

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"Detección de trazas de Cacahuate (*Arachis hypogaea*) y avellana (*Corylus avellana*) potencialmente alergénicos en alimentos procesados mediante la técnica de PCR"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**INGENIERO EN ALIMENTOS** 

PRESENTA:

CRUZ HERNÁNDEZ ANA KAREN

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa

Co-ASESORA: M. en M. Josefina Moreno Lara

CUATITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO, 2016





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.



MEXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

U. N. A. M.

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN PRESENTE

> ATN: M. EN A. ISMAEL HERNANDEZ MAURICIO Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales EXAMPLES PROF de la FES Cuautitlán.

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

Detección de trazas de Cacahuate (Arachis hypogaea) y avellana (Corylus avellana) potencialmente alergénicos en alimentos procesados mediante la técnica de PCR.

Que presenta la pasante: Ana Karen Cruz Hernández

Con número de cuenta: 408067704 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Octubre de 2015.

#### PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

PRESIDENTE Dr. José Francisco Montiel Sosa

VOCAL Dra. Susana Patricia Miranda Castro

SECRETARIO M. en C. Tais Nopal Guerrero

1er. SUPLENTE I.A. Miriam Álvarez Velasco

2do. SUPLENTE Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca

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

IHM/mmgm\*

### **AGRADECIMIENTOS**

Este trajo de Tesis está dedicado a mis papis José Luis y Vicenta, no existe palabra alguna para hacerles saber lo agradecida que estoy con Dios por tener a unos padres que me encaminaron en esta aventura llamada vida, los amo.

A mis hermanas Maura, Alma y Sarai; que son un todo para mí, y gracias por cada momento que hemos compartido de enojos, tristezas, pero sobre todo de alegrías.

A mi tio Ricardo por ser un segundo padre, por el apoyo que siempre ha brindado a mi familia, infinitas gracias.

A Diego por presionarme a concluir este trabajo y por ser mi compañero de vida.

A mis amigas Mireya y Gabriela por algunos años de amistad, porque hemos estado juntas; en cada etapa.

A mis amigos de la universidad, por los gratos momentos que compartimos.

## **AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS**

Al Dr. Francisco Montiel Sosa por el apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por las enseñanzas, tiempo, paciencia y asesoría técnica.

A los sinodales por sus observaciones y el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Se agradece el apoyo del Proyecto de Investigación e Innovación Tecnologica PAPIIT IN211413.

A la UNAM por ser la máxima casa de estudios e inculcar en cada uno de sus alumnos invaluables conocimientos técnicos un compromiso social para el impulso y mejora de nuestro país.

A los excelentes profesores de FES-Cuautitlán, por ser un pilar importante para la superación personal y por ende del progreso de nuestro país.

## Ingeniería en Alimentos



## ÍNDICE

RES	SUME	N	1
INT	RODU	CCIÓN	2
CAF	PÍTULO	D 1 GENERALIDADES	4
1.1	CAC	AHUATE (Arachis hypogaea)	4
		Origen de la especie	
		Clasificación taxonómica	
	1.1.3	Descripción Morfológica (Arachis hypogaea)	5
	1.1.4	Variedades más importantes de (Arachis hypogaea)	
	1.1.5	Condiciones adecuadas del cultivo	
	1.1.6	Composición química de la semilla del cacahuate	8
	1.1.7	Contexto Internacional - Nacional	9
	1.1.	7.1 Contexto Internacional	9
	1.	1.7.1.1 ContextoNacional	10
	1.1.8	Usos	11
1.2	Avella	ana (Corylus Avellana)	11
	1.2.1	Origen de la especie	11
	1.2.2	Clasificación taxonómica	12
	1.2.3	Descripción Morfológica	12
	1.2.4	Grupos de variedades	14
	1.2.5	Condiciones adecuadas de cultivo	14
	1.2.6	Composición química de la avellana	15
		Principales países productores de Avellana	
	1.2.8	Usos	16
1.3	Alérg	enos	17
	1.3.1	Definición de alérgeno	17
	1.3.2	Propiedades generales de los alérgenos	17
	1.3.3	Clasificación	
	1.3.4	Nomenclatura de alérgenos	
	1.3.5	Definición de alergia alimentaria	
	1.3.6	Alérgenos de origen vegetal (Frutos secos)	
	1.3.	6.1 Alérgenos en el Cacahuete (Arachys hypogeae) Ara h 2	22

## Ingeniería en Alimentos



	1.3.6	6.2 Alérgenos en la avellana (Corylus avellana) Cor a 8	26
1	.3.7 N	Normatividad en alimentos para alérgenos	27
	1.3.7	7.1 Etiquetado	27
1.4	Aplica	aciones biotecnológicas en la detección de alérgenos	29
	1.4.1	Métodos de análisis basados en la detección de proteínas	29
	1.4.1	1.1 ELISA	29
	1.4.1	1.2 Western Blot	30
	1.4.	1.3 Métodos de análisis basados en la detección de ADN	30
	1.4.2	Estructura del ADN	31
	1.4.2	2.1 Las células eucariontes	33
	1.4.2	2.2 Características del ADN genómico o nuclear	34
	1.4.2	2.3 ADN mitocondrial	35
	1.4.2	2.4 ADN de cloroplastos	35
1.5	Reac	cción en Cadena de la Polimerasa	35
	1.5.1	Fundamento	36
	1.5.2	Componentes de la reacción	36
	1.5.2	2.1 Criterios principales a considerar para la selección adecua	ada
	de los	s primers	39
	1.5.3	Las etapas de un ciclo de reacción	<b>4</b> 0
	1.5.4	Análisis de productos amplificados	<i>4</i> 3
	1.5.5	Ventajas y desventajas de la PCR	44
CAI	PÍTULO	O 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	48
2.1	Desc	cripción del cuadro metodológico	48
	2.1.1	Problema	48
	2.1.2	Objetivo general	48
	2.1.3	Objetivo Particular 1	48
	2.1.4	Objetivo Particular 2	48
	2.1.5	Objetivo Particular 3	48
	2.1.6	Objetivo Particular 4	<b>4</b> 9
2.2	Mate	riales y métodos	49
	2.2.1	Material Biológico	<b>4</b> 9
	2.2.2	Extracción De ADN	49
	2.2.3	Cuantificación de ADN por medio de absorbancia	52





2.3	Reacció	ón en Cadena	de la Polimerasa PCR		53
	2.3.1	Etapas y ciclo	os de la reacción		55
	2.3.2 I	Evaluación	de los productos obtenidos	de la PCR	mediante
	electrofo	resis horizont	al de agarosa		56
	2.3.2.	1 Carga y co	rrida del gel		58
	2.3.2.2	2 Visualizac	ión de fragmentos		59
CA	PÍTULO 3	3 RESULTAD	OS Y DISCUSIÓN		60
3.1	Objetivo	Particular 1.			60
3.2	Objetivo	Particular 2.			60
3.3	Objetivo	Particular 3			62
3.4	Objetivo	particular 4			66
	3.4.1 Pr	ueba Sensibil	idad		70
Glo	sario				79
Ane	exo 1				81
Esp	Especificidad de Primers81				
۸۵۸	Anovo 2				

## Ongenieria en Alimentos



## Índice de figuras

Figura	1-1 Morfología del cacahuate (Arachis hypogaea)7
Figura	1-2 Principales Oleaginosas Producidas en el mundo Ciclo
	2010/119
Figura	1-3 Principales países productores y consumidores de cacahuate
	ciclo 2010-201110
Figura	1-4 Producción de cacahuate en México
Figura	1-5 Clasificación de las reacciones adversas a alimentos según los
	mecanismos que las producen. Ig: inmunoglobulina
Figura	1-6 Pesos moleculares de algunos alérgenos del cacahuate
Figura	1-7 Estructura tridimensional de alérgeno Ara h 2
Figura	1-8 Genes A (Ara h 2.01) y B (Ara h 2.02)
Figura	1-9 Secuencia parcial de nucleótidos de la alineación de los Genes
	A (Ara h 2.01) y B (Ara h 2.02) respecto al Ara h 2
Figura	1-10 Estructura tridimensional de alérgeno Ara h 6
Figura	1-11 Comparación de nucleótidos del alérgeno Ara h 2 respecto
	al alérgeno Ara h 6
Figura	1-12 Estructura del ADN
Figura	1-13 Esquema de la célula Eucarionte
Figura	1-14 Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
Figura	1-15 Naturaleza exponencial de los ciclos de PCR
Figura	2-1 Etapas y condiciones que se llevaran a cabo en Termociclado para
	detección de alérgenos de Avellana y Cacahuate
Figura	3-1 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3%, control positivo de
	Avellana. Carril 1 Marcador-100pb, carril 3 Blanco, carril 6 ADN de Avellana
	1 (1սl) v carril 7 DNA de Avellana 2 (1սl). PCR-directa con Master Mix 63

## Sngenieria en Alimentos



Figura 3-3 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3% control positivo de
Cacahuate. Carril 1 M-100pb, carril 2 Blanco, carril 3 y 5 PCR Master Mix
con DNA concentrado de Cacahuate (0.5µl)64
Figura 3-4 Análisis Electroforético de especificidad para primers de Avellana y
Cacahuate. Carril 1) M-100pb, se realizaron con primers de cacahuate los
carriles 2) Cocoa ADN concentrado y 3) Cocoa ADN diluido, carril 4) soya y
carril 8) Avellana C+. Se realizaron con primers de Avellana carril 5) Cocoa
ADN concentrado y carril 6) Cocoa diluida, carril 7) Soya <sup>1</sup> y carril 9)
Cacahuate C+
Figura 3-5 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3%, muestras
comerciales para la detección de trazas de Avellana. Carril 1)
M-100pb, carril 2) Blanco, carril 3)C+ de Avellana y carril 5) C+
de Avellana, 7) C+ Cocoa, carril 8) Chocolate Crunch, carril 9)
Galleta choco chispa y carril 10) Galleta maría. PCR convencional
con 0.6µl de ADN67
Figura 3-6 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3 %, muestra s
comerciales para la detección de trazas de cacahuate . Carril 1)M-100pb,
carril 2) Blanco, carril 3) C+ de cacahuate, carril 4) barra de cereal special
K, carril 5) Nesquik Cereal, carril 6)Cereal Aurrera y carril 7) Zucaritas
cereal68
Figura 3-7 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3 %, muestras
comerciales para detección de trazas de cacahuate. Carril 1) M-100pb,
carril 2) Blanco, carril 3) C+ de cacahuate, carril 4) Galleta Príncipe, carril
5) Chocolate Crunch, carril 6) galleta choco chispa y carril 8)galleta
maría69

## Ongenieria en Alimentos



Figura	3-8 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3 %, prueba de
	sensibilidad para la detección del alérgeno Ara h 2 de cacahuate. Carril
	1)M-100pb, carril 2) blanco, carril 4) 0.1µl de DNA de cacahuate-
	polvorón, carril 5) 0.3 μl de DNA de cacahuate-polvorón, carril 6)0.5 μl de
	DNA de cacahuate-polvorón, carril 7) 1 µl de DNA de cacahuate-polvorón,
	carril 8) 1.5 µl de DNA de cacahuate-polvorón, carril 7) 2 µl de DNA de
	cacahuate-polvorón71
Figura	3-9 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3 %, prueba de sensibilidad
	para la detección del alérgeno Cor a 8 de Avellana. Carril 1)M-100pb,
	carril 2) blanco, carril 4) 0.1µl de DNA de avellana-polvorón, carril 5) 0.3
	μl de DNA de avellana-polvorón, carril 6)0.5 μl de DNA de avellana-
	polvorón, carril 7) 1 μl de DNA de avellana-polvorón, carril 8) 1.5 μl de DNA
	de avellana-polyorón carril 9) 2 ul de DNA de avellana-polyorón 72

## Ingenieria en Alimentes



## Índice de tablas

Tabla 1-1 Clasificación taxonómica de ( <i>Arachis hypogaea</i> )5
Tabla 1-2 Subespecies y variedades de Arachis hypogaea L.¡Error! Marcador no
definido.
Tabla 1-3 Principales variedades (Arachis hypogaea)
Tabla 1-4 Composición química promedio de la semilla de cacahuate9
Tabla 1-5 Clasificación taxonómica de Avellana ( <i>Corylus avellana</i> )12
Tabla 1-6 Variedades más importantes de Avellana
Tabla 1-7 Composición química de Avellana ( <i>Corylus avellana</i> )15
Tabla 1-8 principales alérgenos alimentarios
Tabla 1-9 Principales alergenos contenidas en el cacahuate
Tabla 1-10 Principales alérgenos en Avellana
Tabla 1-11 Criterios principales
Tabla 2-1 Productos comerciales a analizar
Tabla 2-2 Primers seleccionados para Ilevar acabo la PCR
Tabla 2-3 Componentes de la PCR control positivo y pruebas de especificidad56
Tabla 3-1 Primer seleccionados
Tabla 3-2 Concentración y pureza de las muestras biológicas y comerciales 61



#### Resumen

Alérgenos ocultos en los productos alimenticios son, sobre todo para los consumidores alérgicos, un problema serio ya que incluso cantidades bajas pueden provocar reacciones alérgicas. Por lo que el fabricante debe colocar una advertencia independiente del listado de ingredientes del producto con una declaración del tipo "Puede contener...", "Fabricado en equipos que utiliza..." ó "Trazas de...", lo cual no siempre ocurre.

Por lo cual en el siguiente trabajo de tesis se realizó con la finalidad de detectar "trazas" de dos especies; Cacahuate con su alérgeno Ara h 2 y Avellana Cor a 8, no reportados en la etiqueta dentro de la lista de ingredientes.

Para cumplir dicho objetivo se utilizó la técnica de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR), usando el ADN obtenido de 11 muestras de productos como galletas, cereal y barras de chocolate; empleando primers específicos para cada especie que amplifican en el ADN genómico, lo cual se garantizó con una prueba de especificidad.

Se obtuvo resultados satisfactorios detectando los alérgenos en cuestión. En el caso del alérgeno Ara h 2 del cacahuate se obtuvo una banda doble determinando que corresponde una de las isoformas de dicho alérgeno Ara h 2.01 o Ara h 2.02 ya que guardan una similitud.



#### Introducción

Ciertos grupos de población muestran una hipersensibilidad frente a determinados alimentos o componentes de los mismos. La ingestión de estas sustancias, desencadenan una respuesta del sistema inmune en el individuo, generalmente mediada por inmunoglobulinas de tipo E. La alergia alimentaria puede aparecer durante la infancia o bien en la edad adulta (Domingo, 2005). Los alérgenos alimentarios son de origen animal o vegetal, siendo muchos de ellos compartidos por diferentes familias botánicas o zoológicas. Cada alimento contiene un número importante de proteínas potencialmente alergénicas. Las alergias alimentarias son un problema de salud importante en los países industrializados y que afecta a entre el 3% de la población adulta y 6-8% de los niños (Mustorp, 2011). La Organización para la Alimentación y la Agricultura, señalo que los alimentos comunes responsables de más del 90% de reacciones alérgicas graves son por consumir huevo de gallina, leche vaca, pescado, crustáceos, cacahuate, soya, trigo y frutos como avellana, almendra, nuez, y otros. Para evitar posibles reacciones potencialmente mortales, las personas alérgicas evitar estrictamente el consumo del alérgeno (Holzhauser, 2002). Sin embargo existen alérgenos ocultos en los productos alimenticios, debido a que los alimentos se contaminan durante el transporte, almacenamiento o en las líneas de producción. La legislación exige el etiquetado de los alimentos que contienen ingredientes alergénicos. (Mustorp, 2011).

Por lo que se determinaran en este proyecto alérgenos provenientes de la Avellana (*Corylus avellana*) que se utiliza ampliamente en la industria alimentaria, la cual contiene proteínas alergénicas, caracterizadas como miembros de la familia de proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) la cual contiene el alérgeno Cor a 8 (Holzhauser, 2002), y en Cacahuate (*Arachis hypogaea*) que contiene la proteína Conglutina (Stephan,2004) la cual es miembro de AAI\_LTSS (Alfa-Inhibidores de la amilasa (AAI), la transferencia de lípidos (LT) y Almacenamiento (SS) de proteínas de Semillas, en la cual se encuentra el alérgeno Ara h 2(Shengjuan,2011). Ambos alérgenos se encuentran en el DNA genómico (Holzhauser, 2002- Stephan, 2004). Entre las

### Ingeniería en Alimentos



técnicas rápidas de reciente aplicación al análisis de los alimentos se encuentran las genéticas, que se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. De estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada y permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática. Esta técnica se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para el control de la calidad de nuevos productos en la industria alimentaria, ya que permite identificar el origen de muchos de los componentes presentes en los alimentos. Los métodos genéticos de identificación de especies, a pesar de ser más caros y exigir un mayor soporte técnico, presentan importantes ventajas con respecto a los métodos de análisis de proteínas. Conviene señalar que las técnicas basadas en el ADN son especialmente útiles cuando se analizan productos sometidos a tratamientos térmicos intensos, debido a la estabilidad del ADN en dichos procesos por ello es una alternativa para garantizar la inocuidad del producto que en su etiqueta reporte que no contiene alguno de los alérgenos mencionados (Domingo, 2005).



## Capítulo 1 GENERALIDADES

## CACAHUATE (Arachis hypogaea)

### Origen de la especie

El cacahuate es la leguminosa de grano más cultivada en el mundo y originaria del *continente sudamericano. El* cacahuate ha llegado a ser en los últimos 50 años una de las oleaginosas más importantes, debido a la expansión del cultivo en regiones subtropicales de Estados Unidos, Asia y en los trópicos Africanos (Cruz, 1976).

Una prueba objetiva del origen Americano del cacahuate, la constituye el descubrimiento de granos semejantes a los de las variedades cultivadas actualmente en Perú, en tumbas precolombinas situadas en Ancon, Pachacamac y otros lugares, alrededor de 1875 (Cruz,1976).

Los españoles lo llevaron por Centroamérica y México en donde le dan el nombre Nahuatl de cacahuate, que significa "cacao de tierra". El origen y la historia de la difusión del maní en el mundo, explican la diversidad de los tipos existentes, primero en América del Sur y después en otras regiones del mundo a las que cabe considerar como centros de diversificación secundaria de la especie (Cruz,1976).

#### 1.1.2 Clasificación taxonómica

El cacahuate cultivado fue clasificado por Linneo en 1753 y pertenece a la familia de las Fabaceae, al género *Arachis* y la especie *hypogaea* (tabla 1-1). (Krapovickas y Gregory, 1995) clasificaron a *A. hypogaea* por regiones geográficas definiendo dos subespecies y seis variedades o razas botánicas (tabla 1-2).



Tabla 1-1 Clasificación taxonómica de (Arachis hypogaea)

Reino	Plantae	
División	Magnoliophyta	
Clase	Magnoliopsida	
Subclase	Rosidae	
Orden	Fabales	
Familia Fabacea		
Genero	Arachis	
Especie	Arachis hypogaea L.	

Fuente: Crisci, 1983.

### 1.1.3 Descripción Morfológica (Arachis hypogaea)

#### Raíz

El sistema radicular está constituido por una raíz pivotante central que origina un gran número de raíces secundarias y terciarias hasta llegar a los pelos absorbentes (Ceballos, 2002).

#### Tallo

Puede ser erecto a rastrero, en la mayoría de las variedades comerciales es erecto, su altura varía de 15 a 70 cm. Produce ramas desde la base, en general las ramificaciones son de color verde claro, verde obscuro, aunque también pueden ser púrpura en algunas variedades (Ceballos, 2002).

#### Hojas

Son hojas con dos pares de foliolos ovalados, obtusos o ligeramente puntiagudos, con márgenes lisos y de 4-8 cm de largo, las variaciones de la organización foliar dan a veces hojas de cinco, tres a dos foliolos e incluso de uno solo, las hojas pueden quedar reducidas a simples escamas, los foliolos tienen estomas en ambas caras y comprenden un mesófilo esponjoso que se presenta como un tejido capaz de almacenar agua, se repliegan durante la noche y se extienden de día (Ceballos, 2002).



#### Flores

Se presentan en pequeños racimos de tres a cinco flores, de las cuales solo una o dos alcanzan la madurez, son amarillas y de 0.9 a 1.4 cm de diámetro, formada por un estandarte grande, frecuentemente con manchas moradas y alas grandes de la quilla que es puntiaguda. Comúnmente las flores se auto fecundan (97%), clasificándose por esto al cacahuate como una planta típicamente autógama. Después de la fertilización, el pedicelo de la flor se alarga llegando a alcanzar de 5 a 20 cm, y aún más respondiendo a un fenómeno de geotropismo positivo; se entierra el ovario fecundado en donde completa su desarrollo y se inicia la formación del fruto (Ceballos, 2002).

#### Fruto

Es una vaina indehiscente de forma cilíndrica irregular de dos a siete cm de largo con dos a cuatro semillas. Se encuentran enterradas de 3 a 25 cm de la superficie del suelo; las vainas son abultadas, de color café amarillento, con bordes prominentes reticulados, más o menos estrechos entre las semillas. De la cantidad total de flores producidas, solo el 70% produce ginóforos que es en sí una parte del propio fruto y en cuyo extremo se desarrolla la vaina después de su penetración en el suelo y éstos solo alrededor de 30 a 40% producen fruto (Ceballos, 2002).

Las semillas son ligeramente redondas a ovalo-alargadas, con hilum puntiagudo, tiene una testa más o menos gruesa algo reticulada y posee dos cotiledones blancos de aspecto aceitoso, pueden llegar a medir hasta dos centímetros de largo y un centímetro de ancho. Su peso puede oscilar entre 0.2 y 2 g; las semillas constituyen el elemento económicamente importante por su riqueza en aceite y proteínas (Ceballos, 2002).



estambre B

pistilo

pericarpo

haces vasculares

cotiledón

fibras

ficema

xilema

Figura 1-1 Morfología del cacahuate (Arachis hypogaea)

## 1.1.4 Variedades más importantes de (Arachis hypogaea)

En la tabla 1-2 se describen las 3 principales variedades del cacahuate.

Tabla 1-2 Principales variedades (Arachis hypogaea)

Grupo español  Planta de tipo erecto con follaje color verde intenso, no n dos semillas por vaina, la cubierta seminal es de color cane vainas y semillas son pequeñas, con 2,200 a 3,600 semill kilogramo y un ciclo vegetativo de 90 a 110 días.			
	Comprende variedades de tipo rastrero y de porte erecto, pero con		
<b>Grupo</b> las siguientes características en común: semillas grandes,			
virginia con 2 o 3 semillas, follaje verde obscuro, más 1100 semilla			
	kilogramo y un ciclo vegetativo de 120 a 190 días.		
Grupo	Grupo Son plantas de tipo erecto, follaje verde obscuro, con 3 a		
valencia	semillas por vaina, la cubierta seminal es de color variable, desde		
	púrpura a rojizo, con un ciclo vegetativo de 90 a 110 días.		

Fuente: SAGARPA 2012.



#### 1.1.5 Condiciones adecuadas del cultivo

#### Condiciones edáficas

Son favorables los terrenos ligeros, arenosos, profundos, sin piedras, ni residuos vegetales. Debido a su hábito de fructificación, los suelos pesados no se aconsejan pues dificultan las penetraciones del ginóforo; en la cosecha, se reduce la calidad del fruto. Los suelos de textura arenosa permiten una germinación de los granos más rápida que un suelo limoso o arcilloso, los suelos pesados disminuyen las dimensiones y el peso de las vainas (Ceballos, 2002).

El cacahuate es capaz de producir en condiciones de pH que oscilen entre 4 y 8, lo recomendable es que sea cultivado en suelos con un pH cercano al neutro, ya que es susceptible a la salinidad y debido a que sus requerimientos de calcio no son buenos los suelos con pH muy bajo, pues se obstruye la absorción del calcio y molibdeno (Ceballos, 2002).

#### Condiciones climáticas

El maní se desarrolla bien en alturas desde 0 – 1000 msnm y en latitud 40° a 45° N y 30° S, con temperaturas oscilantes entre 25° y 30° C, aunque este cultivo puede soportar temperaturas mayores, es resistente a la sequía, requiriendo de 400 a 600 mm distribuidos en el ciclo, lo cual es suficiente para una cosecha aceptable. Una buena intensidad de luz influye al aumentar la fotosíntesis y la asimilación por la planta produciendo mayor desarrollo, necesitando de 10 a 13 horas de luz diarias favoreciendo a una buena producción de aceite (Ceballos, 2002).

## 1.1.6 Composición química de la semilla del cacahuate

La composición química de la semilla de cacahuate, puede observarse en la tabla 1-3.



Tabla 1-3 Composición química promedio de la semilla de cacahuate.

Componentes	% Peso seco
Humedad	5
Proteína	28.5
Lípidos	46.3
Fibra cruda	2.8
Extracto libre de nitrógeno	13.3
Cenizas	2.9
Azucares reducidos	0.2
Azucares disacáridos	4.5
Almidón	4.0

Fuente: (SAGARPA, 2002).

#### 1.1.7 Contexto Internacional - Nacional

#### 1.1.7.1 Contexto Internacional

En la figura 1-3 se muestran las principales siete oleaginosas producidas a nivel mundial, y el cacahuate ocupa el cuarto lugar.

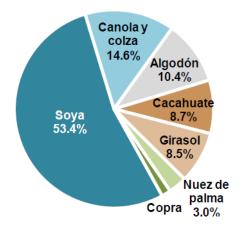


Figura 1-2 Principales Oleaginosas Producidas en el mundo Ciclo 2010/11 Fuente: Con base en datos del departamento de agricultura de los Estados Unidos.



El cacahuate es conocido prácticamente en todo el mundo, su consumo es muy popular destacando su producción en países como China, Estados Unidos e India en la figura 1-3 se muestra la producción en toneladas.

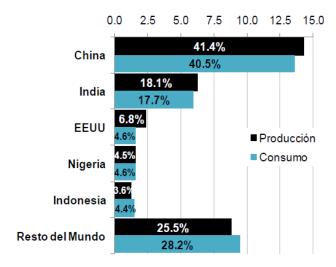


Figura 1-3 Principales países productores y consumidores de cacahuate ciclo 2010-2011

Fuente: Con base en datos del USDA

#### 1.1.7.1.2 Contexto Nacional

Sinaloa fue en el año 2009 el mayor productor de cacahuate en el país, al producir 20,125 ton cifra que represento el 24.9% del total nacional; Chiapas, Chihuahua, Puebla y Oaxaca también son importantes productores, en conjunto generaron poco más de la mitad de la producción nacional el 51.3%. Para el año 2010 siguió ocupado el primer lugar el estado de Sinaloa con una producción de 21,121.9 ton seguido del estado de Chihuahua con una producción de 20,565.54 ton. (SAGARPA, 2011).



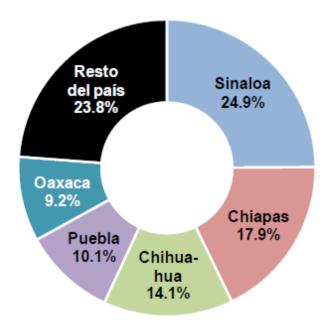


Figura 1-4 Producción de cacahuate en México.

Fuente: con base en datos de SIAP-SAGARPA (2010)

#### 1.1.8 Usos

El cultivo se utiliza de manera integral, como forraje para el ganado, para consumo humano directo o para la elaboración de productos industrializados. En el primer caso se consume tostado como fruto seco y en confitería, para la preparación de pan, dulces, galletas, ensaladas, etc. En el segundo caso se destina para la fabricación de aceite, harina, crema de cacahuate, tintas, lápices labiales, colores, jabón, entre otros (SIAP-SAGARPA, 2011).

## 1.2 Avellana (Corylus avellana)

### 1.2.1 Origen de la especie

El origen del avellano europeo, *Corylus avellana* L., se remonta al período terciario, en el hemisferio boreal, llegando a Europa después del período glacial. Muestras de polen fósil encontrado en turberas de Europa, indicarían



que desde el 7500 al 5000 A.C., ya estaba ampliamente difundido caracterizando las zonas boscosas junto a otras especies arbóreas como encinos, tilos y abetos (De Berasategui, 1997).

#### 1.2.2 Clasificación taxonómica

En la tabla 1-4 se muestra la clasificación taxonómica de la Avellana.

Tabla 1-4 Clasificación taxonómica de Avellana (Corylus avellana)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fagales
Familia	Betulaceae
Genero	Corylus,
Especie	Corylus avellana

Fuente: Germain y Sarraquigne,2004.

### 1.2.3 Descripción Morfológica

- Arbusto. El avellano europeo es una planta naturalmente arbustiva con ramas de color marrón claro grisáceo, que nacen en forma alternada y ubicadas sobre un plano con respecto al eje principal. La copa es extendida e irregular y produce una gran cantidad de renuevos o sierpes, variando su número según el cultivar (De Berasategui, 1997).
- Raíces. Se extienden horizontalmente siguiendo la proyección de la copa y presentan nudosidades de las cuales normalmente emiten los sierpes o vástagos (De Berasategui, 1997). Son superficiales, (40 a 50 cm de profundidad), y requieren de riego en veranos secos.



Desde el punto de vista vegetativo, se cree que el avellano no entra en estado de dormancia, porque se ha observado que en climas benignos exhibe crecimiento vegetativo durante todo el año (Lagerstedt, 1997).

- Hojas. Éstas son de color verde intenso en el haz, redondeadas, rugosas, doblemente aserradas, de base acorazonada y ápice puntiagudo.
   Aparecen alternadas y presentan un pecíolo muy corto acompañado de estípulas (Westwood, 1982; De Berasategui, 1997).
- Flores. La inflorescencia femenina está formada por cuatro a dieciséis flores y cada una posee un estigma bífido unido en su base y un solo ovario bilocular Están reunidas en un glomérulo de aspecto muy parecido a una yema vegetativa, de hecho, es una yema mixta formada por una parte vegetativa basal, con seis a siete entrenudos, y una parte superior fértil formada por cuatro brácteas, que poseen en sus axilas dos flores femeninas desprovistas de pétalos. Están ubicadas hacia la zona apical de las ramillas o brotes laterales del año en ramas de un año y se pueden reconocer únicamente en plena floración, durante el invierno, cuando aparecen en el extremo de las yemas florales los estigmas de color rojo intenso (Lobos, 1983 y DE Berasategui, 1997).
  - Frutos. Los frutos llamados avellana son nueces, o también denominados aquenios, porque provienen de un ovario monocarpelar. Son monospermos (con una sola semilla) (Font Quer, 2001).

Tienen una testa lisa color canela y un pericarpo leñoso que no se abre a la madurez (Grau, 2001). Los frutos se agrupan en racimos en un número de uno a doce, pero cada uno está encerrado en una cubierta foliácea o involucro, que varía en longitud de un cuarto hasta dos veces el largo de la nuez. Éste es irregularmente dentado y a veces, tubular (Westwood, 1982).



### 1.2.4 Grupos de variedades

Tiene alrededor de 15 especies, pero solo dos especies y sus híbridos tienen frutos aptos para una producción comercial (Germain y Sarraquigne, 2004). En la tabla 1-5 se describen las cinco principales variedades de la avellana.

Tabla 1-5 Variedades más importantes de Avellana

PRINCIPALES VARIEDADES		
Negretas. Tamaño grande, cáscara medio-dura, la almendra llena casi por completo la cáscara.	Garrofina. Análoga a la negreta. Negreto capellut. Pauetet.	
Comunas. Constituye un bloque de avellanas distintas de las negretas, variable en tamaño y color del grano (desde blanco a rosado).	Morell: Avellana blanca Gironell: Grossal, la comuna más frecuentemente cultivada.	
Cáscara gruesa	Culplá: Superficie rugosa. Grifoll. Trenet. Ribet. Grossal: Castaynera. Asturiana	
VARIEDADES TURCAS (C. avellana y C. colurna)	Tombull. Cakildak. Mincane. Palaz. Karafindik. Fosa. Sivri.	
VARIEDADES ITALIANAS	Mortarella. San Giovani. Tonda (romana, langhe gentile). Siciliana.	

Fuente: Falder 2004

#### 1.2.5 Condiciones adecuadas de cultivo

El avellano europeo es un frutal de nuez conocido por su rusticidad. Se adapta a diversas condiciones edafoclimáticas, siendo más exigente en las condiciones de clima que en las de suelo (Grau, 2001).

#### • Requerimientos climáticos

Es una especie bastante resistente, pero sólo produce cosechas satisfactorias en condiciones moderadas de clima, con veranos frescos e inviernos benignos,



sin grandes oscilaciones de temperatura. Las temperaturas medias anuales deben oscilar entre 12 y 16 °C, y dependiendo del cultivar, requiere entre 700 a 1200 horas de frío bajo 7 °C desde la caída de las hojas, para que se produzca la floración (Lobos, 1983 y Grau, 2001).

Los factores climáticos adversos para el cultivo son temperaturas inferiores a – 7 °C a nivel de órganos florales, lluvias prolongadas en la época de polinización, y vientos fuertes en noviembre – diciembre, que provocan la caída de brotes y pequeños frutos (Lobos, 1983).

#### Requerimientos edáficos

Prefiere suelos ligeramente ácidos a neutros (pH 6,8 a 7,2), aunque en Europa también crece en suelos más ácidos o más alcalinos desde pH 5,5 hasta pH 7,8. No requiere de suelos muy profundos, ya que su sistema radical es superficial, sin sobrepasar los 40 cm a los 10 años de edad, pero sí con un buen drenaje, dado que no tolera asfixias radiculares (Grau, 2001).

Se adapta a suelos de distintas naturalezas, salvo los excesivamente arenosos o arcillosos.

### 1.2.6 Composición química de la avellana

La composición guímica de la avellana, puede observarse en la tabla 1-6.

Tabla 1-6 Composición química de Avellana (Corylus avellana).

Componentes	% Peso seco	
Agua	5 – 6	
Lípidos	55 – 72	
Proteínas	10 – 22	
Carbohidratos	3 – 11	
Fibra	5 – 7	
Minerales	2 – 3	

Fuente: GRAU (2003).



### 1.2.7 Principales países productores de Avellana

Se cultiva principalmente en el sur de Europa, alrededor del Mediterráneo, en Italia y España, en Asia alrededor del Mar Negro, en Turquía, y en el noroeste de Estados Unidos, en la parte occidental de los estados de Oregón y Washington (Germain y Sarraquigne, 2004).

En Turquía, gran parte de la población se dedica a la cosecha y empaque de las avellanas para su posterior procesamiento, convirtiéndose en el país donde esta actividad es la de mayor importancia (Aliniazee, 1998), ya que Turquía es el país que controla el 75% de la cosecha mundial (año 2004). Chile por su parte cuenta con un bajo volumen de producción actual, pero en va en constante crecimiento. No obstante, la demanda comercial de la avellana a nivel mundial es bastante estable, y se ha transformado en una buena alternativa de producción y exportación. Además, los mercados internacionales están exigiendo frutos de alta calidad, que el país está en condiciones de entregar (Sarigedik, 2005).

#### 1.2.8 Usos

La producción de avellanas se destina al consumo de mesa (con cáscara), que adquiere mayor o menor importancia según los países y a la industria (sin cáscara), que absorbe la mayor parte de la producción mundial.

Estados Unidos, regula las normas para las avellanas de consumo de mesa con cáscara, y Turquía, regula las normas para la industria, y además establece otras normas para el consumo de mesa. Ambos países designan los calibres (en milímetros) y las características de los respectivos frutos o semillas (DE Berasategui, 1997).

Las avellanas para la industria están clasificadas en tres categorías:

Standard 1 (13 a 16 mm), Standard 2 (11 a 13 mm) y Standard 3 (9 a 11 mm), y otras que incluyen a los tamaños extremos de más de 16 mm o menos de 9 mm (De Berasategui, 1997).



La industria, el mayor consumidor de fruta pelada, le da distintos usos según la variedad, el tamaño y la calidad, correspondiendo sobre el 70% del consumo mundial a la industria de chocolates y, en general, a la repostería (Grau, 2001). Específicamente, la semilla entera se emplea como núcleo de confites y, tostada o salada, para aperitivos; los trozos grandes o pequeños en pastelería y las avellanas machacadas para pasta de chocolate, cremas y helados (DE Berasategui, 1997).

## 1.3 ALÉRGENOS

### 1.3.1 Definición de alérgeno

Alérgeno es una palabra compuesta que proviene de un término griego; *Allos*= otro, *ergon*= actividad. *genes*= producción. La palabra alergia; la creó en 1906 un médico austríaco llamado Von Pirquet especializado en el estudio de reacciones del organismo frente a diversas sustancias (Mario, 2001).

Un alérgeno es un antígeno que provoca la producción de IgE por parte del sistema inmune, e induce, tras unirse a esta inmunoglobulina, una reacción alérgica. Inicialmente el término alérgeno se refería a lo que hoy denominamos fuentes de alérgenos, es decir, los pólenes, ácaros, mohos, alimentos, etc. Hoy se sabe que cada una de esas fuentes tiene varios componentes o moléculas alergénicas, designados como alérgenos (Reina, 2003).

## 1.3.2 Propiedades generales de los alérgenos

Los alimentos que más comúnmente inducen reacciones alérgicas son alimentos con alto contenido proteico, fundamentalmente de origen vegetal o marino. Estos alimentos contienen una gran cantidad de proteínas, pero solo unas cuantas son las responsables de la respuesta alérgica, ya que tienen la particularidad de inducir la producción de inmunoglobulina e (IgE) y provocar alergia. No se conoce una característica molecular biológica común entre los alérgenos que explique su capacidad alergénica. Aunque no están totalmente



claras las propiedades comunes responsables del carácter alérgico de estas proteínas, si se han identificado algunas como son (Puerta, 1998).

- Abundancia los alérgenos alimentarios son frecuentemente la principal fracción del contenido proteico total de un alimento, aunque hay algunas excepciones (Astiasaran, 2003).
- Peso molecular la proteína debe ser lo sufrientemente grande como para poner en marcha una respuesta inmune y tener el tamaño suficiente para unirse a dos moléculas de IgE. Además, debe ser lo suficientemente pequeña como para atravesar la barrera de la mucosa intestinal. Se ha observado que la mayor parte de los alérgenos son proteínas con un peso molecular entre 10 y 70 kD, aunque hay excepciones a estas restricciones de tamaño (Astiasaran,2003).
- Punto isoeléctrico y la glicosilación la mayor parte de los alérgenos son glicoproteínas con un punto isoeléctrico acídico (Astiasaran,2003).
- Resistencia al calor la resistencia al calor es probablemente la característica más común entre los alérgenos alimentarios más potentes. De hecho, en algunos casos el tratamiento térmico incluso incrementa la alergenicidad de una proteína alimentaria, como ocurre con la semilla de soya, el arroz y el apio minuto (Astiasaran,2003).
- Resistencia a la digestión una de las características más importantes de los alérgenos alimentarios es su capacidad de atravesar la mucosa intestinal. En esto juega un papel fundamental el tamaño de la molécula pero también su resistencia a la digestión. En este sentido, se ha demostrado que la mayor parte de estos resistían la digestión hasta por una hora, mientras que las proteínas no alergénicas fueron digeridas por un minuto (Astiasaran,2003).



#### 1.3.3 Clasificación

La Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica publicó en el año 2003 una clasificación de las reacciones adversas a alimentos basada en la de la Academia Europea (Figura1-5). Si se demuestran mecanismos inmunológicos en la patogenia, el término adecuado es el de AA y, si está implicada la IgE, AA mediada por IgE (Cardona, 2006).

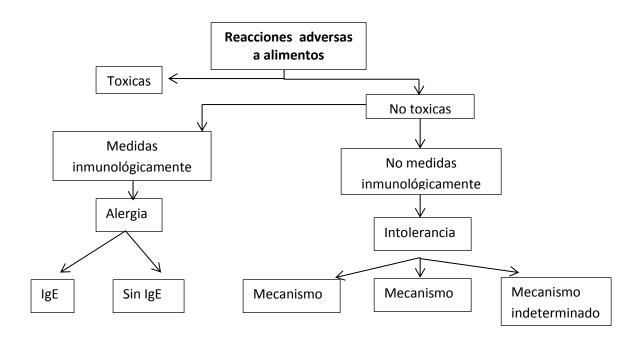


Figura 1-5 Clasificación de las reacciones adversas a alimentos según los mecanismos que las producen. Ig: inmunoglobulina.

### 1.3.4 Nomenclatura de alérgenos

Su nomenclatura se ha unificado en base a las recomendaciones publicadas por la Organización Mundial de la Salud en 1994. De este modo los alérgenos se nombran con las tres primeras letras del género y la primera letra de la especie. El número arábigo que acompaña a las letras denota o el orden de identificación del alérgeno dado o bien su importancia en las enfermedades alérgicas, por ejemplo, los alérgenos de *Olea europaea* Ole e 1, Ole e 2,.... (WHO, 1994). Hasta 1994 los alérgenos se nombraban siguiendo la misma regla pero escribiendo la letra de la especie en itálica y el número en



numeración romana; así, los alérgenos de *Olea europaea* sería Ole *e* I, Ole *e* II, etc (Soler- Escoda *et al*, 2005).

### 1.3.5 Definición de alergia alimentaria

La alergia alimentaria o hipersensibilidad alimentaria alérgica es la reacción inmunológica adversa causada por mecanismos inmunológicos mediados o no por IgE. Es una enfermedad compleja, influida no sólo por factores de herencia poligenética sino también medioambientales. Se han implicado factores de riesgo pre y posnatales, con resultados variables y controvertidos; por tanto, es importante basarse en evidencia científica para dilucidar su verdadero papel en esta enfermedad. De los agentes estudiados, los principales factores de riesgo asociados con alergia alimentaria son la herencia atópica, la falta de lactancia materna exclusiva por al menos tres a seis meses y el destete temprano (antes de los cuatro a seis meses de vida (Hidalgo, 2009).

Si bien hay más de 160 alimentos que pueden provocar reacciones alérgicas en las personas que sufren de alergias alimentarias, la nueva ley identifica los ocho alimentos alergénicos más comunes. Estos alimentos ocasionan el 90 % de las reacciones alérgicas alimentarias y son las fuentes de las que se derivan muchos otros ingredientes (FDA, 2010). En la tabla 1-7 se enlistan los 8 principales alérgenos alimentarios.

Tabla 1-7 principales alérgenos alimentarios

#### Los ocho alérgenos alimentarios más importantes son:

- 1. Leche
- 2. Huevos
- 3. Pescado (ej.: perca, lenguado, bacalao)
- 4. pCrustáceos (ej.: cangrejo, langosta, camarones)
- 5. Frutos secos (ej.: almendras, nueces, pacanas)
- 6. Maníes
- 7. Trigo
- 8. Soya

Fuente: FDA, 2004.



Estos ocho alimentos y cualquier ingrediente que contenga proteínas derivadas de uno o más de ellos, se encuentran designados en la ley FALCPA como los "principales alérgenos alimentarios". Ley sobre el Etiquetado de Alérgenos Alimentarios y Protección al Consumidor (FALCPA, Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act) de 2004, aprobada en 2004 por la FDA (FDA, 2010).

### 1.3.6 Alérgenos de origen vegetal (Frutos secos)

La denominación de frutos secos a algunos alimentos es debida a su consumo de forma desecada. Su única similitud se debe a su analogía funcional, es decir, todos ellos son de semillas de diferentes plantas no relacionadas botánicamente, por lo que no se puede encuadrar en ninguna definición botánica.

Contribuyen de forma importante a la alimentación humana, por su riqueza en proteínas. Este grupo está compuesto por almendra, cacahuate, nuez, avellana, castaña, piñón, pepas de girasol y pistacho. Están presentes en diferentes alimentos, ensaladas, postres, bebidas, cereales para desayuno, chocolates, pasteles, y ensaladas, generalmente de forma disgregada de pequeño tamaño, hecho importante debido a su posible ingestión de forma inadvertida.

Se ha descrito por diversos autores la posible reactividad cruzada entre los diferentes frutos secos (Garcia,1993).

A continuación se mencionan las regiones del Cacahuate y Avellana que dan a estas especies la propiedad de alérgeno.



# 1.3.6.1 Alérgenos en el Cacahuete (*Arachys hypogeae*) Ara h 2

En la tabla 1-8 se enlistan los alérgenos contenidos en las proteínas del cacahuate.

Tabla 1-8 Principales alergenos contenidas en el cacahuate

	Alérgeno	Función/tipo	Peso molecular (kD)
	Ara h 1	Vicilina	63,5
	Ara h 2	Conglutina	17
	Ara h 3	Glicinina	60
Cacahuate	Ara h 4	Glicinina	37
	Ara h 5	Profilina	15
	Ara h 6	Homologo: Conglutina	15
	Ara h 7	Homologo: Conglutina	17
	Ara h 8	PR-10	17

Fuente: (Salas ,2005)

En la figura 1-6 se muestran los pesos moleculares de algunos alérgenos del cacahuate.

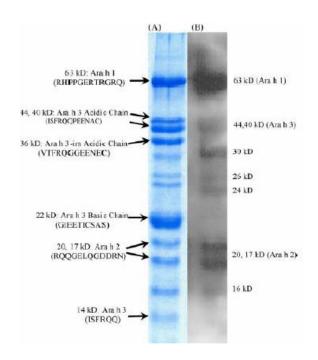


Figura 1-6 Pesos moleculares de algunos alérgenos del cacahuate

Fuente: Kang and Gallo, 2007. Plant Sci. 172:345



Las proteínas del cacahuate se clasifican como albuminas (solubles en agua) y globulinas (solubles en suero salino). Estas últimas se dividen en araquina y conaraquina. Se han aislado dos alérgenos principales del cacahuate, Ara h 1 y Ara h 2, con pesos moleculares de 63,5kD y 17kD, respectivamente (Yuyinger,1987). Sin embargo se ha demostrado que diversos componentes proteicos son alergénicos, incluyendo la araquina y conaraquina (Bush, 1990).

Aunque cerca de 11 alérgenos de maní se han reportado, Ara h 1 (Arachis hypogaea) 1, 2, 3 se clasifican como los principal alérgenos del cacahuate. El Ara h 2 existe como un miembro de AAI\_LTSS (Alfa- Inhibidores de la amilasa (AAI), la transferencia de lípidos (LT) y Almacenamiento de proteínas en las Semillas (SS) (Lehmann et al, 2003). La resistencia a la digestión enzimática con la pepsina y el calor es la propiedad común de los tres alérgenos.

El tipo de preparación empleada en el consumo de este alimento es determinante puesto que a temperaturas de tostado en seco (150°C) incrementa el potencial alergénico de tres de los alérgenos mayores del cacahuate en mayor grado que las temperaturas empleadas para hervirlos (100°C) o freírlos (120°C) (Bush, 1990).

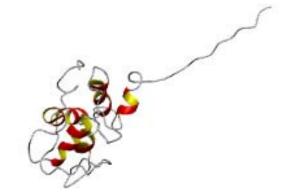


Figura 1-7 Estructura tridimensional de alérgeno Ara h 2

Ara h 2 es una glicoproteína con masa molecular de 17-19 kDa y un punto isolectrico de 5.2, corresponde a un miembro de la familia 2S albumina. El modelado molecular basado en el Ara h 2 y otros alérgenos de 2S albúmina mostró que

comparten un armazón estructural tridimensional común, formado por 5 α-hélices arregladas en una superhélice con giro a la derecha y conecta por rizos más o menos extendidos. La estructura tridimensional es estabilizada por puentes disulfuro, los cuales están conservados entre todos los miembros de la



superfamilia 2S albúmina. Ara h 2 difiere de otras 2S albúminas por 2 rizos adicionales en los extremos N-terminal y C-terminal de la cadena de polipéptido, respectivamente.

(http://nutricionpersonalizada.wordpress.com/2011/05/24/caracteristicas\_alerge\_nos\_cacahuate/)

Se ha identificado que el Ara h 2 tiene dos isoformas, Ara h 2.01 y Ara h 2.02 (Figura 1-8), codificadas por los genes homólogos con tamaños moleculares de 17 y 19 kDa, respectivamente. Este último tiene una duplicación de 12 aminoácidos en el medio de la secuencia que contiene un epítopo lineal que se une fuertemente IgE (Xueni et al, 2013).

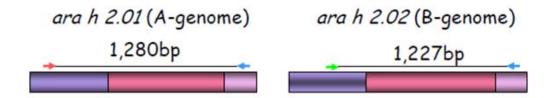


Figura 1-8 Genes A (Ara h 2.01) y B (Ara h 2.02)

Fuente: Ozias – Akins et al., 2006 Hypoallergenic foods beyond infant formulas. In food Allergy.ASM. Prees, Herdon, VA.

En la figura 1-9 se muestra la comparación de la alineación parcial de los nucleótidos del alérgeno Ara h 2 respecto a sus isoformas Ara h 2.01(A) y Ara h 2.02 (B), donde se observa la similitud que existe entre dichos alérgenos.

# Ingeniería en Alimentos



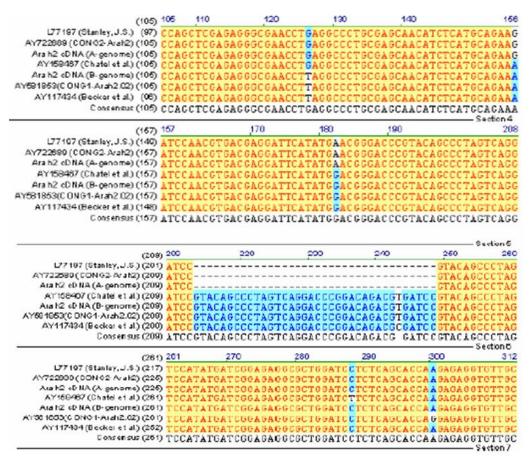
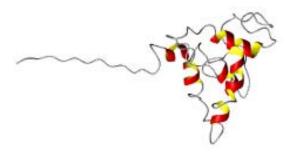


Figura 1-9 Secuencia parcial de nucleótidos de la alineación de los Genes A (Ara h 2.01) y B (Ara h 2.02) respecto al Ara h 2



El **Ara h 6** es 60% idéntico con el **Ara h 2, y** es por tanto tratado como un alérgeno más que como un isoalergeno.

(https://nutricionpersonalizada.wordpress.co m/2011/05/24/caracteristicas alergenos caca huate/#top )

Figura 1-10 Estructura tridimensional de alérgeno Ara h 6

En la figura 1-11 se muestra la comparativa de los nucleotidos de los alergenos Ara h 2 y Ara h 6 que corresponde al 60% anteriormente mencionada entre la secuencia de nucleotidos de ambos alergenos .

# Ingeniería en Alimentos



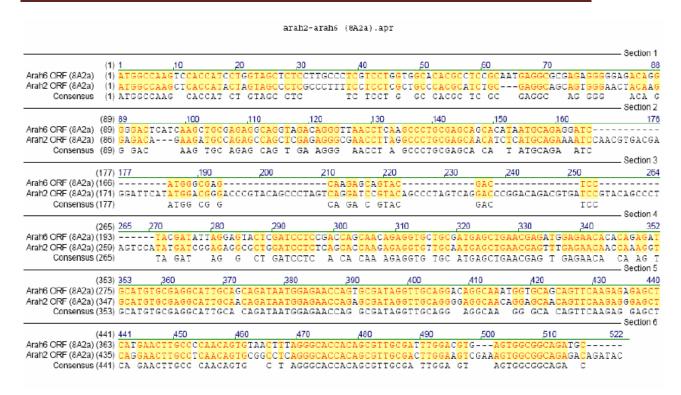


Figura 1-11 Comparación de nucleótidos del alérgeno Ara h 2 respecto al alérgeno Ara h 6

Se ha demostrado que los alérgenos Ara h 2.01, Ara h 2.02, y Ara h 6 tienen una potencia similar y que no hay una similitud funcional significativa entre Ara h 2 y Ara h 6; sin embargo tanto el Ara h 2 y Ara h 6 contienen múltiples residuos de cisteína con puentes desulfuro, lo que resulta en una fuerza en espiral, estable al calor, resistente a la proteasa estructura de núcleo que puede ser importante para la alergenicidad (Xueni *et al*, 2013).

# 1.3.6.2 Alérgenos en la avellana (Corylus avellana) Cor a 8

En la tabla 1-9 se enlistan los principales alérgenos contenidos en las proteínas de la avellana.



Tabla 1-9 Principales alérgenos en Avellana

	Alérgeno	Función/tipo	Peso molecular (kD	
Avellana	Cor a 1	PR-10 (homologo Bet v 1)	17	
	Cor a 2	Profilina	14	
	Cor a 8	PR-14 (LTPs)	9	
	Cor a 9	Globulina (11S)	40	
	Cor a 11	Vicilina (7S)	48	

Fuente:(Salas,2005)

El alérgeno de la avellana (Cor a 8) es miembro de la familia de proteínas de transferencia de lípidos (LTPs). Las LTPs son proteínas de defensa ampliamente distribuidas en distintos tejidos de las plantas, lo que sugiere su potencial papel como panalergenos responsables de reacciones cruzadas entre frutas, semillas y pólenes. La alta estabilidad térmica y digestiva de estas proteínas posibilita su actuación como alérgenos en alimentos o bebidas (Sanchez,2001).

# 1.3.7 Normatividad en alimentos para alérgenos

# 1.3.7.1 Etiquetado

En los apartados de la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010 menciona;

**3.16** Etiqueta, cualquier rotulo, marbete, inscripción, imagen u otra materia descriptiva o gráfica, escrita, impresa, estarcida, marcada, grabada en alto o bajo relieve, adherida, sobrepuesta o fijada al envase del producto preenvasado o, cuando no sea posible por las características del producto, al embalaje ( NOM-051-SCFI/SSA1-2010).

# **Apartado 4. Especificaciones**

#### 1.1 Requisitos generales del etiquetado

**4.1.1** La información contenida en las etiquetas de los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados debe ser veraz y describirse y presentarse



de forma tal que no induzca a error al consumidor con respecto a la naturaleza y características del producto (NOM-051-SCFI/SSA1-2010).

- 4.2.2.2 están exentos de su declaración en la lista de ingredientes los aditivos transferidos a los alimentos ٧ bebidas no alcohólicas una función preenvasados que ya no cumplan tecnológica en el producto terminado, así como los coadyuvantes de la elaboración . excepto aquellos que puedan causar hipersensibilidad ( NOM-051-SCFI/SSA1-2010).
- **1.2.2.2.3** se deben declarar todos aquellos ingredientes o aditivos que acusen hipersensibilidad, intolerancia o alergia, de conformidad con los ordenamientos jurídicos correspondientes (NOM-051-SCFI/SSA1-2010)..

Se ha comprobado que, los siguientes alimentos e ingredientes causan hipersensibilidad y deben declararse siempre:

Cereales que contienen gluten : por ejemplo trigo, centeno , cebada, avena espelta o sus cepas hibridas , y productos de estos ( NOM-051-SCFI/SSA1-2010).

Crustáceos y sus productos de los huevos, pescados y productos pesqueros, cacahuate y sus productos, soya y sus productos (excepto el aceite de soya), leche y productos lácteos (incluida la lactosa), nueves de árboles y sus derivados , derivados en concentraciones de 10 mg/kg o más ( NOM-051-SCFI/SSA1-2010).

#### Apartado 7. Leyendas

#### 7.1 Leyendas precautorias

- **1.1.1** Las leyendas precautorias deben hacer referencia al ingrediente u origen del ingrediente que, basado en información científica reconocida , se asocie a riesgos reales o potenciales relacionados con la intolerancia digestiva, alergias o enfermedades metabólicas o toxicidad.
- **1.1.2** Las leyendas precautorias especificas por producto, se establecerán en las normas oficiales mexicanas correspondientes u otros ordenamientos jurídicos ( NOM-051-SCFI/SSA1-2010).



# 1.4 Aplicaciones biotecnológicas en la detección de alérgenos

En primer lugar, se revisarán las distintas técnicas moleculares de detección de proteínas, los cuales son compatibles con las técnicas moleculares. Más adelante se analizará una descripción más detallada de las técnicas de detección basadas en el análisis de ADN (Lopez, 2003).

# 1.4.1 Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

La detección de proteínas puede realizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas de la muestra. Por este motivo, las técnicas moleculares que suponen el manejo de proteínas son aplicadas en aquellos casos en los cuales se dispone de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente y con la calidad adecuada. A continuación se describen 3 de las tecnologías más utilizadas en el análisis de proteínas para la trazabilidad alimentaria (Lopez,2003).

#### 1.4.1.1 ELISA

Análisis mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay o ensayo ligado a enzima) detectan o miden la concentración de proteína de interés en la muestra que puede contener numerosas proteínas distintas. Se utiliza un anticuerpo, fijado a un soporte, que se une específicamente a la proteína diana. Un segundo anticuerpo conjugado a una enzima genera un producto cuyo color es visible al añadir un sustrato determinado, y es fácilmente cuantificar mediante una curva patrón de la proteína de interés (López, 2003).

Frente a las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos (ADN), los análisis ELISA presentan menor sensibilidad y fiabilidad , siendo sin embargo



por ello, menos susceptible a originar resultados erróneos ("falsos negativos" o "falsos positivos") .Por otra parte se necesita desarrollar previamente anticuerpos que reconozcan específicamente la proteína diana que se desea identificar. Estas técnicas que permiten cuantificar están limitadas a alimentos no procesados, es decir, no sometidas a tratamientos que hayan podido alterar la mencionada proteína (López, 2003).

#### 1.4.1.2 Western Blot

El análisis de western blot es utilizado para la identificación de proteínas que son inmunorreactivas a un anticuerpo específico. Las proteínas son separadas mediante electroforesis en geles de SDS (Poliacrilamida Dodecilsulfato sódico; PAGE). Además, western blot puede ser usado para una proyección de los cambios de expresión de una proteína en diferentes condiciones. sometido al análisis es homogenizado y las proteínas de dicho tejido se separan en los geles durante la electroforesis (en base a su peso molecular), visualizándose en bandas. La capacidad migratoria de las diferentes proteínas fundamentalmente por su peso molecular, ya que en SDS está dada moléculas de SDS (con carga negativa) desnaturalizan las proteínas v confieren a los polipéptidos una carga neta negativa uniforme a lo largo de la cadena de aminoácidos. Finalmente, las bandas se transfieren a membranas de nitrocelulosa, nylon u otros compuestos sintéticos; las cuales se incuban con anticuerpos específicos para la proteína que se desea localizar; y que servirá como sustrato para la fijación de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa u otra enzima reveladora. El revelado es mediante un agente quimioluminiscente o cromogénico, que pone en evidencia a la proteína que reaccionó frente al anticuerpo específico (Leonidas,2003).

# 1.4.1.3 Métodos de análisis basados en la detección de ADN

Los métodos analíticos basados en la detección de ADN suelen emplearse cuando el alimento ha sido procesado o bien tratado fisicoquímicamente



(calor, presión, etc.), ya que la proteína pudo haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios. El ADN en cambio pudo haberse fragmentado durante el proceso en trozos pequeños pero ello no implica necesariamente que no pueda ser detectado. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor en el proceso, todavía es posible obtener pequeños fragmentos que son suficientes diferencias de secuencias como para hacer posible un estudio.

#### 1.4.2 Estructura del ADN

Los cromosomas son estructuras celulares que se encuentran localizados en el núcleo de las células y están formados por proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN). La información genética reside en el ADN y los genes son segmentos específicos de esta cinta genética llamada ADN. Es importante recalcar que cada ser vivo tiene un número específico y diferente de cromosomas, con relación a los demás organismos vivos (Bolivar, 2007).



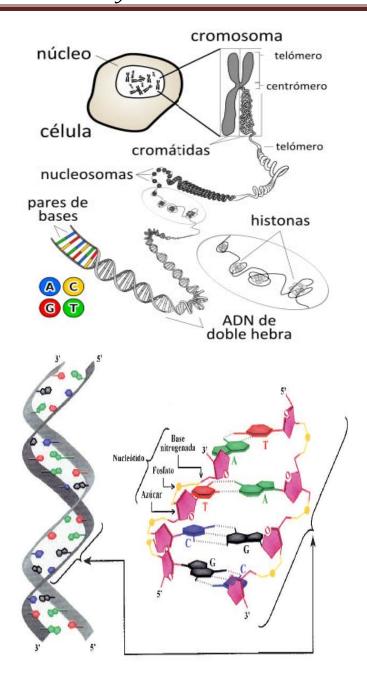


Figura 1-12 Estructura del ADN

El ADN es una doble hélice, formado por dos hebras o cadenas complementarias donde cada una de ellas es un polímero integrado por millones de nucleótidos que son los monómeros del polímero. Cada nucleótido está formado por una molécula de azúcar llamada desoxirribosa, una base púrica o pirimídica y un grupo fosfato. Las dos cadenas de ADN son antiparalelas y se unen entre sí a través de enlaces tipo "puentes de hidrógeno"



(uniones químicas débiles) que se forman entre las bases complementarias (A-T y G-C); significa que en una molécula de ADN, siempre habrá la misma cantidad de adenina (A) que de timina (T) y la misma de citosina (C) que de guanina (G) entre las dos hebras del ADN. De esta manera se obtiene una estructura tipo doble hélice, donde las bases de los nucleótidos se encuentran orientadas hacia el interior de la doble hélice y los grupos fosfato, y las azúcares desoxirribosas, hacia su exterior, formando los esqueletos fosfodiester de cada hélice. Los pares de nucleótidos se encuentran separados entre sí por 3.4 Aº y cada diez pares de nucleótidos (34 Aº), se alcanza una vuelta de la hélice (Bolívar, 2007).

### 1.4.2.1 Las células eucariontes

Son células que tienen en promedio un tamaño de varios miles de veces mayor al de las células procariontes y cuya estructura, organización y complejidad es también mucho mayor que el de las bacterias (Bolívar, 2007).

Las células de los organismos eucariontes tienen una membrana plasmática que las delimita pero que también permite la comunicación con las otras células del organismo. Al igual que en los procariontes, la membrana está compuesta por lípidos y proteínas e incluye una gran cantidad de subestructuras y organelos celulares (Bolívar, 2007).

En la figura 1-13 se muestra la composición y organización de los orgánelos celulares que integran las células de los eucariontes, que incluye a la especie humana.



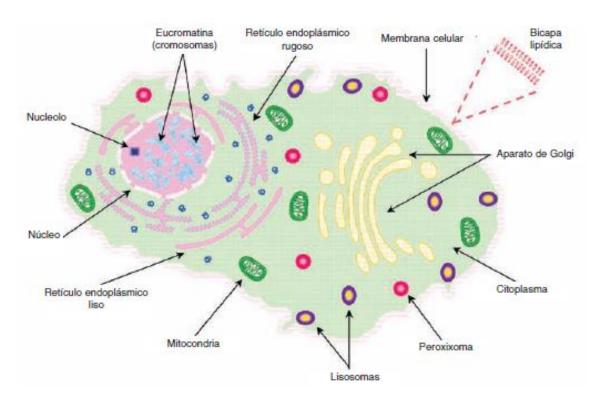


Figura 1-13 Esquema de la célula Eucarionte

# 1.4.2.2 Características del ADN genómico o nuclear

El ADN genómico se refiere a todo el ADN presente en la célula de un organismo. Bajo una generalización simple, del genoma puede enunciarse como el conjunto de todos los genes de una célula, incluyendo los de las estructuras celulares (plásmidos, cloroplastos y mitocondrias) (Bolívar, 2007). La diferencia más importante entre las células de los procariontes y los eucariontes radica en que estos últimos tienen sus cromosomas contenidos o aislados del resto de los organelos celulares, por una membrana nuclear, conformando lo que se conoce con el nombre del núcleo de la célula eucarionte; los cromosomas son las estructuras u organelos celulares en los reside la información genética en las moléculas del ácido que desoxirribonucleico o ADN. Los cromosomas son estructuras formadas por la asociación de ADN con proteínas y también con moléculas de ácido ribonucleico o ARN. Las proteínas y los ARN s asociados a los cromosomas llevan a cabo funciones reguladoras y estructurales; entre estas proteínas se encuentran las histonas. En el núcleo de la célula, se lleva a cabo el proceso



de transcripción del ADN en ARN, y el fenómeno del procesamiento del ARN, para formar moléculas maduras de ARN mensajero, de transferencia y ribosomal. El fenómeno de procesamiento del ARN, adquiere importancia, ya que es responsable de la formación en muchos casos, de varias moléculas de ARN mensajero diferentes a partir de un solo gene (Bolívar, 2007).

#### 1.4.2.3 ADN mitocondrial

Es el organelo celular responsable del proceso de la síntesis biológica del ATP (adenosin trifosfato), que es la molécula que provee la energía para la mayor parte de las reacciones de biosíntesis en la célula. El ATP se sintetiza enzimáticamente mediante un proceso conocido con el nombre de fosforilación oxidativa. La mitocondria posee su propio material genético (que es un solo cromosoma), en donde reside la información para sintetizar muchas de las proteínas involucradas en este proceso (Bolívar, 2007).

### 1.4.2.4 ADN de cloroplastos

Las células de las plantas, además de las mitocondrias, contienen también los cloroplastos, que son organelos involucrados en el proceso de la fotosíntesis. Los cloroplastos también contienen su propio material genético. El proceso de la fotosíntesis es fundamental para la vida en la Tierra, y permite fijar la energía solar a través de un pigmento conocido con el nombre de clorofila (que además es responsable del color de las plantas) y a través de este proceso generar también ATP, como molécula de alta energía, para llevar a cabo las funciones celulares (Bolívar, 2007).

Una de las principales técnicas utilizadas para la detección de dianas moleculares es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

#### 1.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa

No cabe ninguna duda de que la técnica más revolucionaria de los últimos 15 años ha sido la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que ha dado nuevas perspectivas a la propia ingeniería genética y a toda la biología



molecular. Fue inventada por Kary Mullis a mediados de los años 80 (Rodríguez et al ,2004).

Muchas de las técnicas clásicas de la ingeniería genética estaban encaminadas a resolver el complejo problema de como clonar o localizar un gen en un segmento de ADN .Sin embargo esas técnicas son a menudo largas y tediosas, y no es raro que no den resultados. La PCR ha venido a cambiar el panorama, ya que permite en principio producir *in vitro* grandes cantidades de una secuencia de ADN concreta sin recurrir a la clonación en un organismo huésped. Esencialmente la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conociendo las secuencias que lo flanquean (Rodríguez et al ,2004).

#### 1.5.1 Fundamento

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de este es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores .Su copiado se logra de manera exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen millones de copias de la secuencia deseada (Rodríguez et al ,2004).

# 1.5.2 Componentes de la reacción

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearan en las cadenas simples del ADN, la mezcla de cuatro desoxirribonucleosidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultrapura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 μl y la enzima ADN polimerasa termoestable que es crucial durante la reacción (Rodríguez *et al* ,2004).



#### • Solución amortiguadora

La solución amortiguadora para la reacción se emplea, comúnmente, concentrada 10 veces, y por lo general incluye Tris-HCl (pH=8 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y MgCl<sub>2</sub> (Rodríguez *et al*,2004).

#### Magnesio

Tanto el ion magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila entre 0.5 y 2.5mM. La concentración de MgCl<sub>2</sub> debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general concentraciones suficientes de Mg<sup>+2</sup> dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas (Rodríguez *et al* ,2004).

#### Desoxirribonucleosidos trifosfatados (dNTPs)

Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construye las nuevas cadenas de ADN. La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso puede llegar a inhibir su actividad .También afecta la fidelidad de la reacción el uso de concentraciones desbalanceadas de estos cuatro componentes , siendo las concentraciones usuales, en la mayoría de los casos , entre 0.2 a 1 mM (Rodríguez *et al* ,2004).

Los dNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de Mg<sup>+2</sup> sea de 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los dNTPs (Rodríguez *et al* ,2004).



#### Cebadores o iniciadores

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las cadenas separadas del templado de ADN.

Estos son el componente más sensible que determina el éxito de la PCR.

#### Enzima

Solo se puede utilizar polimerasas que sean capaces de actuar a las temperaturas empleadas en la reacción. En la actualidad la mayoría de las polimerasas que se suministran comercialmente son versiones recombinantes e incluso mejoradas por la ingeniería genética.

Dos enzimas de uso muy extendido son la ADN polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y la Vent de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Sus temperaturas optimas de catálisis oscilan alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas temperaturas , incluso por encima de 92°C.

De las dos enzimas señaladas, la popularidad alcanzada por la Taq rebasa por mucho y en diferentes aspectos a otra polimerasas. Esta enzima es una proteína que consta de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 95 kDa, cuenta con actividad de exonucleasa 5´  $\rightarrow$ 3´. Y su fidelidad de replicación depende de la concentración de ion  $Mg^{+2}$  y de los dNTPs , así como del que exista o no balance en la concentración de estos mismos (Rodríguez et al ,2004).

#### ADN

La cantidad de ADN molde puede ser de tan solo 1ng en el caso de material genético clonado (en virus o plásmidos), o de un mínimo de 20ng, cuando se



utiliza ADN genómico provenientes de células eucariotas. De hecho, como se ha mencionado, el molde también puede ser ARN que sea previamente transformado en ADNc mediante transcriptasa reversa. Hay muchas formas posibles de preparar el molde para PCR (Rodríguez et al ,2004).

En general, no es necesario purificar el molde, porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, pero hay que tener mucho cuidado de eliminar lo más posible, la presencia de inhibidores de la polimerasa (Rodríguez et al ,2004).

#### Agua

El agua se usa como solvente del resto de los elementos y se requiere al menos destilada.

# 1.5.2.1 Criterios principales a considerar para la selección adecuada de los primers

En la tabla 1-10 los principales puntos a considerar para seleccionar adecuadamente los primers.

**Tabla 1-10 Criterios principales** 

Tamaño	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud	
	generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud.	
Base en extremo 3`	Debe ser una G o C.	
Temperaturas de fusión	50-65°C	
(Tm)		
Contenido G-C	40-60%	
Auto –	Debe ser evitada	
complementariedad	Para minimizar la formación de estructuras secundarias	
	los dimeros de primer	
Similaridad	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde	

Fuente:(Cortazar,2004)



# 1.5.3 Las etapas de un ciclo de reacción

Tres son los pasos a seguir y a repetir por cada ciclo de la PCR. A estos comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento y extensión (figura 1-14). Si de trabajar con ADN genómico se trata, regularmente se agrega una etapa previa de desnaturalización a 94°C, para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos. Después de concluida esta, se repiten los diferentes ciclos en los que tanto la temperatura como el tiempo serán específicos del producto a amplificar y del origen del ácido nucleico que, servirá, como ya se mencionó, de plantilla o molde a copiar por la polimerasa utilizada (Rodríguez *et al* ,2004).

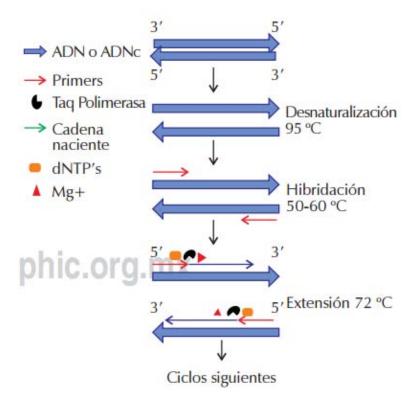


Figura 1-14 Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Fuente: Tamay de Dios L y cols., 2013.

#### Desnaturalización

El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de cadena simple que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94°C, el ADN de doble cadena logra que sus cadenas se



separen o desnaturalicen, por la ruptura de los puentes de hidrogeno. Esta es una etapa crítica, ya que es importante que le ADN molde se desnaturalice completamente, lo que se consigue a temperatura de 94°C, durante por lo menos 1 minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C, se recomienda aumentar de preferencia el tiempo (Rodríguez *et al* ,2004).

#### Alineamiento

La enzima, como todas las ADN polimerasas, necesita del grupo OH libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria a la molde.

Mientras que un cebador (referido como el 5'o sentido) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, al otro es el extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta.

El alineamiento especifico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada con pociones de bases y oscila entre 40 y 72°C .Ambas cadena originales de ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas nuevas.

Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de cebadores en sitios apócrifos del DNA molde (Rodríguez et al ,2004).

#### Extensión

Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleosidos monofosfatos en dirección (5´ - 3´) .Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) para evitar alineamiento inespecífico en los iniciadores.

El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, estimando un minuto para alargar 100 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos



se realice un alargamiento por 5 min. a 72°C, para asegurase que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan, por ende, exactamente la misma longitud (Rodríguez *et al* ,2004).

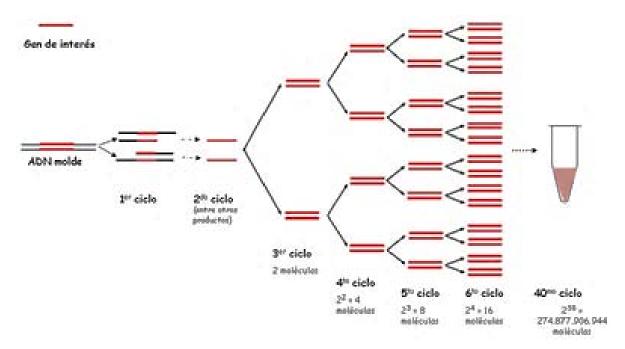


Figura 1-15 Naturaleza exponencial de los ciclos de PCR

#### Naturaleza exponencial de los ciclos

Al final del primer ciclo, ambas hebras de una molécula de ADN a las que se les hayan apareado los iniciadores han sido copiadas para generar dos nuevas cadenas.

Cuando se repite por segunda ocasión el ciclo de 3 pasos, las dos moléculas del primer ciclo se copian para producir ahora 4 moléculas. EL tercer ciclo genera ocho moléculas.

En teoría 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de ADN., y 30 ciclos generaran alrededor de mil millones de copias de esta (figura 1-15).

Pero en la práctica, el proceso no es tan eficiente. El número de ciclos, que se utiliza adquiere gran relevancia a la hora de optimizar un PCR. Este número depende la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados (normalmente de manera empírica).



Es importante evitar un número alto de ciclos, ya que estos pueden dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones inespecíficas.

Hay que tener en cuenta que la enzima sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto, reflejándose esta en que después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de comportarse de manera exponencial, volviéndose aritmética, y finalmente llega a una fase estacionaria. Afortunadamente, cuando el efecto meseta se presenta, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización (Rodríguez et al ,2004).

# 1.5.4 Análisis de productos amplificados

El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la reacción en cadena corresponden efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los primers que definen los extremos: frontal y reverso. Así, uno vez que la reacción ha finalizado el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, un proceso de separación bajo la acción de un campo eléctrico.

Las muestras son colocadas en un gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico (electroforesis) migrando de una manera característica que se puede visualizar por tinción del ADN con bromuro de etidio, el cual actúa como intercalante y al ser analizado bajo la luz UV, emitiendo una fluorescencia (Rodríguez et al ,2004).



# 1.5.5 Ventajas y desventajas de la PCR

### Ventajas

#### 1. Rapidez y sencillez de uso.

La PCR permite clonar ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, síntesis y reasociación. Cada ciclo dura típicamente de 3 a 5 minutos y se utiliza un termociclador que lleva un microprocesador para programar los cambios de temperaturas y el número de ciclos deseado. Esto supera ampliamente el tiempo requerido para la clonación en células, que suele ser de semanas, o incluso meses. Por supuesto, el diseño y síntesis de los oligonucleótidos cebadores también lleva tiempo, pero este proceso ha sido simplificado gracias a la aparición de programas informáticos para el diseño de los cebadores, y a la proliferación de casas comerciales especializadas en la síntesis de oligonucleótidos por encargo. Una vez que se pone a punto, la reacción puede ser repetida de forma sencilla (Céspedes, 2000).

#### 2. Sensibilidad.

La PCR puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de ADN diana, incluso a partir de ADN contenido en una sola célula. Esta elevada sensibilidad ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la patogénesis molecular y la aparición de numerosas aplicaciones (ciencia forense, diagnóstico, estudios de paleontología molecular, etc) donde las muestras pueden contener muy pocas células. Sin embargo, el hecho de que el método tenga una sensibilidad tan elevada significa también que se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la muestra con ADN extraño (Céspedes, 2000).



#### 3. Robustez.

La PCR permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene ADN muy degradado, o incluido en un medio que hace problemática su purificación convencional. Esto hace que el método resulte muy adecuado para estudios de antropología y paleontología molecular, por ejemplo para el análisis de ADN recuperado de individuos momificados y para intentar identificar ADN de muestras fósiles que contienen poquísimas células de criaturas extintas hace ya mucho tiempo. El método se ha empleado con éxito también para la amplificación de ADN de muestras de tejidos fijadas con formol, lo cual ha tenido importantes aplicaciones en patología molecular (Céspedes, 2000).

#### Desventajas

# 1. Necesidad de disponer de información sobre la secuencia del ADN diana

Para poder construir oligonucleótidos específicos que actúen como cebadores para la amplificación selectiva de una secuencia particular de ADN se necesita disponer de alguna información previa sobre la propia secuencia a amplificar. Esto implica, por regla general, que la región de interés ya haya sido parcialmente caracterizada, a menudo mediante la aplicación de métodos de clonación basados en sistemas celulares. Sin embargo, y para casos concretos, se han desarrollado varias técnicas que reducen o incluso hacen desaparecer esta necesidad de disponer de información previa sobre la secuencia del ADN diana (Céspedes, 2000).

#### 2. Tamaño corto de los productos de la PCR

Una desventaja clara de la PCR como método de clonación de ADN ha sido el tamaño de las secuencias de ADN que permite clonar. A diferencia de la



clonación de ADN en células, donde pueden clonarse secuencias de hasta 2 Mb, la información de que se dispone sobre la mayor parte de secuencias clonadas por PCR sitúa el tamaño de los fragmentos clonados entre 0 y 5 Kb, tendiendo hacia el extremo inferior. Los fragmentos pequeños se amplifican muy fácilmente, pero conforme aumenta su tamaño se hace más difícil obtener una amplificación eficiente. En la actualidad sin embargo ya es posible amplificar secuencias por PCR de tamaños entre 20 y 40 Kb (Céspedes, 2000).

#### 3. Infidelidad en la replicación del ADN

La clonación del ADN en células pasa por la replicación del ADN *in vivo*, proceso asociado a una gran fidelidad de copiado debido a la existencia, en la célula, de mecanismos de lectura y corrección de errores. Sin embargo, cuando el ADN se replica *in vitro* la tasa de errores cometidos durante el copiado se dispara. Ya se ha comentado anteriormente que la Taq polimerasa utilizada en la reacción no tiene actividad exonucleásica (Céspedes, 2000).

# 4. Peligro de contaminación

La facilidad con que se amplifica el ADN exige evitar el peligro de contaminación inherente al poder multiplicador de la reacción. En un tubo en el que se ha realizado una reacción de PCR hay tal cantidad de ADN, que al salir caliente del termociclador y abrir este, el vapor alcanza el ambiente del laboratorio. "Si se pasa un papel de filtro por los pomos de las puertas, o la superficie del termociclador, se puede rescatar suficiente ADN como para obtener una señal" (Céspedes, 2000).



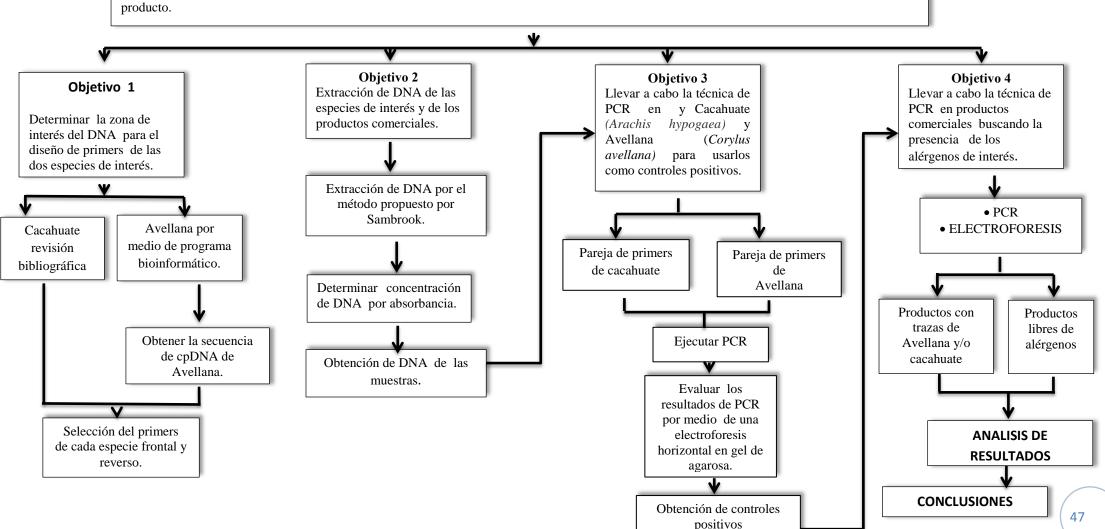
#### **CUADRO METODOLÓGICO**

#### **PROBLEMA**

Hay alérgenos de origen vegetal como el Cacahuate (Arachis hypogaea) y Avellana (Corylus avellana) que se pueden encontrar no reportados en productos alimenticios y pueden provocar reacciones alérgicas en los consumidores.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Detectar trazas de alérgenos no reportados en productos alimenticios mediante la técnica de PCR , que permitan asegurar la inocuidad del producto.





# Capítulo 2 Metodología experimental

# 2.1 Descripción del cuadro metodológico

#### 2.1.1 Problema

Hay alérgenos de origen vegetal como el Cacahuate (*Arachis hypogaea*) y Avellana (*Corylus avellana*) que se pueden encontrar no reportados en productos alimenticios y pueden provocar reacciones alérgicas en los consumidores.

# 2.1.2 Objetivo general

Detectar trazas de alérgenos no reportados en productos alimenticios mediante la técnica de PCR, que permitan asegurar la inocuidad del producto.

# 2.1.3 Objetivo Particular 1

Determinar la zona de interés del ADN de las especies Cacahuate (*Arachis hypogaea*) y Avellana (*Corylus avellana*) mediante un programa bioinformático para delimitar el fragmento a amplificar y diseñar el par de primers específicos

# 2.1.4 Objetivo Particular 2

Extracción y cuantificación de ADN de las especies de interés y los productos comerciales a analizar para llevar acabo la PCR.

# 2.1.5 Objetivo Particular 3

Aplicar la técnica de PCR en Cacahuate (*Arachis hypogaea*) y Avellana (*Corylus avellana*) y otros granos utilizando los primers seleccionados para cada especie para verificar la especificidad de los primers y usarlos como controles positivos.



# 2.1.6 Objetivo Particular 4

Evaluar en diferentes productos comerciales la presencia de los alérgenos de interés mediante la técnica de PCR para asegurar la inocuidad del producto.

# 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

# 2.2.1 Material Biológico

- Muestra en fresco: Cacahuate (Arachis hypogaea) y Avellana (Corylus avellana).
- Muestras comerciales: Los productos fueron adquiridos en tiendas comerciales, seleccionando cerca de 10 productos sin cacahuate y avellana en la lista de ingredientes:

#### 2.2.2 Extracción De ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo en las muestras en fresco (Cacahuate y Avellana) como de los productos comérciales con posibles trazas, ver tabla 2-1.

Para la extracción de ADN de las muestras de comerciales se empleó el protocolo descrito por Sambrook, *et al.*, 2001 que está basado en la disolución de la muestra usando detergentes y proteinasa, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamilico y la precipitación de ADN con etanol.

# Ongeniería en Alimentos



Tabla 2-1 Productos comerciales a analizar

	Marca	Producto	Lote	Alérgenos reportados en etiqueta	Alérgeno a detectar
	Marínela	Galletas príncipe	L46524C	Ajonjolí, Nuez, Almendra, Coco, Cacahuate.	
Galletas	Tía rosa	polvorón	L53313C	Soya, leche, huevo, ajonjolí, nuez, almendra, coco, cacahuate.	
	Lara	Choco chispa	L53521C	Leche, huevo, soya, nuez y coco.	
	Nestlé	Crunch	22891211	Nueces, almendras y gluten.	Avellana  Cor a 8
Barras de chocolate	Nestlé	Larin	43230215C2	Avellanas, almendras, cacahuate y gluten.	COLAO
	Effem México	Milky way	444D2MTML1	Cacahuate, gluten, chocolate con leche.	
Galletas	Gamesa	Marias	51VA16474	Nueces de árboles, cacahuate, coco.	
	Kellogg's	Especial K	16C 23:14	Gluten	
Cereal	Nestlé	Nesquick Cereal	4342020804	Nueces, almendras, leche y sulfitos.	Cacahuate Ara h 2
	Nueva walmart de mexico	Cereal Aurrera	290715 731	Gluten	
	Kellogs	Zucaritas	KQ270513	Gluten, soya.	

A continuación se detalla el protocolo completo:

Antes de realizar la extracción de ADN de las muestras se homogenizaron en un mortero.

#### Reactivos

- ✓ Agua desionizada con pH de 7.
- ✓ Solución de lisis (Tris base 50nM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)
- ✓ Enzima Proteinasa k
- ✓ Mezcla fenol- cloroformo- alcohol isoamilico, en proporción 12:24:1
- ✓ Etanol frío.



# **Material y Equipo**

- ✓ Agitador vortex, Genie K-55-G.
- ✓ Balanza analítica electrónica, Cole parmer PR410 Equipar 500mg
- ✓ Calentador para tubos eppendorf.
- ✓ Juego de micropipetas, Rainin
- ✓ Microcentrifuga, *minispin* plus eppendorf 1400rpm

### Método

# Disgregación del tejido

- **1.** Se enjuago el tejido con agua estéril y sin tocarlo con las manos, se usaron guantes.
- 2. Con ayuda de un mortero, se molió la muestra.
- 3. Se pesó 150µg de la muestra en un tubo Eppendorff.
- 4. Se adiciono 1250µl de solución de Lisis.
- **5.** Se agito con el vortex hasta que se visualizaron pedazos más pequeños.
- **6.** Se adicion 7µl de enzima proteasa previamente concentrada a 20mg/ml.
- 7. Se incubo los tubos a 50°C en Termoblok por 2 horas.
- **8.** Se desactivó la enzima manteniendo la temperatura en el termoblok a 60°C por lo menos una hora.

# Extracción de proteínas y polisacáridos

- **9.** Se adiciono al tubo que contenía la muestra, 0.25 ml de la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico.
- 10. Se mezcló el tubo varias veces suavemente.
- **11.**Se centrifugo a 10,000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
- **12.**Se separaron las fases, separando la fase acuosa superior que contiene el ADN. Fue importante evitar recuperar cualquiera de las otras fases.
- 13. Se trasladó la fase recuperada a 2 tubos eppendorff nuevos.



### Precipitación de ADN

- 14. Se adiciono 1500µl de etanol frió a cada uno de los tubos con la muestra.
- 15. Se mezcló suavemente.
- **16.** Se centrifugo a 10,000rpm, durante 10 min.
- **17.**Se decantó el etanol y dejo secar en la incubadora a 37°C. El ADN se visualizó pegado al tubo como una mancha blanca.
- **18.**Una vez que el etanol se eliminó, se adiciono agua libre de nucleasas para resuspender el ADN agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.
- **19.**Cuando la solución presento partículas insolubles, se reintento la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol-cloroformo-alcohol isoamilico, y se volvió a lavar con etanol.

# 2.2.3 Cuantificación de ADN por medio de absorbancia

Para cuantificar la cantidad de ADN, las lecturas se tomaron a 260 y 280nm. La lectura de 260nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de densidad óptica corresponde a aproximadamente 50µg/mL de ADN de doble hebra. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de ADN tienen valores de 1.8, mientras que valores de 2, muestran la existencia de preparaciones puras de ARN. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.8, entonces no se puede cuantificar el ADN en la solución (Sambrook, et al., 2001).

#### Reactivos:

- ✓ Muestras de DNA de las diferentes especies (Avellana, Cacahuate y productos comerciales)
- ✓ Agua libre de nucleasas



### Material y equipo:

- ✓ Espectrofotómetro , Abccesolab NanoDrop ND-1000 A113
- ✓ Micropipeta
- ✓ Tubos eppendorf

#### Método:

- 1. Se calibro el equipo colocando  $2\mu l$  de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo.
- 2. Se abrió el programa en el Nanodrop y selecciono la opción de ácidos nucleicos.
- 3. Se colocó nuevamente  $2\mu l$  de agua libre de nucleasas para registrarlo como blanco.
- 4. Se corrió el programa.
- 5. Se colocó 2µl de la muestra de ADN a cuantificar y se corrió el programa.
- **6.** Se registró la concentración de ADN proporcionada por el equipo; tomando en cuenta la relación 260/280.
- 7. Se limpió adecuadamente el equipo, con una toalla absorbente.

#### 2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

Con la PCR se realiza *in vitro* el proceso de replicación del ADN. Está basado en la acción de la polimerasa, que como se sabe es la enzima que dirige la síntesis de ADN, y desde una cadena simple de ADN sintetiza la complementaria. Para ello necesita al menos una pequeña fracción de cadena doble de ADN para iniciar la síntesis. Esto hace posible, si de forma voluntaria le ponemos una pequeña fracción de oligonucleótidos que sean complementarios de una porción, se unirá después de la desnaturalización de la doble cadena y mediante el crecimiento hacia el extremo 3´ del ADN por aposición de los nucleótidos correspondientes suministrados y, a través de la



acción de la polimerasa, se hace la amplificación del fragmento deseado (Cortázar, 2004).

#### Reactivos

- ✓ Agua libre de nucleasas
- ✓ PCR Master Mix (50 unidades de Taq Polimerasa, 400μM de cada dNTP y 3 mM de MgCl₂).
- ✓ Muestras de ADN extraído de Avellana y Cacahuate

#### **Primers**

La secuencia de primers que se utilizaron para llevar a cabo la PCR se muestran en la tabla 2-2.

Tabla 2-2 Primers seleccionados para Ilevar acabo la PCR

Selección de primer				
No. de Referencia	Especie	Alérgeno	Primer 5´ - 3´	Tamaño Amplificado
AF329829 (Platteau,2011)	Avellana (Corylus avellana)	Cor a 8	F: cttgtgcatgatggtggccgca R: gccagcgatgcctttggctgta	220pb
L77197.1 (Stephan,2004)	Cacahuate (Arachis hypogaea)	Ara h II	F: tegecetttteeteeteget R: tgeetegeacatgeacettt	296pb

# Material y equipo:

- √ Tubos eppendorf
- ✓ Juego de micropipetas
- ✓ Puntas estériles
- ✓ Termociclador
- ✓ Microcentrifuga



#### **Método:**

- 1. Se esterilizo con alcohol la zona donde se trabajó.
- 2. Se colocó 12.5 μl de Master Mix en los tubos eppendorf.
- **3.** Posteriormente se adiciono  $0.5 \mu l$  de cada primer (frontal y reverso).
- 4. Se agregó 1μl de ADN de las muestras a analizar con una concentración ajustada a 60 ng/μl (los tubos eppendorf deben de contener 25μl en total).
- **5.** Se etiquetaron los tubos según la muestra que contenía.
- 6. Se agitaron los tubos en el vortex.
- **7.** Se colocaron los tubos en el Termociclador y se seleccionó el programa con las condiciones establecidas para llevar a cabo el ciclo de la PCR.

# 2.3.1 Etapas y ciclos de la reacción

La programación del Termociclador se llevara a cabo con las condiciones indicadas en las figura 2-1 las cuales están basadas en un programa para cloroplasto de la Tesis "Identificación de dos especies de café", pero se realizaron algunas modificaciones.

Se empleó **PCR tradicional con Master Mix**, para controles positivos de cacahuate, avellana, muestras comerciales y prueba de especificidad. En la tabla 2-3 se muestran los componentes y cantidad utilizada para llevar acabo la reacción.



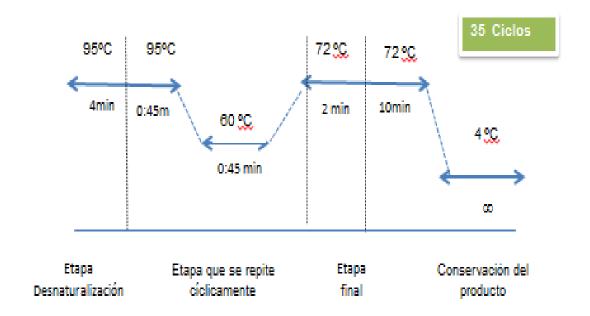


Figura 2-1 Etapas y condiciones que se llevaran a cabo en el Termociclador para detección de alérgenos de Avellana y Cacahuate

Tabla 2-3 Componentes de la PCR control positivo y pruebas de especificidad

Componentes	25 μl reacción	
Agua	10.5	
Master Mix	12.5	
Primer F	0.5	
Primer R	0.5	
DNA	1	

# 2.3.2 Evaluación de los productos obtenidos de la PCR mediante electroforesis horizontal de agarosa

La electroforesis es un proceso de cuantificación de ADN que consiste en el movimiento de las moléculas de ADN cargadas en un campo eléctrico de corriente continua de alto voltaje dado por una fuente. Los grupos fosfatos en el ADN son los responsables de su carga negativa, por lo que el ADN se moverá hacia el electrodo positivo. La velocidad de movimiento de las moléculas de ADN en solución acuosa dependerá de dos factores: su tamaño y su carga eléctrica neta. Esto significa que la migración de las moléculas de ADN ocurrirá según el tamaño de los fragmentos en un sistema acuoso de electroforesis. La



electroforesis se lleva a cabo sobre geles de agarosa o acrilamida, en donde el gel sumergido actúa como un filtro que contiene una compleja red de poros, a través de los cuales las moléculas tienen que pasar hasta llegar al electrodo negativo (Puertas 1996).

# Material biológico:

✓ Muestras de amplificación por PCR

#### Reactivos:

- √ Agua desionizada con pH de 7
- ✓ Agarosa
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Tinte cargador azul/naranja
- ✓ Marcador de peso molecular
- ✓ TAE IX

#### Material:

- ✓ Puntas para micropipetas
- ✓ Gradilla
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 200 ml
- ✓ Parafilm

#### Equipo:

- √ Balanza electrónica
- ✓ Microcentrifuga
- ✓ Fuente de poder
- ✓ Cámara de electroforesis

#### Método:

Una vez finalizada la PCR los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa a una concentración del 3% para Avellana, Cacahuate y muestras comerciales el cual se colocó en una cámara de 50ml.



#### Para lo cual:

- 1. Se pesó la cantidad de agarosa necesaria.
- 2. Se disolvió en TAE IX.
- 3. Se calentó la disolución en el horno de microondas aproximadamente un minuto por espacios de 10 segundos (esto se hace para evitar que se evapore el agua de la disolución, se añadió una gota de BRET y se mezcló bien.
- **4.** Se cerraron las aperturas laterales del soporte del gel con cinta adhesiva.
- 5. La mezcla se vertió en el soporte cuidando que no se formaran burbujas. Inmediatamente se colocó el peine para la formación de los pocillos.
- Se dejó solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corriente de aire.
- **7.** Se retiraron los peines y se colocó en el soporte con el gel en la cámara de electroforesis.
- 8. Se adiciono TAE IX a la cámara de modo que le gel quedara cubierto.

# 2.3.2.1 Carga y corrida del gel

- **1.** Se colocó en un trozo de parafilm el BRET; colorante azul/naranja y marcador de peso molecular y la muestra que se obtuvo de la PCR.
- **2.** Las tres gotas se mezclaron muy bien con ayuda de una micropipeta, se recogieron y se depositaron en el pocillo correspondiente.
- **3.** Cuando se terminó de cargar el gel, se cerró la cámara electroforética y se corrió en un campo eléctrico de 60v creado por la fuente de poder.
- 4. La corrida duro aproximadamente una hora, hasta que le colorante se visualizó cerca del extremo opuesto. El movimiento visible del bromuro de etidio permitió monitorear la migración de las bandas invisibles de ADN.



# 2.3.2.2 Visualización de fragmentos

Una vez concluida la migración de los fragmentos de ADN, su tamaño puede determinarse comparando la distancia recorrida en el gel con la de fragmentos de tamaño conocido (Marcador de peso Molecular).

Para la visualización de fragmentos se siguió los siguientes pasos:

- 1. Se colocó el gel dentro del trasluminador.
- 2. Se centrar el gel dentro de la cámara y encendió el trasluminador.
- 3. Se encendió la cámara.
- **4.** Se fotografió el gel; la imagen se envió a un ordenador que la proceso en el software adecuado.



# Capítulo 3 Resultados y Discusión

# 3.1 Objetivo Particular 1

Determinar la zona de interés del ADN de las especies Cacahuate (*Arachis hypogaea*) y Avellana (*Corylus avellana*) mediante un programa bioinformático para delimitar el fragmento a amplificar y seleccionar el par de primers específicos.

Se realizó la búsqueda de artículos relacionados con estos alérgenos para conocer la zona de ADN a estudiar, posteriormente se tomó el número de referencia para entrar al NCBI y seleccionar los primers tanto el primer frontal y reverso (Ver anexo 1) de ambas especies a estudiar de acuerdo a los criterios descritos en la Tabla 1-11.

Tabla 3-1 Primer seleccionados

Selección de primer				
No. de Referencia	Especie	Alérgeno	Primer Amplifi	
			F: cttgtgcatgatggtggccgca	220
	Avellana		R: gccagcgatgcctttggctgta	
AF329829	(Corylus	Cor a 8		
(Platteau,2011)	avellana)			
	Primer		F: tcgcccttttcctcctcgct	296
L77197.1	Cacahuete	Ara h II	R: tgcctcgcacatgcaccttt	
(Stephan,2004)	(Arachis			
	hypogaea)			

# 3.2 Objetivo Particular 2

Extracción y cuantificación de ADN de las especies de interés y los productos comerciales a analizar para llevar acabo la PCR.



A continuación se reportan los datos obtenidos de concentración obtenida de la extracción de ADN de la muestras en fresco (Cacahuate y Avellana) y de las muestras comerciales.

Tabla 3-2 Concentración y pureza de las muestras biológicas y comerciales

		Concentración	Relación	Concentración	Relación
Muestra		Inicial (ng)	260/280	Dilución (ng)	260/280
	Avellana	430.1	2.12	52.8	2.13
Biológico	Cacahuate	1766.7	1.94	46.2	1.80
	Principe	432.3	1.76	105.8	1.40
	Larin	450.1	1.41	54.4	1.49
	Choco	51.4	1.31	NA	NA
	chispa				
	Polvorón	47.5	1.84	NA	NA
	Galleta	234.1	1.82	52.7	1.81
S	maría				
Comerciales	Especial K	1610.3	1.54	66.9	1.66
mer	Nesquik	5015.8	1.50	68	1.75
ပိ	cereal				
	Cereal	201.4	1.86	74.1	1.89
	Aurrera				
	Zucaritas	4091.3	1.79	65.3	1.63
	cereal				
	Crunch	100.5	1.49	NA	NA
	Milky way	469.2	1.12	NA	NA

Los recuadros marcados con "NA" es debido a que en algunas muestras de los productos comerciales no se realizó dilución del ADN obtenido de la extracción; al cuantificarlas en algunas se obtuvieron los 50ng de ADN, y en otras al diluirlas disminuía la relación 260/280, a pesar de que se realizó un segundo lavado con fenol- cloroformo- alcohol isoamilico, y un segundo secado con etanol.



## 3.3 Objetivo Particular 3

Aplicar la técnica de PCR-directa en Cacahuate (*Arachis hypogaea*), Avellana (*Corylus avellana*) y otros granos, utilizando los primers seleccionados para obtener los controles positivos de cada especie y verificar la especificidad de los primers.

Para obtener el control positivo de ambas especies, se evaluó los primers seleccionados de avellana y cacahuate, con el ADN extraído de cada especie.

### • Control positivo Avellana

Tabla 3-3 Concentraciones de ADN de Avellana para el control positivo

Muestra	Concentración	Relación Concentración		Relación	Cantidad	
	(ng)	260/280	(ng) diluida	260/280	DNA	
Avellana 1	231.1	2.13	60.0	2.19	1 μΙ	
Avellana 2	430.1	2.12	52.8	2.13	1 μΙ	



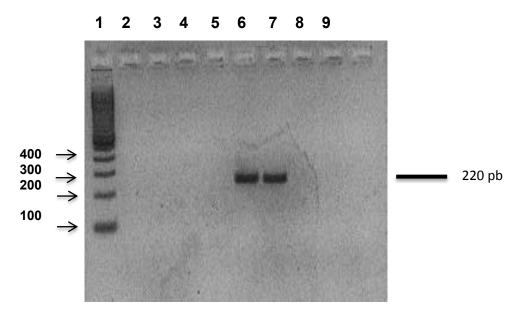


Figura 3-1 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3%, control positivo de Avellana. Carril 1 Marcador-100pb, carril 3 Blanco, carril 6 DNA de Avellana 1  $(1\mu l)$  y carril 7 DNA de Avellana 2  $(1\mu l)$ .

Para llevar a cabo la PCR-convencional se empleó  $1\mu$ l de las muestras diluidas reportadas en la tabla 3-3, y al obtener la visualización del gel de agarosa al 3%, se observa en la figura 3-1 un amplificado de 220pb en los carriles 6 y 7, correspondientes al alérgeno Cor a 8 de la avellana, obteniendo así el control positivo.

### • Control positivo cacahuate

En la tabla 3-4 se muestra la concentración y calidad de ADN utilizado para obtener el control positivo del cacahuate.

Tabla 3-4 Concentraciones de ADN de cacahuate para el control positivo

Muestra	Concentración	Relación	Concentración	Relación	Cantidad
	(ng)	260/280	(ng) diluida	260/280	DNA utilizada
Cacahuate 1	3765.3	2.12	73.5	2.15	0.5 μΙ
Cacahuate 2	3712.7	2.12	80.6	2.18	0.5 μΙ



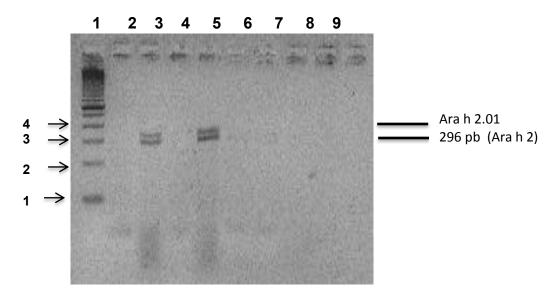


Figura 3-2 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3% control positivo de Cacahuate. Carril 1 M-100pb, carril 2 Blanco, carril 3 y 5 PCR Master Mix con DNA concentrado de Cacahuate  $(0.5\mu$ l).

En la fCBigura 3-2 se observa un amplificado de 2 bandas, el primer amplificado de 296pb que corresponde al alérgeno Ara h 2 del cacahuate y un segundo amplificado en la parte superior que corresponde al alérgeno Ara h 2.02 el cual es un isoalergeno del alérgeno Ara h 2, con un amplificado por arriba de los 300pb (ver paginas 24-26).

# Especificidad de Primers de alérgenos de Avellana y Cacahuate

La prueba de especificidad de los primers de cada especie se llevó a cabo para garantizar que solo se detectara el alérgeno de interés.

La prueba de especificidad de los primers se llevó acabo con ADN de cacao y soya, debido a que los productos a evaluados fueron galletas, barras de chocolate y cereal; el cacao y la soya son de los ingredientes comúnmente reportados en la etiqueta como "trazas". También se realizó la prueba de



especificidad de los primers de Avellana con el ADN de cacahuate y viceversa.

La especificidad de los primers también se verifico mediante un programa Bioinformático, donde se obtuvo una similitud del 100% de los primers de Cacahuate con la especie (*Arachis hypogaea*) y sus dos isoformas, de igual manera los primers de Avellana (*Corylus avellana*); sin mostrar secuencias que produzcan alineamientos significativos de los primers de avellana y cacahuate con alguna otra especie (ver anexo 1).

En la tabla 3-5 se muestra la concentración y pureza del ADN de las muestras que se utilizaron para la prueba de especificidad.

Tabla 3-5 Concentración de las muestras a analizar para verificar especificidad de los primers

Muestra	Concentración (ng)	Relación 260/280	Concentración diluidas (ng)	Relación 260/280	Cantidad de DNA utilizada
Cocoa	551.7	2.07	68.6	2.15	0.5 μΙ
Soya <sup>1</sup>	X	Х	59.1	1.85	0.5 μΙ

La prueba de especificidad se llevó acabo con PCR-convencional y Master Mix, con el programa del Termociclador Alérgenos (Figura 2-1). Posteriormente se evalúo los productos de la PCR en un gel de agarosa al 3%, los resultados se muestran en la figura 3-3.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> La muestra de soya fue toma de las muestras del trabajo de detección de transgénicos en alimentos procesados de soya y maíz, por lo que solo se cuenta con los datos de la concentración y pureza de la dilución final.



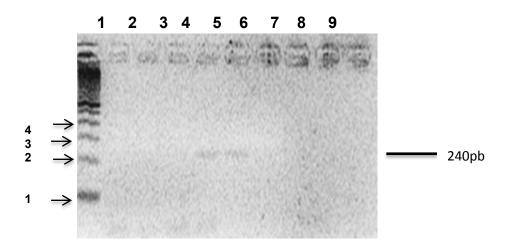


Figura 3-3 Análisis Electroforético de especificidad para primers de Avellana y Cacahuate. Carril 1) M-100pb, se realizaron con primers de cacahuate los carriles 2) Cocoa ADN concentrado y 3) Cocoa ADN diluido, carril 4) soya y carril 8) Avellana C+. Se realizaron con primers de Avellana carril 5) Cocoa ADN concentrado y carril 6) Cocoa diluida, carril 7) Soya<sup>1</sup> y carril 9) Cacahuate C+.

En la figura 3-3 se muestran los resultados de especificidad de los primers de Avella y de Cacahuate, donde se observa que el ADN de cacao amplifico con los primers de Avellana tanto con el ADN concentrado como el ADN diluido carriles 5 y 6, obteniendo un amplificado de aproximadamente 240 pb con una banda tenue, lo que no implicó un problema ya que el amplificado de avellana corresponde a 220 pb, con una banda más intensa y para cacahuate el amplificado es de 290 pb.

## 3.4 Objetivo particular 4

Evaluar en diferentes productos comerciales la presencia de los alérgenos de interés mediante la técnica de PCR para asegurar la inocuidad del producto.

Las concentraciones de las muestras comerciales así como la relación 260 /280 se encuentran en la tabla 3-2.



#### Muestras comerciales avellana – cacao

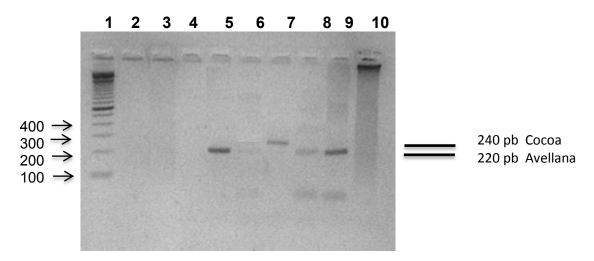


Figura 3-4 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3%, muestras comerciales para la detección de trazas de Avellana. Carril 1) M-100pb, carril 2) Blanco, carril 3)C+ de Avellana y carril 5) C+ de Avellana, carril 7) C+ Cocoa, carril 8) Chocolate Crunch, carril 9) Galleta choco chispa y carril 10) Galleta maría. PCR convencional con  $0.6\mu l$  de ADN.

Como se puede observar en la figura 3-4, para las muestras comerciales que se analizaron se obtuvo como resultado presencia de trazas de avellana en el carril 8 (chocolate crunch ) y carril 9 (galleta choco chispa) al dar un amplificado de 220pb , siendo que en ninguno de los casos se reporta en la parte de información de ingredientes que contiene trazas de avellana; en el carril 7 se colocó Control positivo de cocoa el cual da un amplificado de aproximadamente 240 pb; por lo tanto ninguno de los productos comerciales analizados corresponde a trazas de cocoa.



#### Muestras comerciales cacahuate

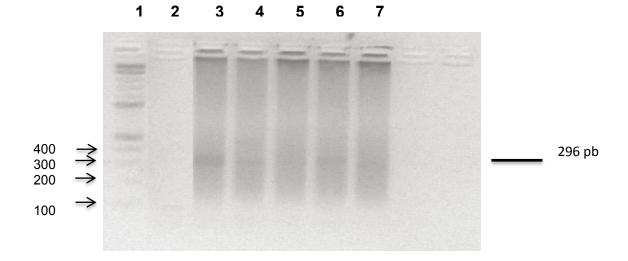


Figura 3-5 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3 %, muestra s comerciales para la detección de trazas de cacahuate. Carril 1)M-100pb, carril 2) Blanco, carril 3) C+ de cacahuate, carril 4) barra de cereal special K, carril 5) Nesquik Cereal, carril 6)Cereal Aurrera y carril 7) Zucaritas cereal.

En la figura 3-5 se muestra los resultados obtenidos de las muestras comerciales que se analizaron para la detección del alérgeno Ara h 2 de cacahuate, obteniendo un amplificado del control positivo en el carril 3, en el carril 4 de la barra de cereal special K y en carril 6 para el cereal marca Aurrera, los cuales solo reportan trazas de gluten, en todos los casos obteniendo una banda muy tenue y presentando un barrido a lo largo del carril, en el carril 5 y 7 donde se colocó muestras de Nesquik y Zucaritas no se detectó la presencia del alérgeno Ara h 2.



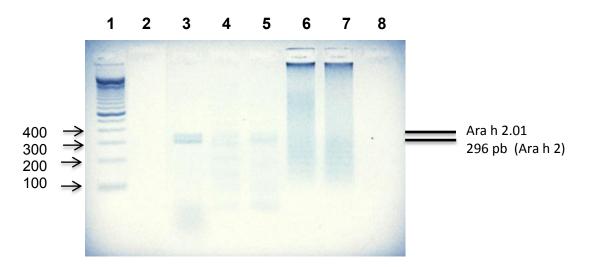


Figura 3-6 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3 %, muestras comerciales para detección de trazas de cacahuate. Carril 1) M-100pb, carril 2) Blanco, carril 3) C+ de cacahuate, carril 4) Galleta Príncipe, carril 5) Chocolate Crunch, carril 6) galleta choco chispa y carril 8)galleta maría.

En la figura 3-6, se muestra un amplificado en el carril 3 que corresponden al control positivo del cacahuate; en el carril 4 se obtuvo un amplificado con el ADN de la galleta príncipe, en carril 5 se muestra un amplificado con el ADN del chocolate Crunch, en ambos casos las trazas de cacahuate son reportadas en la etiqueta de los productos, sin embargo, la prueba se realizó, debido a que en los productos comerciales que se analizaron con la sospecha de que contenía trazas de cacahuete sin ser reportado en la etiqueta se obtuvo una banda muy tenue figura 3-6 y presentando barridos en algunos de los carriles.

Los barridos obtenidos en las figuras 3-5 y 3-6, como resultados de las muestras comerciales analizadas para detectar el alérgeno Ara h 2 del cacahuate, se puede explicar debido, a la especificidad del cebador la cual depende al menos parcialmente de su longitud. Es evidente que hay muchos más oligonucleótidos distintos con 24 bases que con 15. Dicho esto, los cebadores han de elegirse de forma que tengan una secuencia única dentro del ADN molde que debe amplificarse. *Un cebador diseñado con una secuencia muy repetitiva dará como resultado un barrido al amplificar ADN* 



genómico (ver figura 3-5 y 3-6). Sin embargo, el mismo cebador puede dar una sola banda si se amplifica un solo clon de una genoteca. Como la *Taq* polimerasa *que* se activa en una amplia banda de temperaturas, la extensión del cebador se producirá a las temperaturas inferiores de hibridación. Si la temperatura es demasiado baja, podrá darse un cebado inespecífico, que podrá ser extendido por la polimerasa si hay una corta homología en el extremo 3'. En general, los mejores resultados se obtienen con una temperatura de fusión de 55 a 72 °C (lo que corresponde a una longitud del cebador de entre 18 y 24 bases, según la regla de Wallace) (Sharrocks, 2008).

#### 3.4.1 Prueba Sensibilidad

A continuación se mencionan las condiciones en la cuales se realizó la prueba.

- a) Se realizó la prueba de sensibilidad con el ADN de cacahuate y avellana colocando 0.1, 0.3, 0.5, 1, 1.5, y  $2\mu$ l de ADN respectivamente de cada especie por separado.
- b) En la primera prueba que se realizó para la sensibilidad, amplificaron todos los carriles con las concentraciones de ADN mencionadas en el inciso (a), por lo que se realizó una segunda prueba de sensibilidad combinando el ADN de cacahuate y avellana, por separado, con ADN de Polvorón (galleta Tia Rosa) (ver Tabla 3-2 concentración y pureza de las muestras biológicas y comerciales) la cual fue una de las muestra comercial que no amplifico en las pruebas.



# Sensibilidad de ADN de cacahuate combinado con ADN de polvorón

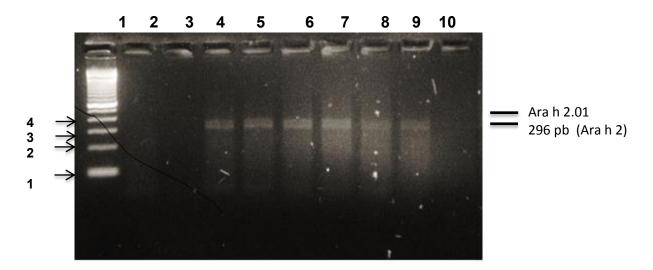


Figura 3-7 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3 %, prueba de sensibilidad para la detección del alérgeno Ara h 2 de cacahuate. Carril 1)M-100pb, carril 2) blanco, carril 4) 0.1µl de DNA de cacahuate-polvorón, carril 5) 0.3 µl de DNA de cacahuate-polvorón, carril 6)0.5 µl de DNA de cacahuate-polvorón, carril 7) 1 µl de DNA de cacahuate-polvorón, carril 8) 1.5 µl de DNA de cacahuate-polvorón.

En la prueba de sensibilidad para la detección del alérgeno Ara h 2 del Cacahuate, se descartó que la concentración del ADN afecte la detección de dicho alérgeno puesto que los resultados obtenidos se observa la misma intensidad de banda, sin importar la concentración de ADN.



# • Sensibilidad de ADN de Avellana combinado con ADN de polvorón

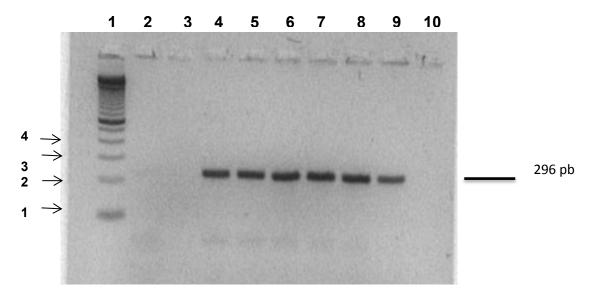


Figura 3-8 Análisis Electroforético en gel de agarosa al 3 %, prueba de sensibilidad para la detección del alérgeno Cor a 8 de Avellana. Carril 1)M-100pb, carril 2) blanco, carril 4) 0.1μl de DNA de avellana-polvorón, carril 5) 0.3 μl de DNA de avellana-polvorón, carril 7) 1 μl de DNA de avellana-polvorón, carril 8) 1.5 μl de DNA de avellana-polvorón, carril 9) 2 μl de DNA de avellana-polvorón.

Los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad para la detección del Alérgeno Cor a 8 de la avellana; no se ve influenciada por la concentración de ADN de avellana que contenga la muestra, pues se obtiene una banda bien definida en todos los amplificados, a excepción del carril 9 donde la cantidad utilizada de ADN fue de 2µl y se muestra una banda tenue a comparación de los amplificados anteriores.

En cuanto a la sensibilidad o límite de detección se descarta que existiera algún inconveniente con el programa de PCR o con las concentraciones de los reactivos que componen la reacción puesto que se demostró la capacidad de detectar la secuencia de ADN de los alérgenos de interés sin importar las concentraciones de ADN utilizadas.



## **Conclusiones**

La detección de alérgenos puede llevarse mediante diversas técnicas, sin embargo, las técnicas basadas en el análisis de ADN han demostrado en los últimos años ser un de las técnicas más convenientes debido a su especificidad, muestra de ello es la técnica de PCR, la cual está basada en la amplificación de fragmentos de ADN específicos, en este trabajo de Tesis se ocupó ADN Genómico.

Se demostró que los primers utilizados para detectar al alérgeno de avellana (Cor a 8) también pueden ser utilizados para detectar cacao. Y los primers utilizados para la detección del alérgeno de Cacahuate (Ara h 2), detecta una de las isoformas de dicho alérgeno Ara h 2.01 y Ara h 2.02.

Finalmente se obtuvieron resultados satisfactorios al detectar mediante la técnica de PCR loa alérgenos Ara h 2, sus isoformas y Cor a 8. De las 11 muestras de productos con posibles trazas; 2 de las muestras resultaron confirmatorias, mientras que 5 de las muestras que no venía reportado en la lista de ingredientes resultaron con la presencia de dichos alérgenos.

En conclusión la técnica de PCR para la detección de alérgenos en alimentos procesados es rápida, eficiente y confiable, para detectar trazas de los alimentos que contienen proteínas causantes de reacciones alérgicas al consumidor.



# **Bibliografía**

- 1. Aliniazee T., (1998). Ecology and management of hazelnut pests.

  Annual Review of Entomology, 43, pp. 395 419.
- **2.** Astiasaran I., Lasheras B., & Ariño, E., (2003). Alimentos y Nutrición en la Práctica Sanitaria, Madrid, España, Días de Santos, pp. 242-243.
- **3.** Bolívar F., (2007). Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna, México D. F., pp.19-28.
- **4.** Bush R., Taylor S., & Nordlee *I.*, (1990). Sensibilidad a cacahuete. Allergy Proc, **4**, pp. 21-25.
- **5.** Cardona V., Guilarte, M., & Luengo, O., (2006). Alergia a alimentos, Sección de Alergología. Barcelona, España, 126(11) pp.424-430.
- **6.** Céspedes A., (2000). Identificación de Pescados Planos Fileteados mediante PCR. "Ibérica. Actualidad tecnológica", p.426.
- 7. Cortázar A., Silav E., (2004), Métodos Físico-Químicos en Biotecnología, Instituto de Biotecnología (UNAM), pp. 1-40.
- **8.** Ceballos J., (2002), Caracterización morfológica y fenológica de la colección de maní (*Arachis hypogae*), Tesis Ing. Agr., USAC, p.51.
- **9.** Crisci J., López M. (1983), Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica, Washington, D.C., OAE, 26, p. 132.
- **10.** Cruz S., Clasificación de zonas de vida de Guatemala, Guatemala, Instituto Nacional Forestal, 1976, 24p.
- **11.** De Berastegui L., El Avellano en Argentina , (1997), Rio Negro, Argentina., p.64.
- **12.** Domingo E., Hernández G., & Palou A., (2005), Aplicaciones de la Biotecnología en Seguridad Alimentaria, Spainfo, pp. 10-12.
- **13.** Falder, A. (2004), Enciclopedia de los Alimentos. Frutos secos y frutas desecadas. Distribución y Consumo, pp. 117-135.
- **14.** FDA.(2010), Alergias a los alimentos,p.1.
- **15.** Font Q. P. (2001). Diccionario de botánica.2º edición Barcelona, España. Península, p.1244.



- **16.** García R., (1993), Estudios de reactividad cruzada entre cacahuate, legumbres y frutos secos. Sesiones interhospitalarias de la sociedad de Madrid-Castilla. La mancha de Alergología e inmunología clínica, Madrid, Luzan, pp. 295-306.
- **17.** Genc C. s.f. Hazelnut Filbert (*Corylus avellana* L.). Atatürk Horticultura Research Institute. Yalova-Istambul, Turkey. pp. 431 436.
- **18.** Germain, E., Sarraquigne P., (2004), Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Institut National de la Recherche Agronomique, Association Nationale des Producteurs de Noisette. France. p.295.
- **19.** Grau P., (2001). El avellano Europeo, un fruto de nuez especialmente para la zona centro sur . Boletín No.56. Informativo Agropecuario Bioleche INIA Quilamapu, p. 2.
- **20.** Heredia C,. (1989). Generación de tecnología apropiada para el cultivo de maní Arachis hypogaea L. en la región nor-oriental Guatemala. Guatemala, USAC, Dirección General de Investigación, 88, pp.7-64.
- **21.** Hidalgo E., Rio B., & Sienra J., (2009), Factores de riesgo de alergia alimentaria, Revista Alergia México, 56(5), 158-164p.
- **22.** Holzhauser T., Stephan O., Vieths S., (2002), Detection of Potentially Allergenic Hazelnut (Corylus avellna) Residues in Food: A Comparative Study with DNA PCR-ELISA and Protein Sandwich-ELISA. J. Agric. Food Chem., 50, pp.5808-5815.
- **23.** Krapovickas A. and Gregory C. W. (1995). Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia 8: 1-186.
- **24.** Mario, G. (2001). Cien años de anafilaxia. Artículo especial. *Alergol Immunol Clin.*, 16,364-368p.
- **25.** Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., & White, T.J., (2006), Optimization of PCR. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. London: CRC Press, pp. 5–11.
- **26.** Langerstedt, H. (1978). The fabulous filbert . Hort Science , , 13(2), p.122.
- **27.** Lehmann K, Hoffmann S, Neudecker P, Suhr M, Becher WM, & Ro¨sch P. (2003). High-yield expression in Escherichia coli, purification, and



- characterization of properly folded major peanut allergen Ara h 2. Protein Expr Purif, 31, pp.250–259.
- **28.** Lobos W. (1983), El avellano europeo, una nueva alternativa frutícola. Investigación y Progreso Agropecuario (IPA) Carillanca, 2 (1), p.18 21.
- **29.** Lopez, M., Vega, M., (2002). Informe de Voigilancia tecnológica: Microrrays y biochips de ADN. CIBT-FGUAM/Genoma España,.
- **30.** Norma Oficial Mexicana NOM-051-scfi/ssa1-2010, Especificaciones Generales de Etiquetado para Alimentos y Bebidas no alcohólicas Preenvasados Información Comercial y Sanitaria.
- **31.** Mustorp S., Dromtorp S., & Holck A., (2011), Multiplex, Quantitative, Ligation-Dependent Probe Amplification Determination of Allergens in Food. J. Agriculture and Food Chemistry, 59, pp.5231-5239.
- **32.** Ochse, J., (1965). Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales, México, Limusa, 2, p.1535.
- **33.** Ortiz, C., Fuentes, G., & Ortega, L., (1983), Determinación del nivel tecnológico empleado en el cultivo del maní, USAC, Centro Universitario del Oriente, p.67.
- **34.** Platteau C., Loose M., Meulenaer B. & Taverniers I., (2011). Quantitative detection of Hazelnut (*Corylus avellana*) in cookis: ELISA versus PCR. J. of Agricultural and Food Chemistry, **59**, pp.11395-11402.
- **35.** Puertas M.J., (1996). Genética: fundamentos y perspectivas. Madrid, McGraw-Hill, pp.420.
- **36.** Reina M., (2003), Material docente elaborado para la Universitat de Barcelona, <a href="http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/anticuerpos.htm">http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/anticuerpos.htm</a>.
- **37.** Rodríguez P., Barrera A., (2004). CIENCIA UANL, 7(3), 323-335p.
- **38.** SAGARPA, (2011). Monografía del Cacahuate, pp.1-7.
- **39.** SAGARPA, (2002). Producción del cultivo de cacahuate (*Arachis hypogaea I.*) en el estado de Morelos, Folleto Técnico Nº 18.
- **40.** Sambrook J., Russell D.W., (2001). Molecular Cloning a Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America,.



- **41.** Sánchez R., Díaz A., García G., & Salcedo G. (2001). Aplicación de la Biología Molecular en Alergia a Alimentos. Alergol. Inmunol. Lin., 16(2), pp.14-36.
- **42.** Sarigedik U., (2005) Turkey tree nuts annual. Global Agriculture Information Network Report. United States Department of Agriculture (USDA), Foreign Agricultural Service, p. 16.
- **43.** Sharrocks A.D. (2008). The design of primers for PCR. *PCR Technology: Current Innovations*. London: CRC Press, pp. 5–11.
- **44.** Shengjuan J., Songhua W., Yujun S., Zhengyi Z., & Guiqin W., (2011). Molecular characterization of major allergens Ara h 1,2,3 in peanut seed, Plant Cell Rep., 30, pp. 1135-1143.
- **45.** Soler J.M., Eiró, R., (2005).Inmunoterapia en patología alérgica pediátrica. *Pediatr Integral.* 8 pp. 575-590.
- **46.** Stephan O., Vieths S., (2004). Development of a PCR and a Sandwich ELISA for Detection of Potentially Allergenic Trace Amounts of Peanut /(*Arachis hypogaea*) in Processed Foods, J. Agric. Food Chem. **52(12)**, pp.3754-3760.
- **47.** Tamay de Dios L,Ibarra C, Velasquillo C, Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real,2013, 2 (2), pp70-78.
- **48.** Westwood, M., (1982). Fruticultura de zonas templadas. Madrid, España. Mundi Prensa., p. 461.
- **49.** Yuyinger JW, Jones RT., (1987). A review of peanut chemistry: implications for the standardization of peanut extractes. En Proceedings of the Four International Paul Ehrlich Seminar on the Regulatory Control and Standardization of Allergenic Extracts. Stuttgart:Fisher, pp. 251-264.
- **50.** Xueni C., Qian W., (2013). Ara h 2 and Ara h 6 have similar allergenic activity1 and are substantially redundant. *Int Arch Allergy Immunol.*; 160(3): pp. 251–258.

### **REFERENCIAS ELECTRONICAS**

## Ongeniería en Alimentos



- **51.** Características de los alérgenos mas importantes en el cacahuate. (s.f.). Recuperado el 30 de mayo de 2014, de <a href="https://nutricionpersonalizada.wordpress.com/2011/05/24/caracteristicas\_alergenos\_cacahuate/">https://nutricionpersonalizada.wordpress.com/2011/05/24/caracteristicas\_alergenos\_cacahuate/</a>
- 52. Naturaleza exponencial de los ciclos de PCR. (s.f.). Recuperado el 3 de Mayo del 2015 de <a href="http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcr.pdf">http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcr.pdf</a>



# Glosario

**ADN diana**: Es el ADN que se desea amplificar, también se le llama ADN molde. Su cantidad y calidad son factores determinantes de la eficacia de la reacción.

**Alérgeno:** Son las sustancias antigénicas capaces de producir una reacción alérgica. En realidad cada agente causante de alergia contiene más de un alérgeno, generalmente son proteínas, de modo que cada paciente alérgico suele estar sensibilizado a varios alérgenos de éste.

Alergia alimentaria: Alergia a alimentos es un término que se emplea para describir una reacción adversa condicionada por una respuesta inmune -tipo IgE ó mediada por células- frente a antígenos alimentarios. Sensibilización a alimentos indica una respuesta IgE demostrable frente a un alimento que no corresponde necesariamente a manifestaciones clínicas de alergia.

**BLAST:** "Basic Local Alignment Search Tool". Programa bioinformatico de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de AND, RNA o de proteína. El programa es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

**Cebadores o Primers:** Conocidos como primeros o iniciadores, son oligonucleótidos, es decir, secuencias de ADN de 15-30 bases de longitud complementarias de los extremos 3' de cada una de las cadenas de ADN diana.

**Epítope:** El epitope o determinante antigénico es la región de una proteína o antígeno que es reconocida por un anticuerpo y que se une a él para formar el complejo antígeno-anticuerpo. Dentro de esta definición general es esencial distinguir entre epítopes 'conformacionales' o 'discontinuos' y epítopes 'lineales'



o 'secuenciales'. Los epítopes conformacionales están constituidos por aminoácidos que, aunque están alejados en la secuencia primaria de la proteína, se aproximan cuando esta se pliega para lograr su estructura tridimensional. Los epítopes lineales, en cambio, están formados por residuos consecutivos incluidos en un mismo fragmento peptídico. El epitopo es el lugar donde se le une el anticuerpo al antígeno. El idiotipo es el epitopo a su vez del anticuerpo y así por lo tanto los anticuerpos antiidiotopo son los generados contra los anticuerpos y el TCR. Estos anticuerpos antiidiotopo a su vez van a generar nuevos anticuerpos contra si mismos y así se produce una reacción en cadena que gradualmente es de menor intensidad pero que está limitando la reacción inmunológica.

**Etiqueta:** cualquier rotulo, marbete, inscripción, imagen u otra materia descriptiva o gráfica, escrita, impresa, estarcida, marcada, grabada en alto o bajo relieve, adherida, sobrepuesta o fijada al envase del producto preenvasado o, cuando no sea posible por las características del producto, al embalaje.

**GenBank: es** la base de datos de secuencias genéticas del NIH (Nacional Institute of Health de Estados Unidos). Colección de secuencias de ADN de carácter público.

**Isoforma:** Una isoforma de proteína es cualquiera de varias formas diferentes de la misma proteína. Las diferentes formas de una proteína pueden ser producidas a partir de genes relacionados, o pueden surgir del mismo gen mediante corte y empalme alternativo. Un gran número de isoformas son causados por los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP, pequeñas diferencias genéticas entre los alelos del mismo gen. Estos se producen en las posiciones de nucleótidos individuales específicos dentro de un gen.

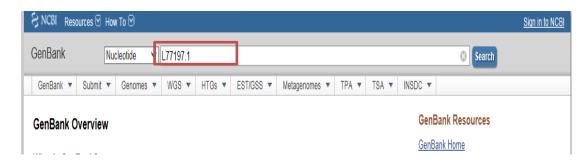
**Trazas:** Las trazas son pequeñísimas cantidades del alérgeno en un producto. A pesar de ser unas partículas minúsculas, también afectan a la salud del alérgico o intolerante.



## Anexo 1

## **Especificidad de Primers**

**1.** Ingresar al programa bioinformático de GenBankHome (<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>) y colocar el No. De referencia que se obtuvo del artículo, dar clic en buscar.



2. Copiar la secuencia.

```
ORIGIN

1 getcaccata ctagtagece tegecetttt cetceteget geecaegeat etgegaggea
61 geagtgggaa etceaaggag acagaagatg ceagagecag etegagaggg egaacetgag
121 geectgegag caacatetea tgeagaagat ceaaegtgae gaggatteat atgaaeggga
181 eecgtacage eetagteagg atcegtacag eectagteea tatgategga gaggegetgg
241 atceteteag caccaagaga ggtgttgeaa tgagetgaae gagtttgaga acaaceaaag
301 gtgeatgtge gaggeattge aacagateat ggagaaceag agegataggt tgeaggggag
361 geaaeaggag eaaeagtea agagggaget eaggaaettg eeteaaeagt geggeettag
421 ggeaceaeag egttgegaet tggaegtega aagtggege agagaeagat actaaeaee
481 tateteaaaa aaagaaaaga aaagaaaaga aaatagetta tatataaget attatetatg
541 gttatgttta gttttggtaa taataaagat eateaetata tgaatgtgt gategtgtta
601 actaaggeaa gettaggtta tatgageaee tttagagtge ttttatggeg ttgtetatgt
661 tttgttgetg eagagttgta accatettga aataatataa aaagateatg ttttgtt
```

**3.** Abrir Primer 3, pegar secuencia, primers frontal y reverso en el campo correspondiente y dar clic en Pick Primer.

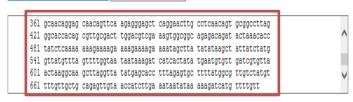
## Ongeniería en Alimentos



Drimar?	Checks for mispriming in template.	disclaimer	Primer3 Home
PTHILETS (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.	Primer3plus interface	cautions	FAQ/WIKI

#### There is a newer version of Primer3 available at http://primer3.ut.ee

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a Mispriming Library (repeat library): NONE



☑ Pick left primer, or use left prime	r below:	Pick hybridization probe (internal oligo), or use of	ligo below:	Pick right primer, or use righ	at primer below (5' to 3' on opposite strand):
tegecetttteeteeteget				tgcctcgcacatgcaccttt	

F: cttgtgcatgatggtggccgca

R: gccagcgatgcctttggctgta

F: tcgcccttttcctcctcgct

R: tgcctcgcacatgcaccttt

Copiar la secuencia, donde inicia >>>> hasta donde termina <<<<.

### **Primer3 Output**

WARNING: Numbers in input sequence were deleted.

```
No mispriming library specified Using 1-based sequence positions
```

WARNING: Left primer is unacceptable: Tm too high/High 3' stability; Right primer is unacceptable: Tm too hig

```
OLIGO <u>start len tm gc% any 3' seq</u>
LEFT PRIMER 21 20 67.67 60.00 2.00 0.00 tegecettteeteeteget
RIGHT PRIMER 316 20 67.33 55.00 4.00 0.00 tgectegeacatgeacettt
SEQUENCE SIZE: 717
INCLUDED REGION SIZE: 717
```

PRODUCT SIZE: 296, PAIR ANY COMPL: 2.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

# Ingenieria en Alimentos

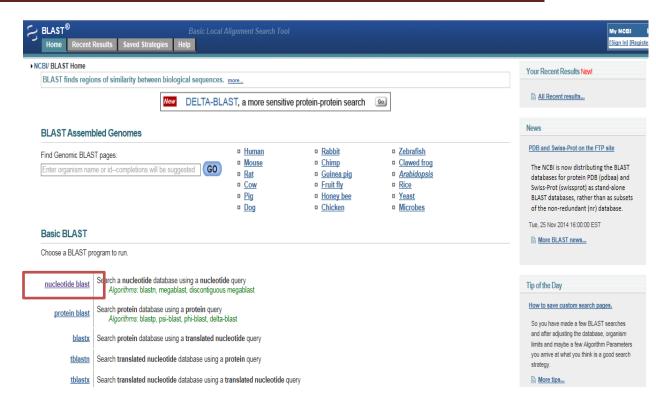


```
1 gctcaccatactagtagccctcgcccttttcctcctcgctgcccacgcatctgcgaggca
                      61 gcagtgggaactccaaggagacagaagatgccagagccagctcgagagggcgaacctgag
 121 gccctgcgagcaacatctcatgcagaagatccaacgtgacgaggattcatatgaacggga
 181 cccgtacagccctagtcaggatccgtacagccctagtccatatgatcggagaggcgctgg
 241 atcctctcagcaccaagagaggtgttgcaatgagctgaacgagtttgagaacaaccaaag
 301 gtgcatgtgcgaggcattgcaacagatcatggagaaccagagcgataggttgcaggggag
     <<<<<<<<
 361 gcaacaggagcaacagttcaagagggagctcaggaacttgcctcaacagtgcggccttag
 421 ggcaccacagcgttgcgacttggacgtcgaaagtggcggcagagacagatactaaacacc
 541 gttatgtttagttttggtaataataaagatcatcactatatgaatgtgttgatcgtgtta
 601 actaaggcaagcttaggttatatgagcacctttagagtgcttttatggcgttgtctatgt
 661 tttgttgctgcagagttgtaaccatcttgaaataatataaaaagatcatgttttgtt
KEYS (in order of precedence):
>>>>> left primer
<<<<< right primer
Statistics
Pair Stats:
considered 8, unacceptable product size 7, ok 1
primer3 release 1.1.4
```

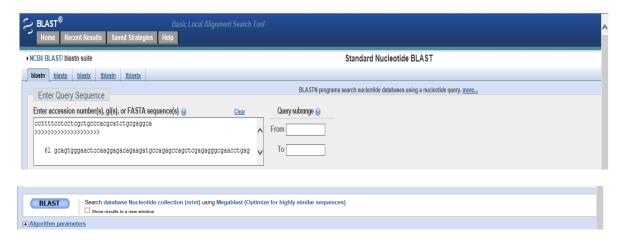
4. Abrir Blast, dar clic en nucleotid blast.

## Ingeniería en Alimentos





5 Pegar secuencia, dar clic en BLAST.



En la siguiente figura se demostró que la especificidad del gen en estudio, es del 100% con la especie cacahuate y con sus isoformas Ara h 2.01 y Ara h 2.02.

## Ongeniería en Alimentos

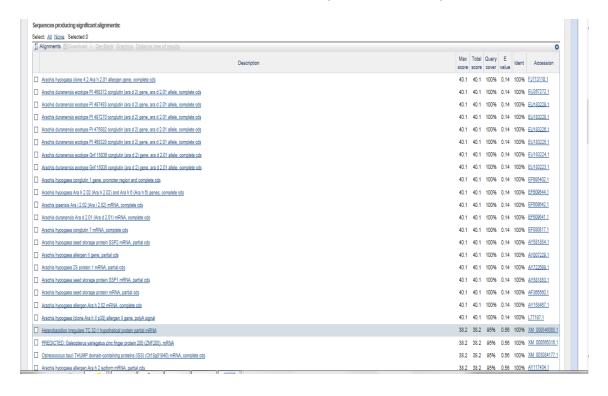


#### Sequences producing significant alignments: Select: All None Selected:0 Alignments Max Total Query E Ident Accession score score cover value 67.6 67.6 100% 3e-09 100% FJ713110.1 Arachis hypogaea clone 4.2 Ara h 2.01 allergen gene, complete cds Arachis duranensis ecotype PI 468372 conglutin (ara d 2) gene, ara d 2.01 allele, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EU267272.1 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EU183229.1 Arachis duranensis ecotype PI 497483 conglutin (ara d 2) gene, ara d 2.01 allele, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EU183225.1 ☐ Arachis duranensis ecotype PI 468320 conglutin (ara d 2) gene, ara d 2.01 allele, complete cds Arachis duranensis ecotype Grif 15036 conglutin (ara d 2) gene, ara d 2.01 allele, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EU183224.1 Arachis duranensis ecotype Grif 15035 conglutin (ara d 2) gene, ara d 2.01 allele, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EU183223.1 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EF695402.1 Arachis hypogaea conglutin 1 gene, promoter region and complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EF609644.1 Arachis hypogaea Ara h 2.02 (Ara h 2.02) and Ara h β (Ara h β) genes, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EF609642.1 Arachis ipaensis Ara i 2.02 (Ara i 2.02) mRNA, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EF609641.1 Arachis duranensis Ara d 2.01 (Ara d 2.01) mRNA, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% EF080817.1 Arachis hypogaea conglutin 7 mRNA, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% AY581854.1 Arachis hypogaea seed storage protein SSP2 mRNA, partial cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% AY007229.1 Arachis hypogaea allergen II gene, partial cds Arachis hypogaea allergen Ara h 2 isoform mRNA, partial cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% AY117434.1 Arachis hypogaea 2S protein 1 mRNA, partial cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% AY722689.1 Arachis hypogaea seed storage protein SSP1 mRNA, partial cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% AY581853.1 67.6 67.6 100% 3e-09 100% AF388580.1 Arachis hypogaea seed storage protein mRNA, partial cds Arachis hypogaea allergen Ara h 2.02 mRNA, complete cds 67.6 67.6 100% 3e-09 100% AY158467.1 67.6 67.6 100% 3e-09 100% L77197.1 Arachis hypogaea (clone Ara h II p38) allergen II gene, polyA signal

Realizar el mismo procedimiento con los primers, primero el frontal y después el Reverso (por separado).

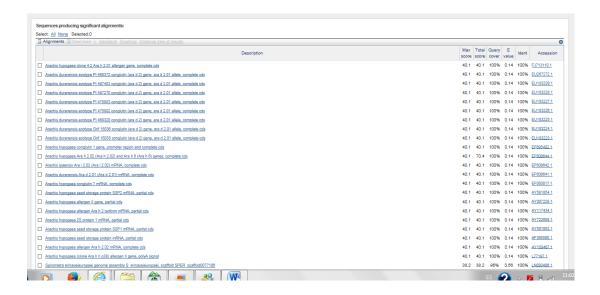
#### **Primer Frontal**

Se obtuvieron resultados de la misma especie con las que hace un 100%.





#### **Primer Reverso**



## Anexo 2

## Hidratación de primers

A continuación se describe el método para la hidratación de los primers, el cual parte de la siguiente formula

$$micromoles/250 = 10E - 6Litros$$

• Cálculo para primers de Cacahuate frontal

nmoles = 48.9

48.9 /1000 =0-0489µM

0.0489/250=0.0001956 E-4L

 $0.0001956/10 \text{ E-6} = 195.6 \,\mu\text{M}$  de  $\,\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas que se tiene que agregar.

Cálculo para primers de Cacahuate Reverso

Nmoles=43.8

43.8/1000= 0.0438 μM

# Ingenieria en Alimentes



0.0438/250= 0.0001752 L

 $0.0001752/10\text{E-6=}\ 175.2\ \mu\text{M}$  de  $\ H_2\text{O}$  libre de nucleasas que se tiene que agregar.