): Acribia.
- Gill, C. (2005). Safety and storage stability of horse meat for human consumption. *Meat Science*, 71(3), 506–513.





Hopwood, A. J., Fairbrother, K. S., Lockley, A. K., y Bardsley, R. G. (1999). An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Science*, 53(4), 227-231.

Hsu, J. P., Huang, C. H., y Tseng, S. (2012). Gel electrophoresis: Importance of concentration-dependent permittivity and double-layer polarization. *Chemical Engineering Science*, 84(1), 574–579.

Jiménez, C. F., Pintado, T., Cofrades, S., Ruiz, C. C., y Bastida, S. (2010). Production variations of nutritional composition of commercial meat products. *Food Research International*, 43(10), 2378–2384.

Kim, J. H., Jeong, D., Kim, Y. R., Kwon, Y. K., Rhee, G. S., Zhang, D., y Kim, H. Y. (2013). Development of a multiplex PCR method for testing six GM soybean events. *Food Control*, 31(2), 366-371.

Kreuzer, H., y Massey, A. (2004). *ADN Recombinante y Biotecnología. Guía para estudiantes*. Zaragoza (España): ACRIBIA, S. A.

Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., y Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51(2), 143-148.

McAfee, A. J., McSorley, E. M., Cuskelly, G. J., Moss, B. W., Wallace, J. M., Bonham, M. P., y Fearon, A. M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84(1), 1–13.

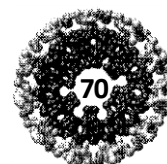
*Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis*. (27 de Marzo de 2013). Obtenido de <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/figures.htm>

Montiel, S. J. F., Ruiz, P. E., Montoya, J., Roncalés, P., López, P. M. J., y Pérez, M. A. (2000). Direct and Highly Species-Specific Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR Amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2829-2832.

NOM-213-SSA1-2002, N. O. (s.f.). En *Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba*.

Perera, J. (2002). *Ingeniería genética, preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA*. Madrid, España: Síntesis .

Sambrook, J., y Russel, D. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. E.U.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.





## *Ingeniería en alimentos*

Sánchez, M. A. E. (2011). *Desarrollo de un protocolo para identificar la presencia de carne de pollo (*Gallus gallus domesticus*), cerdo (*Sus scrofa domestica*) y soya (*Glycine max*) en hamburguesas comerciales, mediante la aplicación de la técnica de PCR múltiplex*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Schneeweiss, W., Stanek, C., Wagner, M., y Hein, I. (2007). Inhibitor-free DNA for real-time PCR analysis of synovial fluid from horses, cattle and pigs. *Veterinary Microbiology*, 121(1-2), 189–193.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2011). *México: Líder Mundial en Medio Centenar de Productos Agropecuarios*. Obtenido de <http://www.siap.gob.mx/opt/123/50/49.html>

Sepúlveda, W. S., Maza, M. T., y Pardos, L. (2011). Aspects of quality related to the consumption and production of lamb meat. Consumers versus producers. *Meat Science*, 87(4), 366–372.

Smith, C. L. (1991). Separation and analysis of DNA by electrophoresis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2(1), 86-91.

Tagu, D., y Moussard, C. (2006). *Fundamentos de las técnicas de biología molecular*. Zaragoza (España): ACRIBIA, S. A.

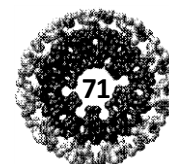
Teijón, R. J. M., y Garrido, P. A. (2005). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid (España): Alfaomega.

Valsta, L., Tapanainen, H., y Männistö, S. (2005). Meat fats in nutrition. *Meat Science*, 70(3), 525–530.

Winder, F., y Beffa, R. (2000). *Diccionario de bioquímica y biología molecular*. España : Acribia .

Wu, G. (2009). Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *AminoAcids*, 37(1), 1-17.

Zhang, C. (2013). Semi-nested multiplex PCR enhanced method sensitivity of species detection in further-processed meats. *Food Control*, 31(2), 326-330.







ANEXO 1

Cálculos para resuspender el primer reverso de caballo:

$$U = \frac{\mu\text{mol}}{250} = \text{Lts.}$$

$$104.8\text{nMoles} * \frac{1\mu\text{mol}}{1000\text{nMoles}} = 0.1048\mu\text{mol}$$

$$U = \frac{0.1048\mu\text{mol}}{250} = 0.0004192\text{Lts.}$$

$$\frac{0.0004192\text{Lts.}}{1E - 6} = 419.2\mu\text{L}$$

**Nota:** El primer resuspendido con la anterior cantidad de agua libre de nucleasas se mantiene en incubación a 37°C de 3 a 4h.

Cálculo para preparar una muestra más su blanco:

Master mix            12.5 \* 2 = 25

Primer frontal        0.5 \* 2 = 1

Primer reverso       0.5 \* 2 = 1

Agua L/N              10 \* 2 = 20

Total = 47/2 = 23.5 + 1.5 de muestra de DNA = 25µL

Cálculo para preparar un gel de agarosa al 1.5%:

50mL-----100%

X agarosa ----- 1.5%

0.75g de agarosa para 50mL de TAE.