



Universidad Nacional Autónoma  
de México

---

---

Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán

*“Detección de especies animales no  
reportadas en la etiqueta de salchichas  
comerciales por medio de la Reacción en  
Cadena de la Polimerasa”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JULIO CESAR PONCE HERNÁNDEZ

Asesor: Dr. Francisco Montiel Sosa

Coasesor: M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **DEDICATORIAS**

A Dios, por haberme dado la vida, la oportunidad de conocerle, haberme permitido concluir la carrera y enseñado grandes lecciones que me hicieron crecer como persona y profesionalista.

A mis padres María Dolores y Esteban por haberme apoyado en todo momento, por sus palabras de ánimo y por haber creído en mí.

A mis hermanas Jaqueline y Rebeca porque fueron una gran fuente de apoyo e inspiración a lo largo de la carrera y por todos los momentos que hemos pasado juntos.

A “mi niña” Sara por haberme soportado durante casi toda la carrera, por sus palabras de aliento y por impulsarme a seguir siempre adelante y ser mejor cada día.

A todos mis compañeros de carrera por todos los momentos inolvidables que vivimos y todo el apoyo que me brindaron.

Gracias por todo.

Julio Cesar Ponce Hernández

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido formar parte de los profesionistas egresados de esta la máxima casa de estudios.

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa por haber marcado en mí el gusto por la biotecnología con su gran método de enseñanza.

A la M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza por haberme asesorado durante el desarrollo de este trabajo y haberme soportado durante todo este tiempo.

A la M. en C. Karla Mariana García Banda por haberme impartido en conjunto con la profesora Ana el taller de biotecnología y haber respondido a todas mis dudas por más inverosímiles que parecieran.

A mis sinodales por sus valiosas correcciones y por haberme hecho entender que toda corrección fue para mejora del presente trabajo.

Al apoyo recibido por parte del programa PIAPI1617 por financiar todos los insumos requeridos para el presente trabajo.

Julio Cesar Ponce Hernández

## Índice general

<b>Índice de figuras .....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice de cuadros.....</b>	<b>v</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>vi</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>vii</b>
<b>Capítulo 1. Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
1.1.    La carne.....	1
1.1.1.    Generalidades .....	1
1.1.2.    Características de la carne .....	2
1.1.3.    Situación actual del mercado cárnico.....	4
1.1.3.1.    Situación del mercado mundial.....	4
1.1.3.2.    Situación del mercado mexicano.....	5
1.1.3.2.1.    Carne de bovino .....	5
1.1.3.2.2.    Carne de porcino .....	6
1.1.3.2.3.    Carne de pollo .....	6
1.1.4.    Composición química.....	7
1.1.4.1.    Carbohidratos .....	7
1.1.4.2.    Proteínas .....	7
1.1.4.3.    Lípidos.....	7
1.1.4.4.    Agua .....	8
1.1.5.    Aporte nutrimental .....	9
1.1.6.    Clasificación de la carne .....	12
1.2.    Principales productos derivados de la carne.....	12
1.2.1.    Salchichas.....	14
1.2.2.    Adulteraciones.....	16
1.3.    Técnicas moleculares para la identificación de adulteraciones.....	18
1.3.1.    Técnicas de autenticación de especies basadas en análisis proteico.....	18
1.3.1.1.    Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	19
1.3.2.    Técnicas basadas en la secuenciación e identificación de ácidos nucleicos (ADN) .	19
1.3.2.1.    Generalidades del Acido Desoxirribonucleico (ADN).....	20
1.3.2.2.    Tipos de ADN, composición y estructura .....	20
1.3.2.2.1.    ADN nuclear .....	20
1.3.2.2.2.    ADN mitocondrial.....	22

1.3.3.	La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
1.3.3.1.	Fundamentos .....	24
1.3.3.2.	Metodología general.....	25
1.3.3.3.	Etapas de la PCR.....	27
1.3.3.4.	Ventajas y desventajas de la PCR .....	29
1.3.3.5.	Aplicaciones de la PCR.....	30
<b>Justificación del proyecto.....</b>		<b>32</b>
<b>Capítulo 2. Metodología experimental .....</b>		<b>33</b>
2.1.	Cuadro metodológico .....	33
2.2.	Material .....	34
2.2.1.	Biológico .....	34
2.2.2.	<i>Primers</i> .....	34
2.3.	Metodología .....	35
2.3.1.	Preparación de la muestra para la extracción de ADN.....	35
2.3.2.	Extracción y purificación de ADN .....	35
2.3.3.	Cuantificación del ADN.....	36
2.3.4.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	36
2.3.5.	Electroforesis en gel de agarosa .....	39
<b>Capítulo 3. Análisis y discusión de resultados .....</b>		<b>40</b>
3.1.	Objetivo particular 1.....	40
3.2.	Objetivo particular 2.....	42
3.3.	Objetivo particular 3.....	44
3.4.	Objetivo particular 4.....	50
3.5.	Objetivo particular 5.....	52
3.6.	Comparación entre especies encontradas y especies reportadas .....	57
<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>		<b>62</b>
<b>Referencias .....</b>		<b>64</b>
<b>Anexo .....</b>		<b>68</b>

## Índice de figuras

Figura 1: Diagrama de proceso para la elaboración de embutidos .....	16
Figura 2: Estructura de cada base nitrogenada que compone al ADN nuclear .....	21
Figura 3: Puentes de hidrógeno formados por las bases nitrogenadas con la cadena antiparalela de ADN nuclear .....	21
Figura 4: Estructura de doble hélice del ADN nuclear.....	22
Figura 5: Estructura del ADN mitocondrial.....	23
Figura 6: Diagrama de las etapas de la PCR.....	26
Figura 7: Esquema de las diferentes etapas de la PCR.....	28
Figura 8: Cuadro metodológico.....	33
Figura 9: Programa de PCR para la identificación de la presencia de carne de pollo y caballo.....	37
Figura 10: Programa de PCR para la identificación de la presencia de carne de cerdo.....	38
Figura 11: Programa de PCR para la identificación de la presencia de carne de pavo.....	38
Figura 12: Programa de PCR para la identificación de la presencia de carne de res.....	39
Figura 13: Portada del artículo publicado por Matsunaga.....	40
Figura 14: Secuencia de los <i>primers</i> utilizados.....	41
Figura 15: Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del <i>primer</i> para la identificación de carne de res.....	45
Figura 16: Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del <i>primer</i> para la identificación de carne de cerdo.....	46
Figura 17: Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del <i>primer</i> para la identificación de carne de pollo.....	47
Figura 18: Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del <i>primer</i> para la identificación de carne de pavo.....	48
Figura 19: Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del <i>primer</i> para la identificación de carne de caballo.....	49
Figuras 20 y 21. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de res en salchichas comerciales.....	52
Figuras 22 y 23. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de cerdo en salchichas comerciales.....	53

Figuras 24 y 25. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de pollo en salchichas comerciales.....	54
Figuras 26 y 27. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de pavo en salchichas comerciales.....	55
Figuras 28 y 29. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de caballo en salchichas comerciales.....	56

### Índice de cuadros

Cuadro 1: Panorama del mercado mundial de la carne.....	5
Cuadro 2: Producción y consumo estimado de carne de bovino en México.....	6
Cuadro 3: Producción y consumo estimado de carne de cerdo en México.....	6
Cuadro 4: Producción y consumo estimado de carne de ave en México.....	7
Cuadro 5: Composición química de las carnes más comunes por 100 g.....	9
Cuadro 6: Composición nutricional de algunos tipos y cortes de carne.....	11
Cuadro 7: Secuencias de los diferentes <i>primers</i> utilizados.....	34
Cuadro 8: Proporción de reactivos para cada tubo de PCR.....	37
Cuadro 9: Resultados de la extracción de ADN de muestras biológicas.....	43
Cuadro 10: Resultados obtenidos de las diluciones de ADN extraído de muestras biológicas.....	44
Cuadro 11: Resultados obtenidos de la extracción de ADN sin diluir de salchichas comerciales.....	50
Cuadro 12: Resultados obtenidos de las diluciones de ADN de salchichas comerciales....	51
Cuadro 13: Comparación entre especies encontradas y especies reportadas en las muestras comerciales analizadas.....	57



## Resumen

El siguiente trabajo muestra la utilidad de las técnicas moleculares y de manipulación del ADN, en este caso, para detectar adulteraciones en salchichas comerciales. Se analizó la presencia de 5 especies distintas (cerdo, pollo, bovino, pavo y caballo) en salchichas comerciales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) la cual permite obtener varias réplicas de ADN a partir de una cantidad muy pequeña de ADN molde.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron *primers* que fueron obtenidos a partir del artículo publicado por Matsunaga *et al.*, 1998 en donde se reporta un *primer* universal (SIM) y *primers* reversos diseñados para hibridar con las especies de pollo y caballo. Los *primers* utilizados para determinar presencia de carne de pavo fueron obtenidos del artículo publicado por Hernández *et al.*, 2011, para la identificación de la presencia de carne de cerdo se creó un programa de PCR basado en las recomendaciones del fabricante del reactivo *Master Mix* y en la temperatura de hibridación de los *primers* que fue de 52 °C en promedio y los *primers* utilizados para res fueron obtenidos del artículo publicado por Casa *et al.*, 2005. Posteriormente se comprobó su especificidad para evitar hibridaciones con otras especies y no tener errores al momento de detectar adulteraciones.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de las muestras analizadas contenían una o más especies animales que no se reportan en la etiqueta de dichos productos, lo que hizo que se consideraran productos adulterados. Las especies que se encontraron con más frecuencia fueron pollo (encontrado en todas las muestras analizadas) y res. Solo en 3 muestras comerciales de las 11 analizadas coincidieron las especies animales reportadas en la etiqueta del producto y las encontradas en el laboratorio.

## **Introducción**

La salchicha es un alimento ampliamente consumido en México por su practicidad, precio y versatilidad, esto la hace fácilmente vulnerable a adulteraciones como sustitución de carne por otra de menor precio, mezcla de carne de varias especies, adición de aglutinantes y/o harinas y sustitución de carne por soya, es por eso que se necesitan técnicas adecuadas para detectar este tipo de adulteraciones. Las técnicas moleculares para la autenticación de especies han ido cobrando auge en los últimos años al igual que han ido aumentando las formas de adulteración de distintos tipos de alimentos. Algunas de estas técnicas se basan en el análisis proteico de la muestra y tienen una buena precisión, sin embargo, las proteínas son diferentes en un mismo organismo y muchas veces estas se encuentran degradadas lo que limita la aplicación de la técnica y surge la necesidad de un método aún más específico para la detección de adulteraciones.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite detectar dichas adulteraciones con una muy alta precisión ya que se basa en la replicación y amplificación del ADN de cada especie por lo que es una herramienta muy útil en el campo de la biotecnología de los alimentos.

Existen diferentes tipos de salchichas en México ya sea de producción nacional o de importación que por su naturaleza o denominación de origen tienen variaciones en sus precios siendo las de mejor calidad y mayor contenido de carne las que presentan precios más elevados, sin embargo, algunas declaran ingredientes que no contienen y otras adicionan ingredientes que no son declarados en las etiquetas, con lo que induciría a error al consumidor violando la normatividad vigente en materia de etiquetado.

Es por eso que en este trabajo se busca detectar las especies no reportadas en la etiqueta de algunas salchichas comerciales utilizando la técnica molecular anteriormente descrita, esto podría introducirse como una medida de control de calidad en auditorias y/o estudios de calidad para asegurar que el consumidor está adquiriendo un producto cuyo contenido coincide con los ingredientes que se encuentran reportados en sus etiquetas.

## Capítulo 1. Antecedentes

### 1.1.La carne

#### 1.1.1. Generalidades

La carne es el alimento procedente de los animales, aunque con frecuencia se utiliza también este término para incluir otros órganos como hígado, riñón, y otros tejidos comestibles (Lopez y Casp, 2004).

De acuerdo a la NOM-009-ZOO-1994, la carne se define como la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano (SAGARPA, 1994).

La carne es obtenida del músculo de mamíferos como lo son el cerdo, res, cabra, ciervo y caballo. Para su obtención se suele seguir la siguiente metodología (Barbut, 2013):

- Abasto de animales (acarreo, descarga, etc).
- Aturdimiento
- Desangrado
- Remoción de pelo, plumas, piel y/o escamas
- Estimulación eléctrica (en algunos casos para mejorar las características finales de la carne)
- Evisceración
- Inspección
- Refrigeración
- Corte de la canal
- Empacado y distribución

La transformación del músculo en carne implica ciertos cambios, los más importantes son:

- **Glucólisis *post-mortem*:** El cambio más inmediato al desangrado del animal es la interrupción del aporte de oxígeno a los músculos, con la consiguiente disminución del pH. Cuando la circulación cesa, los músculos ya no pueden obtener energía por medio de la respiración, ya que la actividad mitocondrial cesa con la reducción del oxígeno. En consecuencia el glucógeno, la principal reserva de energía del músculo, se convierte en lactato por medio de glucólisis anaerobia también llamada glucólisis *post-mortem*. En este proceso, se produce una activación de la ATP-asa no contráctil de la miosina, en lugar de la ATP-asa contráctil de la actomiosina. La acción continuada de la ATP-asa no contráctil de la miosina reduce progresivamente el nivel de ATP produciendo simultáneamente fosfato inorgánico. A medida que discurre la glucólisis anaerobia el músculo se hace inextensible debido a que el descenso del nivel de ATP provoca la formación de actomiosina, lo que causa una contracción sostenida llamada ***rigor mortis*** (Lopez y Casp, 2004).
- **Disminución del pH:** La reducida disponibilidad de ATP aumenta la dificultad de mantener la integridad estructural de las proteínas, lo que causa el descenso de pH por acumulación de lactato. El descenso del pH hace que las proteínas miofibrilares se aproximen a sus puntos isoeléctricos y frecuentemente la desnaturalización va acompañada de una reducida capacidad de retención de agua de las proteínas, lo que causa la exudación. La conversión del glucógeno a lactato continuará hasta que se alcance un pH en el que se inactiven las enzimas que efectúan la degradación, este pH es de aproximadamente 5.4-5.5. El descenso del pH también contribuye al color y a la calidad final de la carne (Lopez y Casp, 2004).

### 1.1.2. Características de la carne

- **Terneza:** De todas las características sensoriales que contribuyen a la calidad de la carne, la terneza es probablemente la más importante a la hora de su compra, ya que ésta es una parte fundamental en cuanto a la aceptabilidad o rechazo por parte del consumidor. La dureza o terneza de la carne depende de un gran número de factores biológicos intrínsecos tales como raza, edad, sexo, alimentación, tipo de

músculo y manejo *ante y post-mortem* (Hui, Legarreta, y Rosmini, 2010). La variación en la terneza de la carne se debe a numerosos factores, aunque en general se atribuye a la disminución del pH. Howard y Lawrie (1956) encontraron una relación inversamente proporcional en la disminución del pH *post-mortem* y la terneza de la carne cocida, mientras que Marsh (1962) encontró una relación directamente proporcional entre el tiempo posterior al *rigor mortis* y la terneza de la carne (Lawrie y Ledward, 2006).

- **Color:** El color ocupa un lugar preferente entre los factores que definen la calidad de un alimento. De una forma sencilla, el color de la carne se podría determinar por medio de los pigmentos presentes en la misma, los cuales se podrían clasificar en cuatro tipos: el primer lugar correspondería a los pigmentos biológicos (carotenos y hemopigmentos) que son acumulados y sintetizados en el organismo *ante-mortem*; el segundo correspondería a los pigmentos producidos por daños durante su manejo o por unas condiciones de proceso inadecuadas; el tercero correspondería a la formación de pigmentos *post-mortem* (reacciones enzimáticas o no enzimáticas) y el cuarto correspondería al uso de colorantes naturales o artificiales que se pueden añadir al producto cárnico (Hui *et al.*, 2010). El tejido muscular en la canal fresca sin procesar debe presentar una coloración roja oscura uniforme (Dominguez, 2011), lo que indicaría, junto con la terneza, que la carne es de buena calidad.
- **Aroma:** Las canales de las diferentes especies de abasto no deben presentar olores específicos ni acentuados. La ausencia de olor se mantendrá desde su obtención hasta su maduración. Se debe interpretar como anómala la percepción de olores durante el refrigerado (Dominguez, 2011).
- **Sabor:** La carne cocida puede presentar varios sabores dependiendo de la zona que se consume y su proceso o preparación. Los aminoácidos, péptidos y nucleótidos, además de producir compuestos volátiles durante la cocción de la carne, también contribuyen a la percepción del sabor salado, dulce, amargo y ácido de la carne y productos cárnicos. Los compuestos solubles en agua incluyen sales, aminoácidos, péptidos, azúcares libres, azúcares fosforilados, nucleótidos y otros componentes nitrogenados como tiamina. La mayoría de los compuestos solubles en agua pueden generar por sí solos sensaciones de salado, amargo, ácido o dulce. El gusto salado

se debe a la presencia de sales como el cloruro de sodio o potasio. Los azúcares como glucosa y algunos L- $\alpha$ -aminoácidos (glicina, alanina, serina, treonina, lisina, cisteína, metionina, aparragina, glutamina, hidroxiprolina y prolina) generan el sabor dulce. Por otra parte, el sabor amargo se debe a la presencia de hipoxantina, de péptidos como la anserina y carnosina, y a algunos L- $\alpha$ -aminoácidos (histidina, arginina, lisina, metionina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, tirosina y glutamina). La presencia de ácidos orgánicos como el láctico y el acético, además de algunos aminoácidos ácidos (aspártico, glutámico, histidina y aparragina) y fosfatos ácidos son responsables del gusto ácido y amargo (Lawrie y Ledward, 2006).

### **1.1.3. Situación actual del mercado cárnico.**

#### **1.1.3.1. Situación del mercado mundial.**

Las previsiones indican que la producción mundial de carne experimentará un aumento moderado en 2015, situándose en 318.7 millones de toneladas, es decir, 1.3 por ciento o 4 millones de toneladas más que en 2014; los mayores aumentos deberían de registrarse en China, la UE, los Estados Unidos y el Brasil. El sector de la carne porcina debería de impulsar el crecimiento mundial, seguido por el de las aves de corral. Actualmente no se prevé más que un leve aumento de la producción de carne de bovino y de ovino (FAO, 2015).

Según las previsiones, el comercio mundial de la carne crecerá a un ritmo moderado del 1,7 por ciento en 2015, hasta alcanzar 31,2 millones de toneladas, una disminución importante con respecto al 3,1 por ciento registrado el año pasado. El comercio de la carne de aves de corral debería de crecer al ritmo limitado del 2,6 por ciento y situarse en 13,1 millones de toneladas en 2015. El aumento de la producción de los países importadores sigue reduciendo su necesidad de suministros externos de aves de corral. El comercio de carne de bovino también debería de aumentar al ritmo limitado del 1,9 por ciento y totalizar 9,8 millones de toneladas. Mientras tanto, se prevé que la carne de cerdo se recupere en un 1,6 por ciento en 2015, situándose en 7,1 millones de toneladas, tras las disminuciones registradas en los dos años anteriores. En general, el índice de precios de la carne de la FAO disminuyó en los primeros cuatro meses de 2015, pasando de 183 puntos en enero a

178 puntos en abril. El descenso de los precios afectó a todas las categorías de carne (FAO, 2015).

Cuadro 1 Panorama del mercado mundial de la carne (FAO, 2015).

	2013	2014 Estim.	2015 Pronost.	Variación de 2015 a 2014
	Millones de toneladas			%
<b>Producción</b>	<b>311.1</b>	<b>314.7</b>	<b>318.7</b>	<b>1.3</b>
Carne de bovino	67.8	67.8	67.9	0.2
Carne de ave	108.6	110.2	111.8	1.4
Carne de cerdo	115	117.2	119.4	1.9
Carne de ovino	13.9	13.9	14	0.8
<b>Comercio</b>	<b>29.7</b>	<b>30.6</b>	<b>31.2</b>	<b>1.7</b>
Carne de bovino	8.9	9.6	9.8	1.9
Carne de ave	12.5	12.7	13.1	2.6
Carne de cerdo	7.1	7	7.1	1.6
Carne de ovino	1	1	0.9	-8.5
<b>Índice de la FAO para los precios de la carne</b>				
	184	198	178	-3.6

### 1.1.3.2. Situación del mercado mexicano

#### 1.1.3.2.1. Carne de bovino

En 2011, se estimó un inventario inicial total de 31.7 millones de cabezas, de las cuales 6.4 millones pertenecieron al hato para la producción de carne; 4.4 millones en la actividad de doble propósito, y 2.3 millones en la producción lechera especializada. Durante el periodo de estudio 2011-2020, se estima que el inventario total incremente a una tasa media anual de crecimiento (TMAC) de 1.4%. Durante el periodo de estudio, se estima un nivel de exportación anual de 1.3 millones de cabezas. Con respecto al consumo de carne de bovino, se proyecta un ligero aumento de 251 mil toneladas métricas a lo largo del periodo de estudio. En 2016, se tuvo un consumo aparente de 2 millones de toneladas métricas y en 2020 se estima que éste alcance 2.2 millones de toneladas métricas (SAGARPA, 2011).

Cuadro 2 Producción y consumo estimado de carne de bovino en México (SAGARPA, 2011)

Año calendario	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Carne</b>	(miles de toneladas métricas)											
Producción	1,705.0	1,751.2	1,792.7	1,850.0	1,903.3	1,943.5	1,982.1	2,015.0	2,043.5	2,069.1	2,091.0	2,107.9
Importaciones	296.7	220.1	189.3	156.6	136.5	134.7	134.3	143.5	160.1	176.5	190.1	192.2
Consumo doméstico	1,960.8	1,885.3	1,894.0	1,918.3	1,951.1	1,989.6	2,027.8	2,070.0	2,115.2	2,157.4	2,193.1	2,212.1
Exportaciones	40.9	86.0	88.0	88.4	88.7	88.7	88.7	88.6	88.4	88.2	88.0	88.0

### 1.1.3.2.2. Carne de porcino

Debido a que el ciclo de producción del cerdo es corto, el ajuste del sector a los cambios de las condiciones económicas se lleva a cabo con mayor rapidez que en el caso del sector bovino. Durante el periodo de estudios 2011-2020, se estima que el consumo de carne de cerdo incrementa en 292 mil toneladas. Asimismo, se prevé que el sacrificio total aumente de 15.9 millones de cabezas en 2011 a 19 millones en 2020. Considerando el peso promedio nacional de sacrificio, la producción nacional de carne de cerdo se incrementaría de 1.17 millones de toneladas en 2011 a 1.42 millones de toneladas en 2020. En 2016, se tuvo un consumo aparente de 2.1 millones de toneladas métricas y en 2020 se estima que éste alcance 2.1 millones de toneladas métricas (SAGARPA, 2011).

Cuadro 3 Producción y consumo de carne de cerdo en México (SAGARPA, 2011).

Año calendario	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Carne de cerdo</b>	(miles de toneladas métricas)											
Producción	1,162.9	1,165.5	1,170.7	1,228.9	1,255.0	1,304.7	1,343.5	1,367.5	1,381.3	1,392.6	1,404.3	1,416.2
Importaciones	771.7	784.3	796.2	746.1	757.3	757.4	765.5	780.2	788.0	794.8	797.5	810.2
Oferta	1,934.7	1,949.7	1,966.9	1,974.9	2,012.3	2,062.1	2,109.0	2,147.7	2,169.3	2,187.4	2,201.8	2,226.4
Consumo	1,882.5	1,888.7	1,907.0	1,916.9	1,955.4	2,005.2	2,053.0	2,093.1	2,115.5	2,134.3	2,148.9	2,174.8
Exportaciones	52	61	60	58	57	57	56	55	54	53	53	52

### 1.1.3.2.3. Carne de pollo

El pollo tiene diversos ciclos de producción al año. En 2011 fueron sacrificados 1.65 millones de aves y se proyecta que en 2020 sean 1.8 millones de aves. En este periodo se espera que el consumo de carne de pollo crezca en 922 mil toneladas. Además, derivado de los cambios en la dieta de los consumidores y de los precios relativos del pollo en comparación con los de la carne de cerdo y la de bovino, se espera que el consumo per cápita de pollo se incremente de 30 kg en 2011 a alrededor de 32 kg en 2020. El consumo aparente en 2016 fue de 3.8 millones de toneladas métricas (SAGARPA, 2011).



Cuadro 4 Producción y consumo de carne de ave en México (SAGARPA, 2011).

Año calendario	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Carne de ave</b>	(miles de toneladas métricas)											
Producción	2,636.5	2,693.6	2,854.5	2,991.7	3,108.6	3,142.9	3,211.7	3,237.1	3,300.4	3,325.0	3,401.6	3,429.7
importaciones	480.5	535.7	570.5	581.0	568.4	575.6	577.6	589.9	592.2	600.3	597.6	603.2
Oferta	3,117.0	3,229.3	3,425.1	3,572.7	3,677.1	3,718.5	3,789.3	3,827.0	3,892.6	3,925.2	3,999.1	4,032.9
Consumo	3,111.4	3,218.7	3,414.6	3,573.7	3,678.1	3,719.6	3,790.4	3,828.1	3,893.6	3,926.3	4,000.2	4,034.0

#### 1.1.4. Composición química

##### 1.1.4.1. Carbohidratos

La carne no es una fuente importante de carbohidratos, contiene alrededor de un 0.81% de glucógeno y cantidades muy bajas de otros carbohidratos.

El glucógeno es un polisacárido formado por unidades de  $\alpha$ -D-glucosa unidas por medio de enlaces  $\alpha$ -1,6 y  $\alpha$ -1,4 glucosídicos. En la carne aparecen también bajas cantidades de azúcares (0.1-0.15%), los más abundantes son la glucosa-6-fosfato y otros azúcares fosforilados (Lopez y Casp, 2004).

##### 1.1.4.2. Proteínas

La miosina es la más abundante de las proteínas miofibrilares, estas presentan altos contenidos de los ácidos glutámico y aspártico y de aminoácidos dibásicos, por lo que presenta una carga eléctrica alta y tiene cierta afinidad por los iones calcio y magnesio. La otra proteína mayoritaria de las miofibrillas es la actina, puede existir en dos formas: la actina G, que consta de unidades globulares relativamente pequeñas; y la actina F, en la que dichas unidades globulares se unen entre sí para formar una doble cadena. Es la actina F la que se combina con la miosina para formar la actomiosina contráctil del músculo activo o *pre-rigor* y la actomiosina inextensible del músculo en *rigor mortis* (Lopez y Casp, 2004).

##### 1.1.4.3. Lípidos

La carne tiene un contenido de lípidos relativamente alto, son esencialmente triacilglicéridos. Varían según la especie y también en función de la posición del músculo en el cuerpo, la dieta, la edad, el género, el estado sexual y el peso (Lopez y Casp, 2004). Como las fracciones lipídicas asociadas a los tejidos muscular y adiposo difieren en lo que

respecta a su cantidad y composición, la calidad del tejido adiposo que hay en la carne afecta poderosamente la composición general del producto. Además, si el contenido de tejido adiposo disminuye, aumenta el porcentaje con que contribuyen los fosfolípidos al total lipídico. A pesar de la menor contribución de la fracción fosfolipídica a la totalidad del contenido lipídico, la naturaleza poliinsaturada de los fosfolípidos junto a su elevada relación superficie/volumen hace que estos lípidos sean muy susceptibles a las reacciones oxidativas, lo que contribuye poderosamente al deterioro del color y sabor de la carne (Damodaran, Parkin, y Fennema, 2010).

#### **1.1.4.4. Agua**

El agua se localiza en su mayor parte en el interior de la célula muscular o bien atrapada entre ellas y, en menor cuenta, ligada a las proteínas con distinta intensidad. Las variaciones en el contenido de agua se deben generalmente a los cambios en el contenido lipídico (Damodaran *et al.*, 2010).

La capacidad de retención de agua es un parámetro de calidad importante y se define como la capacidad de la carne para retener el agua del tejido presente en su estructura. Muchas de las características de la carne tales como el color, la textura y la firmeza de la carne de canal, así como la jugosidad, palatabilidad y dureza de la cocinada, dependen en gran parte de la capacidad de retención de agua, que está íntimamente ligada con el pH final de la carne (Lopez y Casp, 2004).

Cuadro 5 Composición química de las carnes más comunes por 100 g. (FAO, 2007).

Producto	Agua	Proteína	Grasas	Cenizas	kJ
Carne de vacuno (magra)	75	22.3	1.8	1.2	116
Canal de vacuno	54.7	16.5	28	0.8	323
Carne de cerdo (magra)	75.1	22.8	1.2	1	112
Canal de cerdo	41.1	11.2	47	0.6	472
Carne de ternera (magra)	76.4	21.3	0.8	1.2	98
Carne de pollo	75	22.8	0.9	1.2	105

### 1.1.5. Aporte nutrimental

Investigaciones recientes en las necesidades del cuerpo humano de nutrientes esenciales (como la proteína de alta calidad) a lo largo de su ciclo de vida se han enfocado en la carne como una de las principales opciones en una dieta saludable (Binnie, Barlow, Johnson, & Harrison, 2014). La carne es una fuente importante de proteínas de alto valor biológico, hierro, vitamina B12 y otras vitaminas del complejo B, zinc, selenio y fósforo. Su alto contenido de grasas varía de acuerdo con la especie, pero representa para el consumidor una constante preocupación debida al riesgo de desarrollar enfermedades (Cardoso y Baltazar, 2012).

Como se mencionó antes, la carne contiene aproximadamente, en promedio, 22% de proteínas, pero puede ser tan alto como 34.5% (pechuga de pollo) o tan bajo como 12.3% (carne de pato) dependiendo del origen de la carne. Adicionalmente, las proteínas de la carne contienen aminoácidos esenciales para el cuerpo. El consumo inadecuado o insuficiente de aminoácidos, las unidades primarias de las proteínas, puede llevar a una malnutrición proteica (Cardoso y Baltazar, 2012).

El contenido de grasa difiere significativamente de acuerdo con la variedad de cortes de la carne de res, pollo y otras carnes, y también difiere de los productos cárnicos procesados como salchichas o jamón. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) reporta un contenido de grasa de 5.4 a 7.9% en cortes de carne mientras que para carne de cerdo reporta un contenido de grasa de 8 a 10.7% (Cardoso & Baltazar, 2012). Estudios recientes han establecido el perfil de ácidos grasos en carnes rojas magras. De acuerdo con dichos estudios las carnes rojas magras (como res, cerdo y cordero) contienen proporciones similares de ácidos grasos monoinsaturados, saturados y poliinsaturados, lo que hace de la carne magra una buena opción para el consumidor, mientras que en los productos procesados (salchichas, tocinos, jamones, etc) contienen más colesterol que las carnes magras, haciéndolos menos nutritivos (Binnie *et al.*, 2014).

Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados, los ácidos grasos *Omega 3* juegan un papel importante como agentes protectores contra enfermedades cardiovasculares y el cuidado de la salud en general. El pescado es la principal fuente de ácidos grasos *Omega 3*, pero la ingesta de carne magra puede contribuir con hasta el 20% de las necesidades de ácidos grasos de cadena larga *Omega 3* (Cardoso y Baltazar, 2012).

La carne también es una excelente fuente de vitaminas y minerales. Las carnes rojas proveen alrededor del 25% de la ingesta diaria de riboflavina, niacina, vitamina B6, ácido pantoténico y prácticamente dos terceras partes de vitamina B12 por cada 100 gramos de carne. La carne de pollo es una buena fuente de niacina (56% de la ingesta diaria por cada 100 gramos) y de vitamina B6 (27% de la ingesta por cada 100 gramos), mientras que 100 gramos de carne de pavo suministran 31% de la ingesta de niacina y 29% de la ingesta diaria de vitamina B6 (Cardoso y Baltazar, 2012).

En adición a proteínas y ácidos grasos, la carne contiene ciertos micronutrientes como hierro, zinc, selenio y potasio. La biodisponibilidad del hierro y del zinc es mayor en carnes rojas que en otros productos procesados, por otro lado, el hierro es importante en el desarrollo cognitivo de los niños y del sistema inmunológico. El selenio contenido en las carnes rojas actúa como antioxidante necesario para el correcto funcionamiento del sistema inmune y el potasio regula la presión sanguínea (Binnie *et al.*, 2014).

Cuadro 6 Composición nutricional de algunos tipos y cortes de carne (Binnie *et al.*, 2014).

Tipo de carne	Contenido energético (kcal)	Proteínas (g)	Grasas (g)	Grasas saturadas (g)	Vitamina B12 (µg)	Na (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)
Pechuga de pollo sin piel (cruda)	108	24.1	1.2	0.3	0.37	60	220	0.5	0.8
Pechuga de pollo cruda	176	24.1	8.9	2.1	0.37	72	200	1	0.8
Pollo en general (crudo)	110	22.9	2	0.5	0.72	77	204	0.9	1
Bisteck de res (crudo)	122	20.9	4.3	1.8	2	60	169	1.4	3.6
Lomo de res (crudo)	114	21	3.3	1.4	2	60	145	1.5	3.6
Lomo de cerdo (crudo)	131	22.2	4.7	1.6	1	53	221	0.6	1.6
Chuleta de cerdo (cruda)	355	17.3	31.8	10.9	1	61	189	1.3	1.7
Pierna de cerdo (cruda)	152	21	7.5	2.6	1	86	167	0.7	2,7
Pechuga de pavo sin piel (cruda)	105	23.4	1.3	0.3	1	63	210	0.7	0.6

### 1.1.6. Clasificación de la carne

De acuerdo a su procedencia la carne se puede clasificar en (Forrest, 1979):

- **Carnes rojas:** Las más comunes de este tipo son las provenientes de vacuno, cerdo y ovino, sin embargo, en muchos países se consumen también las procedentes de equinos, cabras, antílopes, llamas y conejos.
- **Carne de aves:** Es la procedente de la musculatura de las aves domésticas que comprenden gallinas, pavos, gansos y gallinas de guinea.
- **Carne de animales marinos:** Los peces constituyen la mayor parte de esta carne en el consumo humano. No obstante la carne de mejillones, almejas, langostas, ostras, cangrejos y muchas otras especies también se incluyen en esta categoría.
- **Carne de caza:** Es la que procede de los animales silvestres o no domesticados.

### 1.2. Principales productos derivados de la carne

De acuerdo con la NOM-213-SSA1-2002, los productos cárnicos se clasifican de la siguiente manera (Secretaría de Salud, 2003):

- **Productos cárnicos cocidos:** A los elaborados con carne, vísceras, sangre o sus mezclas, curados o no, que son sometidos a un proceso térmico. Pueden presentarse enteros, en cortes, emulsionados o troceados.
- **Productos cárnicos crudos:** A los elaborados con carne, vísceras o sus mezclas, que pueden ser curados o no o madurados y que no son sometidos a ningún tratamiento térmico.
- **Productos cárnicos curados:** A los que se les agregan por vía húmeda o seca sal o azúcares, nitratos o nitritos, independientemente de que sean sometidos a tratamiento térmico, a maduración o se manejen crudos.
- **Productos cárnicos desecados, secos o salados:** A los sometidos a reducción de humedad por medio de aire, calor o sal hasta llegar a un valor no mayor a 25%.
- **Productos cárnicos empanados o rebozados congelados:** A los elaborados con carne molida o picada en piezas, con adición o no de tejido graso, subproductos y aditivos, que pueden recibir un tratamiento térmico durante su elaboración, pero que necesitan ser cocinados para consumirlos.

- **Productos cárnicos fritos:** A los elaborados a partir de carne o piel y que son sometidos a freído en aceite o grasa, con o sin sal, curados o no.
- **Productos cárnicos madurados:** A los que son sometidos a deshidratación parcial, pudiendo ser ahumados o no, sometidos durante cierto tiempo a la acción de cultivos microbianos, enzimas o microorganismos propios de la carne y su acción sobre azúcares añadidos o no. Pueden ser en cortes enteros o troceados.
- **Productos cárnicos marinados o en salmuera:** A los adicionados de sal u otros aditivos por vía seca o húmeda, excepto nitritos y nitratos, pudiendo ser cocidos o no.
- **Productos cárnicos procesados:** A los elaborados a partir de carne, vísceras, estructuras anatómicas, sangre o sus mezclas, provenientes de mamíferos o aves, que pueden someterse a ahumado, cocción, curación, desecación, maduración, salado, entre otros.

Desde una perspectiva global, la industria cárnica se encuentra con una enorme complejidad de fórmulas y variables de procesamiento. Esto es así tanto en países industrializados como en los que están en vías de desarrollo, en todos ellos se elaboran productos cárnicos finamente picados o emulsionados con porcentajes de carne magra que oscilan entre el 5% y 50%. El nuevo reto que surge ahora para los fabricantes de productos cárnicos y de ingredientes funcionales es trabajar conjuntamente para desarrollar un nuevo enfoque que permita obtener productos competitivos y de calidad que cumplan las expectativas de los consumidores y la normatividad vigente (Hoogenkamp, 2008).

La hamburguesa, un clásico americano creado a principios de 1900, se ha convertido en el producto cárnico procesado más apreciado del mundo. Realmente este producto se dio a conocer cuando los restaurantes de comida rápida diseñaron un “sándwich sorprendente” que se convirtió en el primer alimento que se podía comer con las manos (Hoogenkamp, 2008). La carne de hamburguesa, es clasificada como un producto picado (no embutido) y según los métodos de procesado como producto cárnico fresco (Ramírez *et al.*, 2006). En la actualidad en la fabricación de productos cárnicos se usan proteínas de origen vegetal y generalmente se agregan porque ayudan a mejorar el ligado del agua en los productos de carne molida y/o emulsificada, manteniendo la red de proteínas en el producto cárnico; y

mejoran la formación y estabilidad de la emulsión. Todos estos beneficios mejoran la jugosidad y tienen un efecto en la textura del producto (Carrillo *et al.*, 2010).

También existen los jamones curados. Un jamón se debe fabricar a partir del miembro posterior del cerdo, pero el tamaño de la pieza cárnica puede variar desde el de un músculo entero al de piezas formadas por fragmentos relativamente pequeños (trozos) que se han reestructurado ingeniosamente. Las modernas tecnologías para procesar piezas cárnicas enteras, tales como los jamones cocidos, el pastrani, la cecina de vaca, el rosbif y la pechuga de pavo, tienen en común que todos requieren un masaje (curado) para solubilizar las proteínas cárnicas y así obtener una óptima capacidad de retención de agua, el desarrollo del color y la alineación muscular (Hoogenkamp, 2008).

### **1.2.1. Salchichas**

Los productos emulsionados, como las salchichas tipo Frankfurt, las salchichas para hot-dog, salchichas tipo Viena, de pavo, etc., se elaboran a partir de carne que esta parcial o completamente picada junto con agua, sal y otros coadyuvantes tecnológicos como los fosfatos, citratos, carbohidratos, proteínas no cárnicas y condimentos. El producto resultante se puede describir como un sistema de múltiples fases que contiene ingredientes disueltos en agua, agua con partículas en suspensión o un gel (Hoogenkamp, 2008).

Las salchichas se elaboran de acuerdo al siguiente proceso, descrito posteriormente en la figura 1 (Muller y Ardoíno, 2000):

- **Preparación de las diferentes materias primas:** Se verifica que la carne que es suministrada corresponde a las especificaciones del tipo de carne que se empleará. Si cumplen con las especificaciones de calidad se procede con el proceso, de lo contrario se rechaza.
- **Picado:** Con todos los elementos disponibles, se inicia el picado en el cúter. Se comienza, con el orden establecido, poniendo las carnes frescas (2 a 4°C) en el plato limpio del cúter. Se empieza picando con velocidad lenta de plato y cuchillas e inmediatamente se agregan la sal, el azúcar, los polifosfatos y las especias, previamente mezclados en una bolsa. Luego de 6 a 8 vueltas, se agrega el 50 % del hielo, se aumenta la velocidad del plato y cuando la temperatura de la pasta llega a



4°C, se agrega la emulsión de cuero, luego la emulsión de grasa, se aumenta la velocidad de las cuchillas y se sigue picando hasta llegar a 8°C. Se agrega la mitad restante de hielo, se baja la velocidad del plato, se agrega la fécula, el resto del hielo y finalmente se agrega el ácido ascórbico en las últimas 3 vueltas. La temperatura final de la pasta no debe pasar de 10 a 12°C.

- **Mezclado:** La pasta de carnes (emulsión) preparada en el cúter se lleva a la mezcladora al vacío. Se mezcla por el tiempo establecido y se hace vacío para eliminar las posibles burbujas de aire atrapadas en la pasta durante el picado. Se verifican tiempo de mezclado y temperatura de salida de la pasta.
- **Embutido:** Se lleva la pasta a la embutidora y se embute en el tipo establecido de tripa, cuyos calibres ya fueron controlados en el depósito, al certificar la compra de acuerdo a especificaciones. Las piezas deberán ser todas iguales, con un peso establecido.
- **Cocción:** Las piezas se cuelgan en carros, evitando que se toquen entre sí para que no queden manchadas luego de la cocción, y se introducen en el horno donde se aplican los tiempos, temperaturas y condiciones de humedad previamente establecidos para la cocción de cada pieza.
- **Enfriado y envasado:** Se puede hacer bajo aspersion o a temperatura ambiente, dependiendo del tipo de embutido que se está elaborando, después de esto se envasa cada pieza.
- **Almacenamiento y venta:** Finalmente se acondiciona en una cámara de frío, detallando a qué temperatura, durante cuánto tiempo mínimo y máximo, qué control de humedad tendrá esa cámara y qué velocidad del aire.

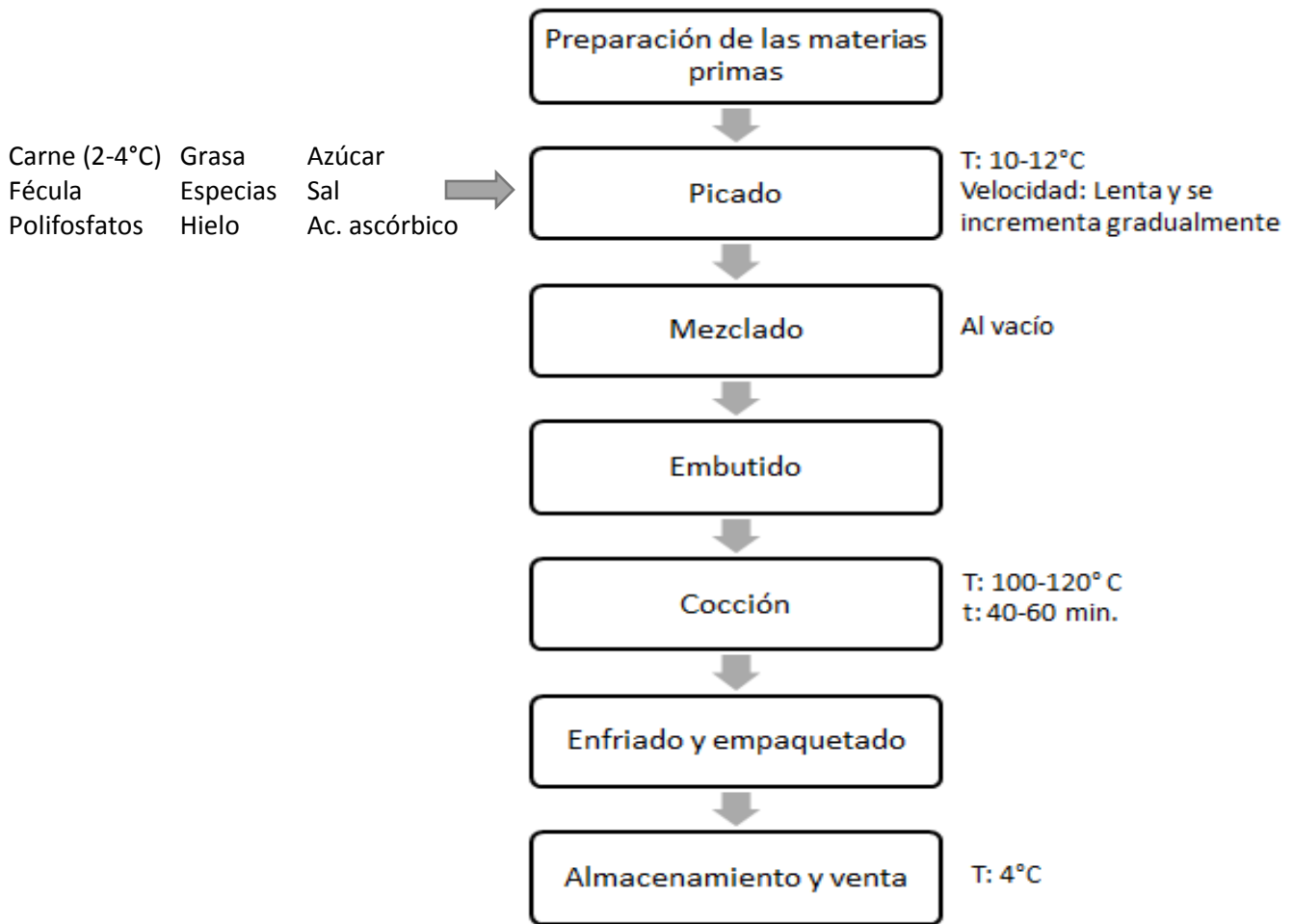


Figura 1 Diagrama de proceso para la elaboración de embutidos (Muller y Ardoíno, 2000)

### 1.2.2. Adulteraciones

La identificación clara de la especie de la cual provienen las materias primas con las que se elaboran los alimentos es muy importante y existen al menos cuatro razones para su justificación (Aranguren *et al.*, 2009):

- Evitar el fraude económico por sustitución o adulteración del producto (ejemplo carne de perro (*Canis familiaris*) o gato (*Felis catus*) por carne de bovino (*Bos taurus-indicus*), en especial en alimentos ofrecidos en expendios sin el control sanitario correspondiente, tal es el caso del uso de leche bovina en la producción de quesos cuya fórmula original requiere leche de otras especie bien sea de búfala (*Bubalus bubalus*) (mozzarella) o cabra (*Capra hircus*) u oveja (*Ovis aries*).

- Requerimientos especiales, relacionados con aspectos de salud o de orden sanitario, tales como problemas de alergias alimentarias en individuos susceptibles o que reaccionan ante ciertas proteínas de origen animal; así como aquellos individuos que no toleran la ingesta de ciertos componentes de la leche, tales como la lactosa (caso de infantes).
- Por razones culturales, tal es el caso de creencias religiosas en las cuales se prohíbe comer carne de cerdo y/o res.
- Por razones legales ya que la ley federal de protección al consumidor regula la expedición de normas aplicables a productos cárnicos en donde se establece que se deben expresar en la etiqueta de los productos los elementos, sustancias o ingredientes de los cuales están elaborados así como sus propiedades y características. En caso de incumplir estos rubros la empresa responsable puede hacerse acreedora a sanciones como multas, inmovilización y aseguramiento de productos y/o bienes, suspensión de la comercialización de sus productos y suspensión de la publicidad de los mismos independientemente de la pérdida de reputación y credibilidad por parte de los consumidores (LFPC, 2006). Las salchichas comercializadas en México son mayoritariamente de 3 tipos: Frankfurt, Viena y Cocktail, las cuales se definen de acuerdo a la NMX-F-065-1984 como productos alimenticios que son elaborados básicamente con no menos de 60% de carne de res y cerdo y/o mezcla de las mismas además de grasa de cerdo y emulsificadores, sometidos a curación pudiendo ser ahumados o no, sometidos a cocción y enfriamiento, empacados en material adecuado para su distribución y conservación en refrigeración, en las cuales solo están permitidos como ingredientes adicionales agua o hielo en cantidad suficiente, componentes de cereales, oleaginosas y leches o mezclas de los mismos que no excedan en conjunto el 10% del producto terminado, por lo cual, las salchichas que no cumplan con estos rubros dentro del territorio nacional se consideran productos adulterados.

Otro problema asociado con la adulteración de alimentos es la pérdida de buena reputación de algún producto con denominación de origen o regional (como las salchichas de pavo) elaborado honestamente, debido a que fue elaborado deshonestamente por un solo productor. (Mondragón y Ulloa, 2011).

El desarrollo de sistemas instrumentales más exactos y confiables, sumado al desarrollo en las técnicas estadísticas y computacionales, ha favorecido el desarrollo de metodologías analíticas innovadoras que presentan un alto grado de exactitud en la identificación de alimentos adulterados, como son la calorimetría diferencial de barrido, la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos de alta presión, la resonancia magnética nuclear, métodos basados en ADN y la espectroscopia de infrarrojo (Mondragón y Ulloa, 2011), siendo las más relevantes los métodos basados en análisis de ADN.

### **1.3. Técnicas moleculares para la identificación de adulteraciones**

La autenticación de especies en alimentos es una de las mayores áreas inmersas en la calidad y control de los alimentos. Se han implementado varias regulaciones tales como análisis fisicoquímicos, espectrofotométricos y basados en proteínas y ADN para asegurar que la información contenida en la etiqueta de los alimentos sea correcta y erradicar la adulteración de los alimentos. La identificación de especies se ha realizado tradicionalmente mediante la identificación de las características morfológicas o anatómicas de la especie a analizar, sin embargo, esta tarea resulta difícil cuando se analizan dos o más especies muy cercanas entre sí o cuando el producto ha sido sometido a un proceso específico (Gallardo *et al.*, 2013).

#### **1.3.1. Técnicas de autenticación de especies basadas en análisis proteico**

Las técnicas de autenticación de especies en productos cárnicos basadas en análisis proteico pueden aplicarse para detectar sustituciones de carne, grasa y proteínas (adulteraciones) y/o la identificación de aditivos, alérgenos o ingredientes no reportados (Ballin, 2010).

### **1.3.1.1. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

La prueba ELISA ha sido la técnica proteica más ampliamente usada, con propósitos regulatorios, para la autenticación de especies en alimentos debido a su alta especificidad, simplicidad y sensibilidad, con respecto a otros métodos. La reacción ELISA es una prueba inmunológica que involucra a una enzima (una proteína que cataliza una reacción bioquímica) para detectar la presencia de un antígeno o un anticuerpo en una muestra. Si el antígeno o anticuerpo es detectado se lleva a cabo una reacción visible, de lo contrario no habrá reacción alguna. Las dos variantes de la reacción ELISA utilizadas en alimentos son (Asensio *et al.*, 2008):

- **ELISA indirecto:** Utiliza dos anticuerpos, uno de los cuales es específico al antígeno a identificar y el otro se encuentra acoplado a la enzima. Este segundo anticuerpo le brinda el nombre a la técnica de “*Enzyme-Linked*” (Enzima Unida) y producirá un sustrato fluorogénico para producir una señal. En algunas ocasiones este segundo anticuerpo puede estar unido a proteínas como avidina o estaptavidina si el primer anticuerpo está bloqueado por biotina.
- **“Sándwich ELISA”:** El antígeno se encuentra entre dos anticuerpos: el anticuerpo de detección y el anticuerpo de captura. El anticuerpo de detección puede estar unido a una enzima que producirá una reacción bioquímica.

En los últimos años, los avances en la tecnología e investigación en ELISA han descubierto maneras más rápidas de llevar a cabo estos ensayos en la industria alimentaria y agrícola, como el desarrollo de *kits* para facilitar la ejecución del método (Asensio *et al.*, 2008).

### **1.3.2. Técnicas basadas en la secuenciación e identificación de ácidos nucleicos (ADN)**

Las técnicas de autenticación e identificación de especies por medio del análisis del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) tienen la ventaja de que el análisis puede hacerse solo con una pequeña muestra de ADN. Además, si se comparan las ventajas que presentan los análisis basados en proteínas con los análisis basados en ADN se observa que el ADN presenta una mayor estabilidad térmica, está presente en la mayoría de las células y provee la misma información no importando el tejido de origen (Ballin, Vogensen y Karlsson, 2009).

### **1.3.2.1. Generalidades del Acido Desoxirribonucleico (ADN)**

Como depositario de la información genética, el ADN ocupa un lugar único y central entre las macromoléculas biológicas. Las secuencias de nucleótidos del ADN describen en ultimo termino la estructura primaria de todos los Ácidos Ribonucleicos (ARN) y proteínas celulares y mediante enzimas pueden afectar directamente la síntesis del resto de constituyentes celulares determinando el tamaño, forma y función de cualquier objeto viviente (Nelson y Cox, 2014).

### **1.3.2.2. Tipos de ADN, composición y estructura**

#### **1.3.2.2.1. ADN nuclear**

Es una molécula de doble cadena de nucleótidos, arreglados en forma antiparalela y complementaria, unidas entre sí por puentes de hidrógeno entre los nucleótidos: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). La adenina de una cadena se aparea siempre con la timina de la cadena complementaria mediante dos puentes de hidrógeno, y la guanina se aparea con la citosina mediante tres puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno ocurren entre un átomo de hidrógeno enlazado con un átomo electronegativo (O, C, N) y un segundo átomo electronegativo. Los puentes de hidrógeno tienen una energía de estabilización de 10-30 kJ/mol (Velazco, 2004).

Cada nucleótido está formado por una molécula de azúcar desoxirribosa (no posee O en el sitio 2', únicamente un H), una base orgánica nitrogenada (pirimidinas, como en el caso de la citosina y la timina, o purinas, como en el caso de la adenina y la guanina) y un grupo fosfato. Los nucleótidos se enlazan entre sí por enlaces covalentes fosfodiéster entre el grupo fosfato ubicado en el sitio 5' con el grupo OH ubicado en el sitio 3' del nucleótido anterior. El enlace covalente es una unión en la cual dos electrones son compartidos por dos átomos. En este tipo de enlace, cada electrón del par compartido es atraído por los núcleos involucrados en el enlace, lo cual hace que sea un enlace muy fuerte, que dependiendo del tipo de átomos involucrados puede tener una energía desde los 263 kJ/mol para un enlace C-P hasta 460 kJ/mol para un enlace O-H. Esto hace que la molécula de ADN sea particularmente estable en condiciones tanto intra como extracelulares. Los enlaces covalentes que unen a cada subunidad de nucleótido son químicamente estables y no son

susceptibles de experimentar ruptura hidrolítica en el medio acuoso de la célula. Esto establece una forma segura y duradera de almacenamiento de la información genética, que no debe alterarse ni dañarse de generación en generación (Velazco, 2004).

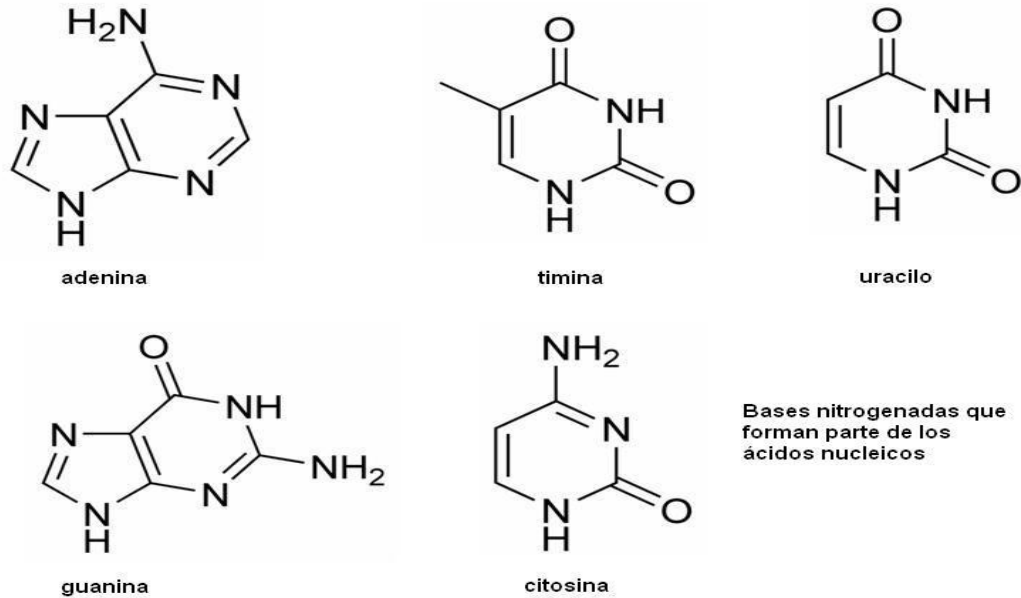


Figura 2 Estructura de cada base nitrogenada que compone al ADN nuclear (ArgenBio, 2014)

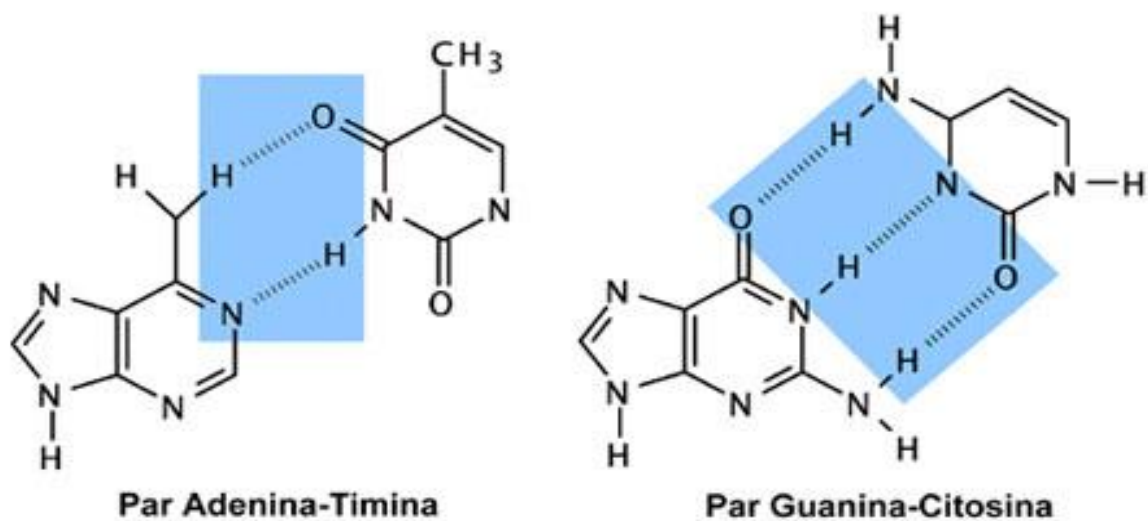


Figura 3 Puentes de hidrogeno formados por las bases nitrogenadas con la cadena antiparalela de ADN nuclear ([www.cultek.com](http://www.cultek.com), 2014).

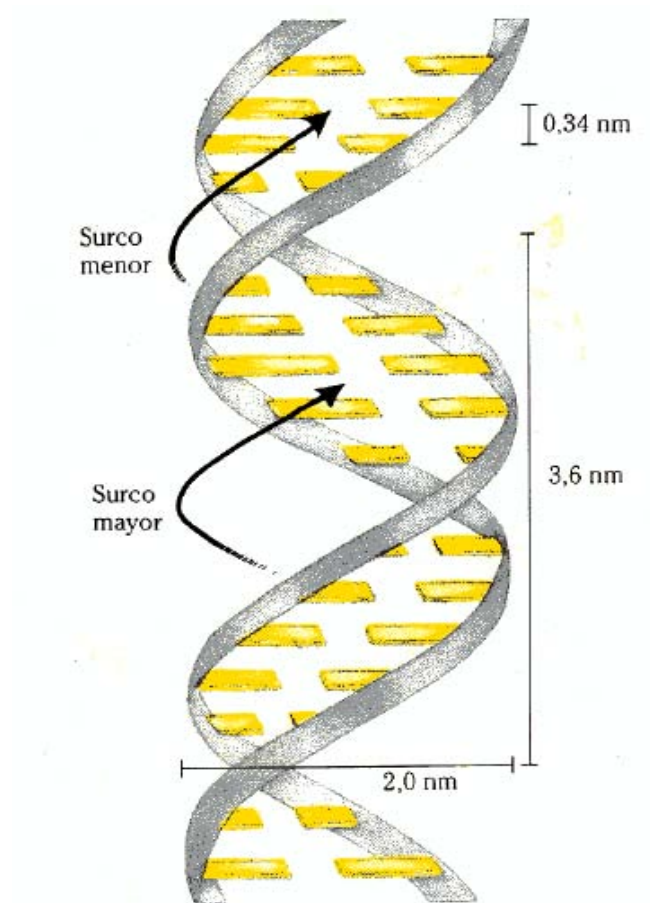


Figura 4 Estructura de doble hélice del ADN nuclear (Nelson y Cox, 2014).

#### 1.3.2.2.2. ADN mitocondrial

La mitocondria tiene una forma alargada con una doble membrana, una externa, permeable a los metabolitos, iones y polipéptidos y contiene proteínas que forman poros llamados “porinas”. La membrana interna, las crestas y la matriz hacen parte de su constitución interna. Posee su propio ADN mitocondrial (ADNmt), muy diferente del ADN del núcleo celular, puesto que no se rige como éste por las leyes Mendelianas, sino que se rige por sí mismo. El ADNmt es circular y tiene un tamaño de 16.569 pares de bases, con un pequeño número de genes distribuidos entre las cadenas H y L, en total son 37 genes de los cuales 22 son utilizados por el ARN de transferencia (tARN) y 2 por el ARN ribosomal (rARN), quedando tan solo 13 genes que serían para la producción de proteínas (Segura, 2004). La distribución y descripción de los genes es la siguiente (Roman, 2012):



- Genes que codifican las 2 subunidades 12S y 16S del rARN de la matriz mitocondrial.
- Los genes para los 22 tARN, requeridos para la síntesis de proteínas mitocondriales en la misma matriz mitocondrial.
- Genes que codifican 13 polipéptidos que forman parte de los complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS (fosforilación oxidativa). En concreto, en el genoma mitocondrial se codifican 7 subunidades del Complejo I, 1 subunidad del Complejo III, 3 subunidades del Complejo IV, y 2 subunidades de la ATPasa (Complejo V).

La zona del ADNmt conocida como D-LOOP (lazo D), aloja el origen de la replicación de la cadena H y el origen de la transcripción de la cadena L, además de una secuencia codificadora de ARN 7S (Segura, 2004).

El ADN mitocondrial ha sido utilizado ampliamente como un marcador de especies, en particular la región 12S ARNr, dado que cumple una serie de requisitos para identificación. Esta región posee una longitud aceptable, suficiente diferenciación entre especie congénicas o próximas, además que acumula puntos de mutación interesantes que originan cambios puntuales capaces de diferenciar géneros o especies, ideal para este tipo de estudios (Aranguren *et al.*, 2009).

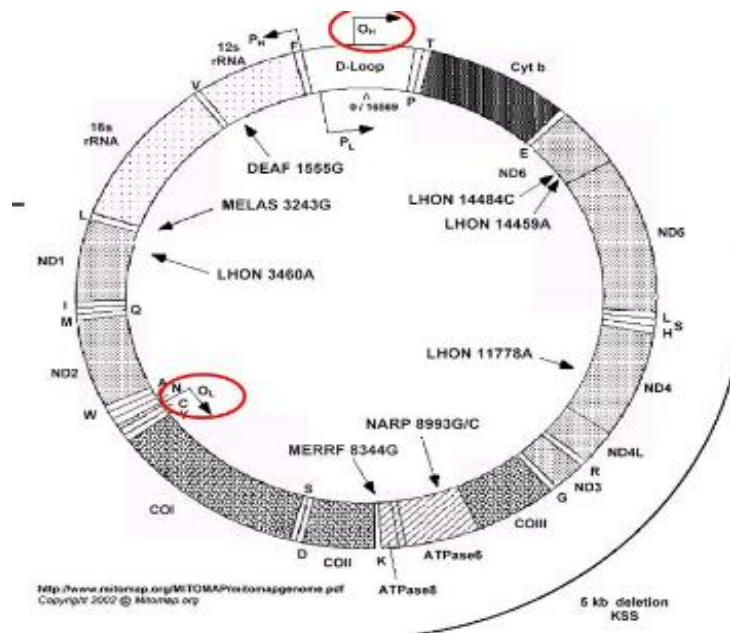


Figura 5 Estructura del ADN mitocondrial (Roman, 2012).

### **1.3.3. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El origen de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) como la conocemos ahora, se remonta a las investigaciones realizadas en los años 80's en la Corporación Cetus en California. En el otoño de 1983, Kary Mullis tuvo la idea original de la PCR, esta idea fue la precursora de la técnica moderna de PCR usada mundialmente hoy en día y que fue objeto de ser patentada. La idea de Kary Mullis tuvo tanto éxito que le otorgo un bono de US\$10,000 de la Corporación Cetus y el Premio Nobel de química en 1993 (Bartlett y Stirling, 2003).

#### **1.3.3.1.Fundamentos**

La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. En procariontes se han encontrado al menos 12 proteínas involucradas en la replicación. Estas proteínas actúan en diferentes actividades, como (Cornejo *et al.*, 2014):

- La identificación del sitio de origen de la replicación.
- El desenrollamiento de la doble hélice.
- La estabilización de la estructura desenrollada.
- La generación de cadenas iniciadoras complementarias con un extremo 3' libre que sirve de iniciador para que la ADN polimerasa comience su actividad catalizadora.
- El avance de la bifurcación replicadora por desenrollamiento.
- Los pasos finales del ensamblaje de dos cadenas complementarias.
- La identificación de los sitios de terminación.
- El superenrollamiento de las dos nuevas moléculas de ADN.

Sin embargo, la enzima más importante en la replicación es la polimerasa del ADN dependiente de ADN, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (Cornejo *et al.*, 2014).

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores o cebadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el

extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) u otro cofactor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis, esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular (Cornejo *et al.*, 2014).

### 1.3.3.2. Metodología general

Lo mejor es tratar de empezar con las mismas condiciones que se hayan reportado para el oligonucleótido que se está utilizando. Cuando se trata de oligonucleótidos diseñados en el laboratorio (o que no están reportados) se puede empezar a montar la técnica en condiciones estándares, y dependiendo del resultado, se hacen o no modificaciones. Se recomienda buscar artículos que han trabajado con sistemas parecidos, ya sea el organismo, el gen o el tipo de ADN que se desea trabajar, y empezar con las temperaturas que se reportan. Para tener una idea de la temperatura de alineamiento que podría ser la mejor para los oligonucleótidos se puede calcular la *T<sub>m</sub>* de cada oligonucleótido que se utilice. *T<sub>m</sub>* significa en inglés “*melting temperature*” y se refiere a la temperatura a la que se hibridan o se unen los oligonucleótidos en los sitios que son complementarios. Este proceso dependerá principalmente del tipo de uniones (dobles o triples enlaces de hidrógeno) que formarán sus bases, y por eso la secuencia de cada oligonucleótido es la que se toma en cuenta para conocer cuál es la temperatura óptima para su alineamiento. Existen muchas maneras de calcularla, por ejemplo una sencilla es (Espinosa, 2007):

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

Conocer la *T<sub>m</sub>* puede darnos una idea, pero no siempre es la temperatura que se utiliza en el termociclador, ya que también los iones y otras sustancias que haya en la reacción pueden influir en la forma en que se unen los oligonucleótidos. Casi todos los ensayos de PCR funcionan bien con 30 ciclos, aunque pueden usarse desde 20 ciclos hasta 35. La metodología general descrita aparece en la figura 6.

La electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida se usa para separar, identificar y purificar los fragmentos de ADN resultantes de la PCR. Esta técnica es simple, rápida y capaz de separar los fragmentos de ADN que no podrían ser separados por otras técnicas

como la centrifugación con gradiente de densidad. La localización del ADN en el gel puede ser identificada si se tiñe el gel con bromuro de etidio y se lee bajo luz ultravioleta, de esta manera también pueden identificarse posibles contaminaciones. Los geles de agarosa y poliacrilamida pueden utilizarse en diferentes combinaciones y condiciones, la decisión radica básicamente en el tamaño del amplificado. Los geles de poliacrilamida son efectivos para separar fragmentos pequeños de ADN (5-500 pb) o fragmentos que tienen un número de pares de bases muy cercano. Los geles de agarosa tienen menos poder de resolución pero tienen un mayor intervalo de separación, pueden separar fragmentos que van desde 50 pb hasta varias megabases de longitud, generalmente se corren en configuración horizontal (Sambrook, 2001).

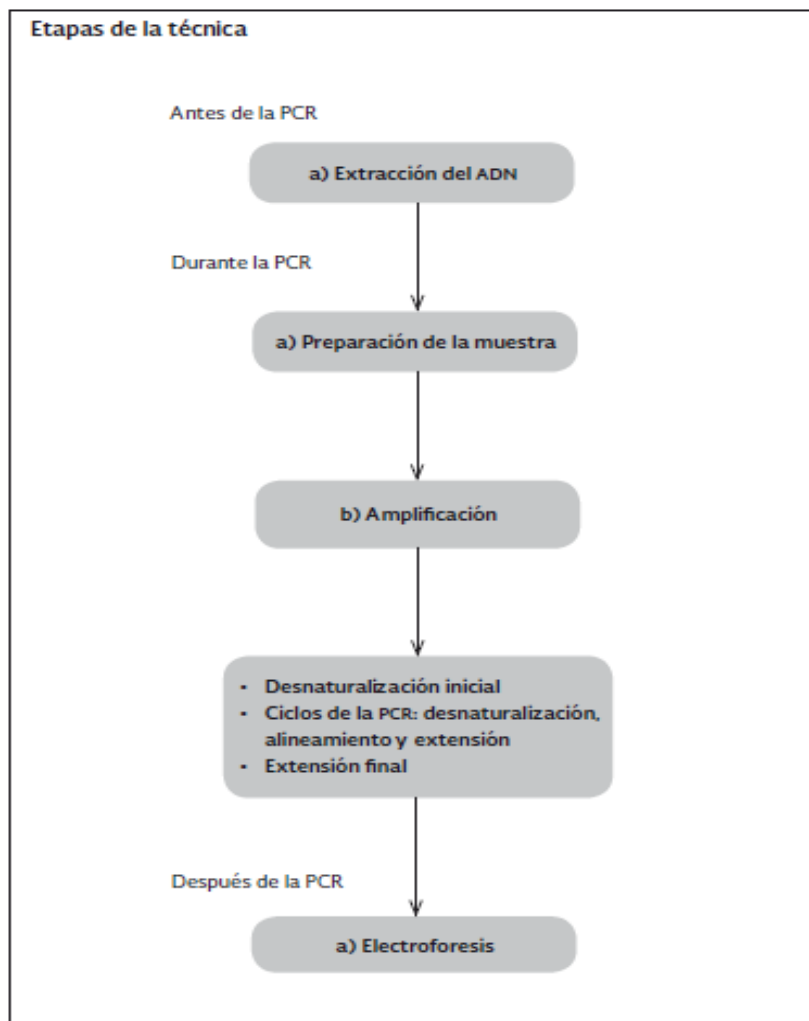


Figura 6 Diagrama de las etapas de la PCR (Cornejo *et al.*, 2014)

### 1.3.3.3.Etapas de la PCR

En la actualidad, para llevar a cabo la PCR, únicamente se necesita mezclar en microtubos el ADN molde, la ADN polimerasa; los desoxirribonucleótidos adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y timina (dTTP); una solución amortiguadora; un cofactor de la polimerasa (regularmente se usa magnesio) y los iniciadores o cebadores. La reacción se efectúa en equipos conocidos como termocicladores que se programan para que produzcan los ciclos de temperatura a los que se realiza la amplificación (Espinosa, 2007).

Dentro del termociclador se dan las siguientes reacciones (véase figura 7) que conforman las etapas de la PCR (Cornejo *et al.*, 2014):

- **Desnaturalización:** En esta etapa es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C durante 30 segundos a 1 minuto. Si el ADN tiene un alto contenido de guaninas y citosinas, se recomienda aumentar el tiempo o la temperatura. La actividad de la enzima decrece muy rápido a partir de los 95°C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación.
- **Alineamiento:** Al disminuir la temperatura de incubación los iniciadores o cebadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. Ambos cebadores se unen de manera específica al ADN flanqueando el fragmento que se quiere amplificar. En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los iniciadores: la concentración, el número de bases y el porcentaje de guaninas-citosinas. En la práctica, la temperatura de alineamiento oscila entre 45 y 65°C durante un tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad porque disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con la hebra molde.
- **Extensión:** Esta etapa, también conocida como elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del cebador por acción de la ADN polimerasa, empleando como sustrato los cuatro dNTPs. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72°C porque es la temperatura a la cual la Taq polimerasa (enzima más utilizada)

alcanza su mayor actividad. El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar, la Taq polimerasa añade de 500 a 1000 nucleótidos por minuto.

- **Extensión final:** Generalmente, al terminar los ciclos, se realiza una última extensión de aproximadamente 5 minutos a 72°C para permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.
- **Conservación:** Después de terminar los ciclos y la extensión final, el termociclador disminuye su temperatura hasta 4°C para conservar las muestras de ADN recién sintetizadas.

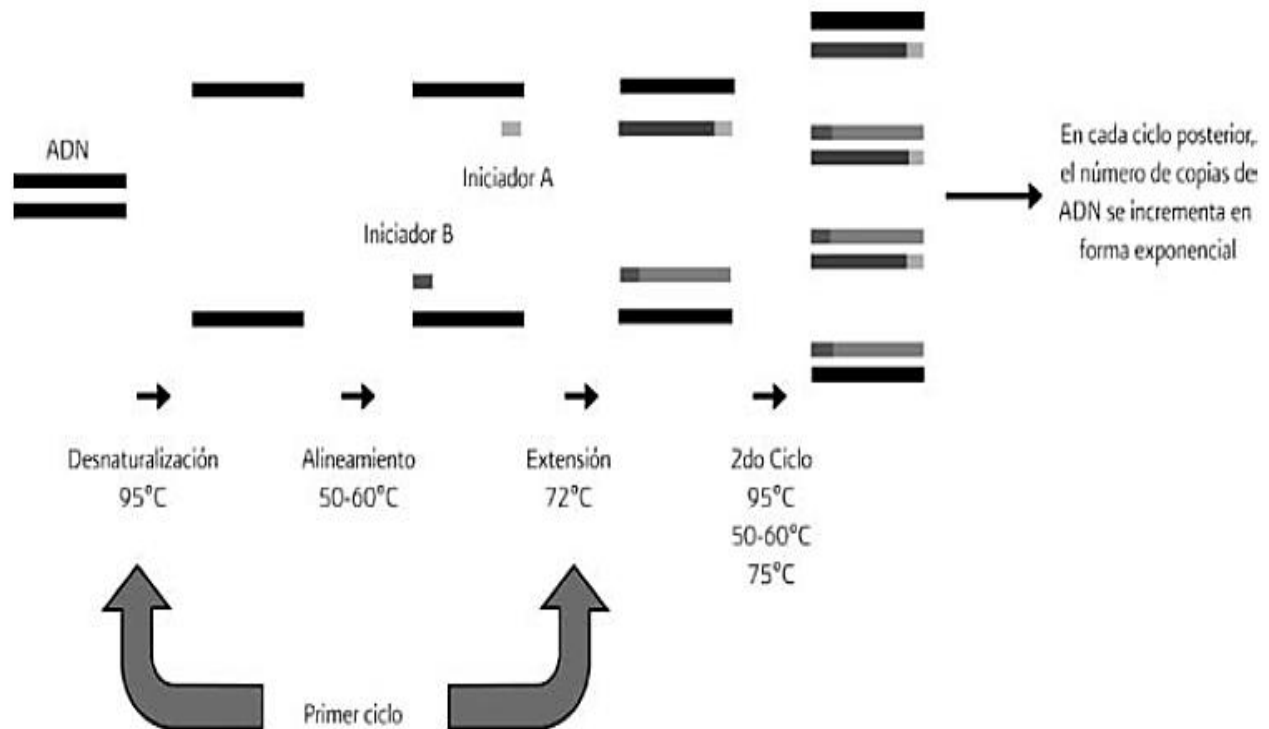


Figura 7 Esquema de las diferentes etapas de la PCR (Cornejo *et al.*, 2014)

#### 1.3.3.4. Ventajas y desventajas de la PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa tiene las siguientes ventajas (UNED, 2000):

- **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.
- **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.
- **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, en autenticación de alimentos se utiliza para analizar alimentos que por su proceso pueden presentar daños en el ADN de interés.

Las principales desventajas de la PCR son (UNED, 2000):

- **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. 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.

- **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.
- **Peligro de contaminación:** La facilidad con que se amplifica el ADN exige evitar el peligro de contaminación inherente al poder multiplicador de la reacción. 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.

#### 1.3.3.5. Aplicaciones de la PCR

A través del tiempo, la PCR ha ido adquiriendo cada vez más importancia en distintos campos científicos, sus aplicaciones más destacadas son (UNED, 2000):

1. **Construcción de bibliotecas de ADNc:** Una biblioteca de ADNc es el conjunto de clones obtenidos a partir de los ARNm de un tejido determinado de un organismo completo. El ADNc se sintetiza a partir de un mensajero y un cebador por acción de la transcriptasa inversa. Los clones de ADNc tienen una utilidad especial, ya que al proceder de los mensajeros correspondientes, carecen de intrones. Si lo que se pretende es expresar un gen eucariota en un sistema procariótico, se deberá clonar a partir de su ADNc y no de su secuencia genómica. La mayoría de los genes eucarióticos clonados han sido aislados a partir de bibliotecas de ADNc. La elaboración de una biblioteca de ADNc implica el aislamiento de la población total de mensajeros celulares y su transcripción revertida a ADN.
2. **Investigaciones forenses:** La PCR resulta ser una herramienta muy poderosa para las aplicaciones forenses ya que las muestras que se requieren para los análisis son minúsculas. Cada vez con mayor frecuencia se caracterizan muestras forenses a nivel de ADN con el fin de inculpar o exculpar a un sospechoso. Cualquier resto



biológico - sangre, saliva, orina, pelos, piel, huesos - puede servir para el análisis. De 2µl de sangre, 20 de saliva, o de un pelo arrancado de raíz, se puede extraer suficiente ADN (50 nanogramos) para amplificarlo por PCR y caracterizarlo. Inclusive muestras de ADN degradado, con sólo algunas secuencias maltrechas de nucleótidos, pueden ser amplificadas por PCR.

3. **Diagnóstico médico:** La PCR ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas en numerosos campos de la medicina. La manera clásica de diagnosticar enfermedades infecciosas causadas por virus, consiste en detectar los anticuerpos que el paciente produce contra el virus. Si hay anticuerpos circulantes se sabe que hay o hubo infección, pero no se puede distinguir entre las dos posibilidades. En cambio, la detección directa del genoma del patógeno mediante PCR permite saber con certeza si hay o no infección en el momento del análisis.
4. **Autenticación de especies en alimentos:** Como se mencionó anteriormente, existe un gran problema en cuanto al etiquetado y declaración de ingredientes en los productos alimenticios y esto afecta a la población en diferentes maneras. Muchas empresas productoras han engañado a los consumidores utilizando o sustituyendo en la fabricación de sus productos ingredientes no declarados en sus etiquetas para obtener mayores ganancias. Esto impacta de manera negativa tanto la salud y seguridad como la economía de los consumidores por lo cual se necesitan métodos para detectar dichas adulteraciones (Thitika *et al.*, 2014). La reacción en cadena de la polimerasa constituye una técnica alternativa a los métodos tradicionales de identificación de especies en alimentos, basados en el análisis de proteínas mediante técnicas electroforéticas o cromatográficas. La técnica de la PCR permite analizar muestras conservadas en condiciones deficientes o sometidas a tratamientos térmicos, incluso de esterilización, utilizando una mínima cantidad de muestra. El punto crítico del ensayo de PCR es la selección de un marcador genético apropiado y el diseño de cebadores que permitan su amplificación. En el diseño de cebadores, se pueden utilizar las secuencias génicas de diversas especies conocidas para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar cebadores universales, que permitan la amplificación de un mismo gen en una gran variedad de especies.

## **Justificación del proyecto**

Durante los últimos años, en México han aumentado los casos conocidos de adulteración en alimentos. La carne utilizada para elaborar hamburguesas y chorizo ha sido adulterada con carne de caballo, la cual es más barata. Además, al no estar regulado su consumo la carne de caballo puede ser producida en condiciones sanitarias no favorables poniendo en riesgo la salud de los consumidores (Mondragón y Ulloa, 2011). La carne picada también puede estar adulterada, por su popularidad y versatilidad, con proteínas de soya que no son reportadas en el etiquetado de los productos producidos con dicha carne como son empanadas, salami, albóndigas, salchichas, etc (Kamruzzaman *et al.*, 2014).

Los consumidores están conscientes de que el consumo de productos adulterados es riesgoso para la salud, por esto han exigido a la industria cárnica métodos rápidos, sensibles y exactos que permitan detectar dichas adulteraciones (Kamruzzaman *et al.*, 2014).

Para asegurar que el producto final (en este caso salchichas) realmente contenga las especies cárnicas reportadas en su etiqueta, en este trabajo se propone la utilización de la PCR como una técnica de autenticación de especies en salchichas comerciales ya que, como se mencionó anteriormente, ofrece una fidelidad de resultados superior a cualquier otro método de análisis molecular debido a que se trabaja con el ADN de cada especie a evaluar y este siempre será el mismo en cualquier tejido del organismo del cual sea extraído no importando si fue sometido a procesos industriales, lo que elimina la posibilidad de identificar una especie errónea. Al proceder de esta manera se puede asegurar que los consumidores están adquiriendo un producto que corresponde al etiquetado del mismo, que no correrán riesgos de salud al consumirlo, que no se involucra con sus creencias religiosas y que corresponde realmente al valor que están pagando por dicho producto.

## Capítulo 2. Metodología experimental

### 2.1. Cuadro metodológico

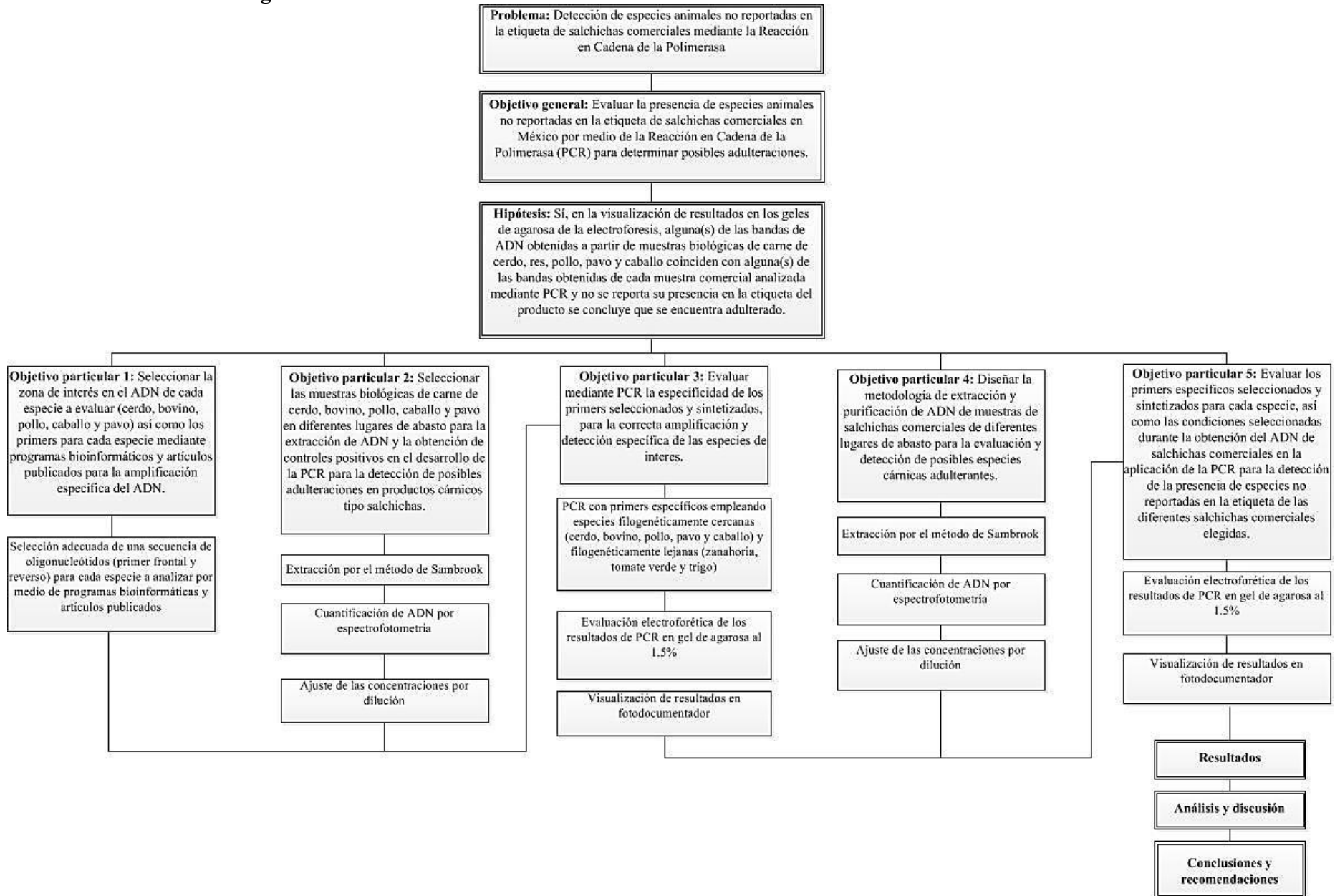


Figura 8 Cuadro metodológico

## 2.2. Material

### 2.2.1. Biológico

#### Muestras en fresco

Se obtuvieron 4 muestras de 100 g. de tejido de carne de cada una de las especies a evaluar de diferentes lugares de abasto popular (expendios) a excepción de la muestra para caballo la cual fue una muestra sanguínea provista por el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4. Cada muestra fue mantenida en congelación hasta el día de su uso.

#### Muestras procesadas

Se llevó a cabo un muestreo de 11 diferentes marcas comerciales de salchichas en diferentes tiendas comerciales. Se recolecto en promedio 1 salchicha por cada marca comercial a analizar y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta el día de su uso en el laboratorio.

### 2.2.2. Primers

El cuadro 7 describe las secuencias, gen y tamaño de los *primers* utilizados, estos se encuentran debidamente referenciados en los resultados del objetivo particular 1.

Cuadro 7 Secuencias de los diferentes *primers* utilizados.

Especie	Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplificado (pb)
<i>Primer</i> SIM	-----	Frontal: 5' GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA 3'	----
Pollo	Cyt b	Reverso: 5' AAG ATA CAG ATG AAG AAG AAT GAG GCG 3'	227
Caballo	Cyt b	Reverso: 5' CTC AGA TTC ACT CGA CGA GGG TAG TA 3'	439
Cerdo	ATPasa subunidad 8	Frontal: 5' GCC TAA ATC TCC CCT CAA 3' Reverso: 5' GAA AGA GGC AAA TAG ATT T 3'	210
Res	Calpaína	Frontal: 5' GTG ACT TTG TGC TGC GTT TCT 3' Reverso: 5' CCT TGC TGG CTA GAG ACC AA 3'	261
Pavo	Cyt b	Frontal: 5' CGG CTC CCT ACT AGC AGT ATG CC 3' Reverso: 5' CCT ACA AAG GCT GTT GCT ATG AGG 3'	290

## **2.3. Metodología**

### **2.3.1. Preparación de la muestra para la extracción de ADN**

Las muestras de tejido de carne de cada especie y la muestra sanguínea de caballo fueron conservadas en congelación hasta el día de su uso, asimismo las muestras de salchichas comerciales fueron conservadas en refrigeración. Se tomó 1 g de cada muestra y se trituró en un mortero hasta obtener trozos muy pequeños.

### **2.3.2. Extracción y purificación de ADN**

Se utilizó el método descrito por Sambrook, 2001. Este procedimiento se divide en 3 etapas:

#### **Lisis celular y rompimiento del tejido**

Se pesaron 0.125 g de cada muestra (tejido de carne o salchicha comercial según cada caso, para la muestra sanguínea se tomaron 50  $\mu$ L) y se trasladaron a un tubo eppendorf, posteriormente se adicionaron 1250  $\mu$ L de solución de lisis (Tris base 50 mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%) y se solubilizaron en un agitador Vortex Genie modelo K 55-G. Después se adicionaron 7  $\mu$ L de la enzima proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml y se colocaron en un calentador para tubos (Termoblok) marca Eppendorf a 50°C durante 2 horas para permitir la acción de la enzima. Una vez transcurrido este tiempo se elevó la temperatura del Termoblok a 60°C para inactivar la enzima.

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

Se adicionaron 250  $\mu$ L de mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló el tubo con suaves movimientos. Después se centrifugó la muestra en una microcentrífuga marca Eppendorf modelo Minispin Plus a 10,000 RPM durante 10 minutos, del producto obtenido se separó la fase acuosa que es la que contiene el ADN y se trasladó a dos tubos eppendorf nuevos.

#### **Precipitación y purificación del ADN**

Se adicionaron 1000  $\mu$ L de etanol frío a cada tubo y se mezclaron suavemente. Después de esto se volvieron a centrifugar los tubos a 10,000 RPM durante 10 minutos y al término se decantó el etanol con ayuda de una micropipeta, en esta etapa se pudo visualizar el ADN como un pellet blanco al fondo del tubo. Se dejó secar el ADN en el Termoblok a 37°C, se agregaron 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para solubilizarlo y resuspenderlo y se mantuvo en congelación para su posterior análisis.

Puede haber ocasiones en las que el ADN resulte contaminado ya sea con polisacáridos, proteínas o ARN (dependiendo la lectura obtenida en la cuantificación del ADN extraído) en cuyo caso se puede volver a realizar el procedimiento a partir de la extracción de proteínas y polisacáridos pero esto puede dañar al ADN por lo que se deja a consideración.

### 2.3.3. Cuantificación del ADN

El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro marca Accesolab modelo NanoDrop ND-1000 en donde se obtuvieron 2 parámetros importantes:

- **Relación 260/280:** Indica si el ADN se encontró puro o contaminado ya sea con proteínas o con ARN. La lectura que indica que el ADN se encontró puro es 1.8, si la lectura resulta por arriba de dicho valor significa que el ADN fue contaminado con ARN y si la lectura resulta por debajo de dicho valor significa que el ADN fue contaminado con proteínas.

- **Cantidad de ADN en la muestra en ng/μL**

Para la cuantificación de ADN se realizó la medición a una longitud de onda de 260 y 280 nm, para esto se colocaron 2 μL de agua libre de nucleasas para calibrar el equipo y dentro del software del espectrofotómetro se pulso la tecla “OK”. Una vez terminada la calibración se limpió el sensor del espectrofotómetro, se colocaron nuevamente 2 μL de agua libre de nucleasas para realizar la medición del blanco y se pulso en el botón “Blank” del software. Se siguió el mismo procedimiento para llevar a cabo la medición de la muestra solo que esta vez se pulso el botón “Measure” del software y se registraron los parámetros anteriormente descritos.

### 2.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se realizó con la ayuda de un Kit para PCR marca Promega, en este se incluyen:

- Agua libre de nucleasas
- Solución Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 μM de cada dNTP y 3 mM de MgCl<sub>2</sub>)

Se mezclaron en un solo tubo el Master Mix marca Promega incluido en el kit, los *primers* frontal y reverso de acuerdo a la especie a evaluar y agua libre de nucleasas en las proporciones mostradas en la tabla 8. El volumen final fue de 12.5 μL y correspondió al tubo marcado como blanco. En base a estas cantidades se realizó el cálculo para las muestras analizadas.

Cuadro 8 Proporción de reactivos para cada tubo de PCR

Reactivo	Cantidad
Master mix	6.25 $\mu$ L
<i>Primer</i> frontal	0.25 $\mu$ L
<i>Primer</i> reverso	0.25 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	5 $\mu$ L

Una vez efectuado el calculo y realizado la mezcla de reactivos se dividió la mezcla entre el número total de tubos y a cada uno se le adicionaron 0.75  $\mu$ L de ADN de la especie a evaluar (a excepción del blanco en el cual se adiciono 0.75  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para completar el volumen). Posteriormente se introdujeron los tubos en un termociclador marca Apollo modelo ATC401 CLP en el cual se programaron los ciclos y condiciones para llevar a cabo la PCR y una vez terminada la prueba las muestras se conservaron en congelación para su posterior análisis en electroforesis.

### Etapas y ciclos de la reacción

Para la identificación de la presencia de carne de pollo y caballo se utilizaron las condiciones reportadas por Matsunaga *et al.*, 1998, las cuales corresponden a las siguientes:

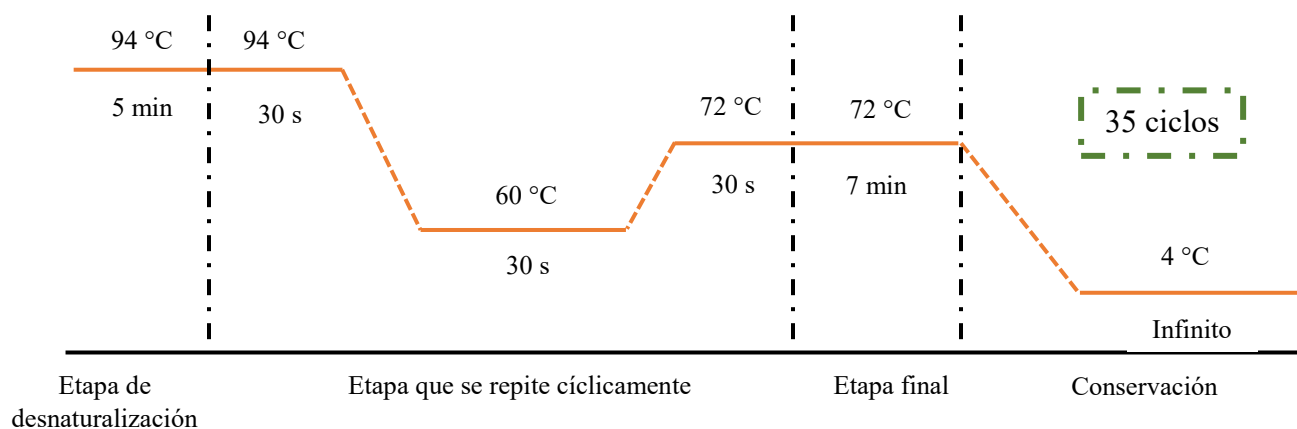


Figura 9 Programa de PCR para la identificación de la presencia de carne de pollo y caballo

Para la identificación de la presencia de carne de cerdo se creó un programa de PCR basándose en las recomendaciones del fabricante del Master Mix y en la temperatura de hibridación de los *primers* que es de 52°C en promedio. Las condiciones son las siguientes:

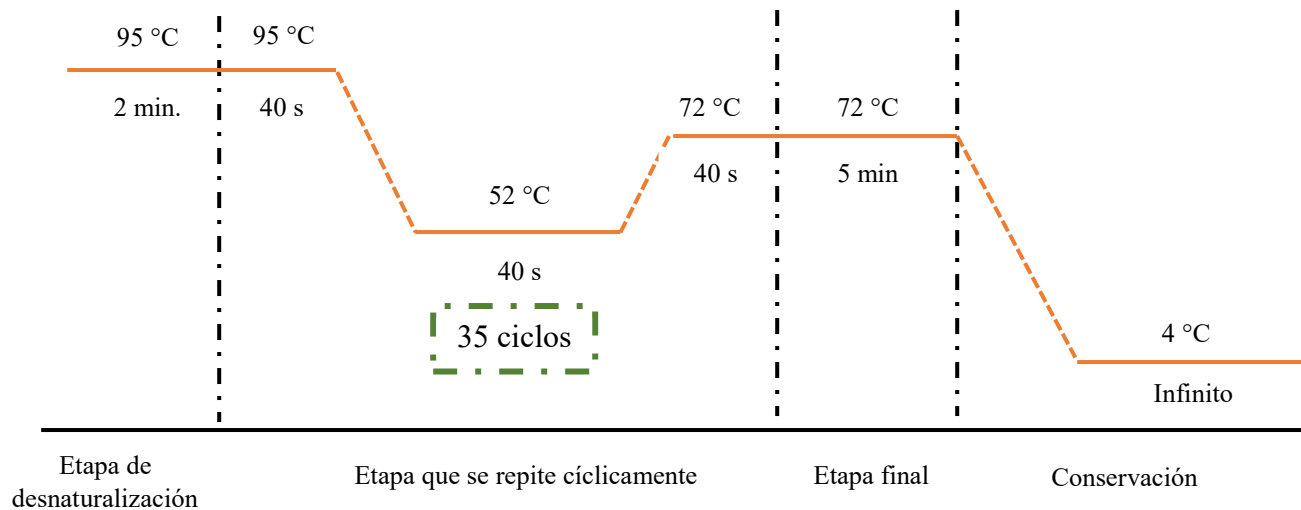


Figura 10 Programa de PCR para la identificación de la presencia de carne de cerdo

Para la identificación de la presencia de carne de pavo se utilizaron las condiciones descritas por Hernández *et al.*, 2011 las cuales corresponden a las siguientes:

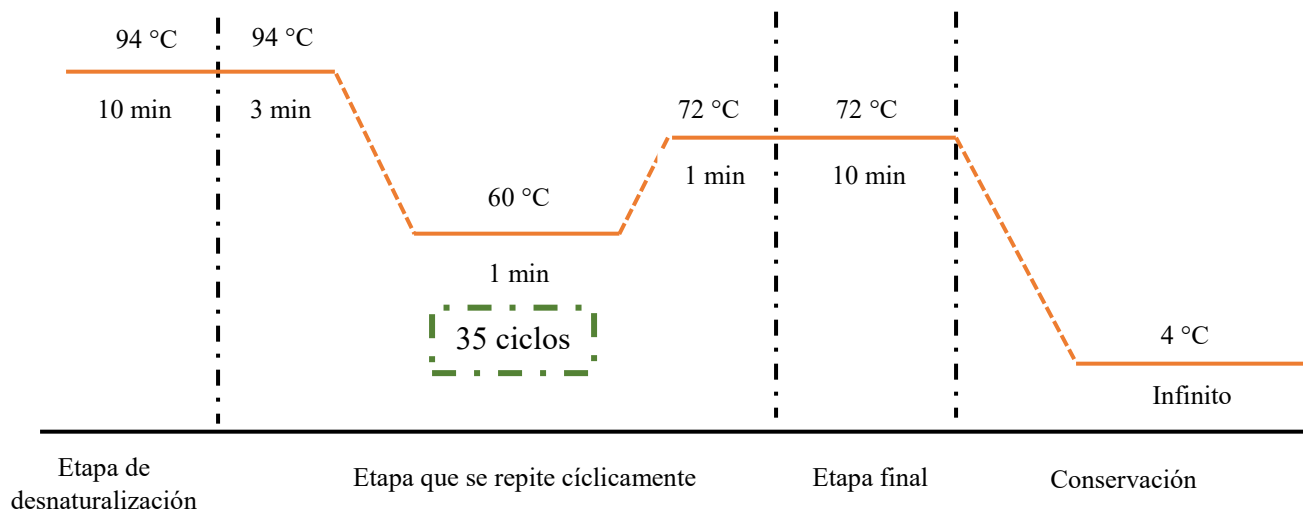


Figura 11 Programa de PCR para la identificación de la presencia de carne de pavo



Finalmente, para la identificación de la presencia de carne de res se utilizaron las recomendaciones descritas por Casas *et al*, las cuales corresponden a las siguientes:

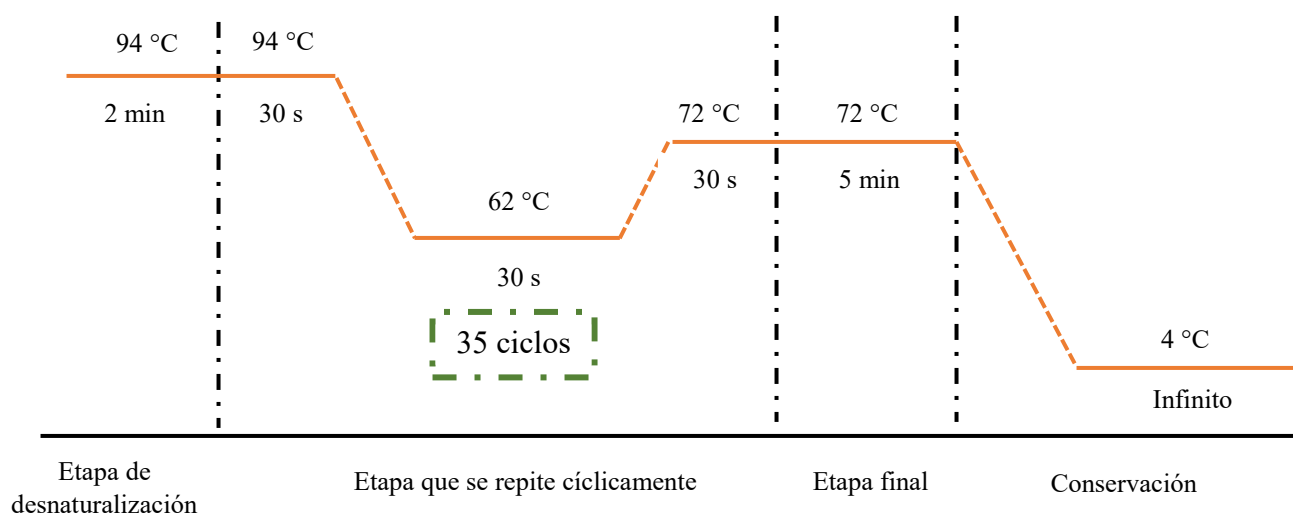


Figura 12 Programa de PCR para la identificación de la presencia de carne de res

### 2.3.5. Electroforesis en gel de agarosa

Para llevar a cabo la electroforesis se colocaron 50 ml de amortiguador TRIS acetato y EDTA (TAE) 50X en un matraz Erlenmeyer que ya contenía la Agarosa marca Gibco ERL pesada para realizar un gel al 1.5%. Después de esto se aumentó la temperatura de la mezcla en un microondas para lograr su solubilización y, una vez fría la solución, se le adicionó una gota de bromuro de etidio (BrEt) a una concentración de 10 mg/ml, se solubilizó con movimientos suaves y se dejó enfriar sin llegar a solidificar. Posteriormente se transfirió a un cassette de electroforesis que se colocó en una cámara de electroforesis marca Apollo modelo 75.710, se le colocaron los peines que forman los pozos donde se deposita la muestra y se dejó solidificar. Una vez solidificado el gel se retiraron los peines y se vertió solución TAE 1X como solución buffer, se prepararon las muestras para ser cargadas en el gel mezclando 3  $\mu$ L de BrEt, 3  $\mu$ L de tinte cargador azul/naranja 6X marca Promega y 5  $\mu$ L de muestra de ADN proveniente de PCR sobre una lámina de Parafilm y se introdujeron en cada uno de los pozos del gel con ayuda de una micropipeta. Finalmente se encendió la fuente de poder marca Bio-Rad modelo PowerPac 200 conectada a la cámara de electroforesis a 70 V y se dejó correr hasta que el tinte azul/naranja recorriera  $\frac{3}{4}$  del gel

y, una vez terminada la prueba, se visualizaron los resultados en un fotodocumentador de luz UV marca Claver Scientific LTD

Nota: Para cargar el marcador de peso molecular marca Promega necesario para conocer el número de pares de bases de cada amplificado solo se tomaron 2  $\mu$ L del mismo, los demás reactivos permanecieron en las mismas proporciones.

### Capítulo 3. Análisis y discusión de resultados

#### 3.1. Objetivo particular 1

*Seleccionar la zona de interés en el ADN de cada especie a evaluar (cerdo, bovino, pollo, caballo y pavo) así como los primers para cada especie mediante programas bioinformáticos y artículos publicados para la amplificación específica del ADN.*

*Primers para la identificación de carne de pollo y caballo*

Para seleccionar la zona de amplificación de pollo y caballo, se refirió a un trabajo publicado con anterioridad por Matsunaga *et al.*, 1998 en donde se reportan los *primers* utilizados para detectar la presencia de carne de pollo y caballo así como un *primer* frontal universal (SIM). Los *primers* reversos fueron diseñados en base a las secuencias del citocromo b publicadas en el GenBank. También se utilizaron las condiciones para realizar la PCR y el número de ciclos a trabajar.



Meat Science 51 (1999) 143–148



#### A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay

T. Matsunaga<sup>a</sup>, K. Chikuni<sup>b\*</sup>, R. Tanabe<sup>b</sup>, S. Muroya<sup>b</sup>, K. Shibata<sup>a</sup>, J. Yamada<sup>a</sup>, Y. Shinmura<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Japan Meat Processors Association, Ebisu 1-5-6 Shibuya-ku, Tokyo 150, Japan

<sup>b</sup>National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norindanchi, PO Box 5, Ibaraki 305, Japan

Received 28 August 1997; received in revised form 30 June 1998; accepted 2 July 1998

Figura 13 Portada del artículo publicado por Matsunaga (Matsunaga *et al.*, 1998)

La secuencia de los *primers* diseñados en el artículo es la siguiente, en rojo se marcan el *primer* SIM y las secuencias complementarias de los *primers* para la identificación de la presencia de carne de pollo y caballo:

```

SIM GACCTCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA 120
G ..... A C ..... A ..... CTTTGGATCCCTCTAGGAATTTGCCTAATCTTACAAATCCTGACAGGCCTATTCTAGCAATACACTATACATCCGACACA
C ..... C ..... C ..... TG ..... TTTTCGGCTCCCTATTAGCAGTCTGCCTCATGACCCAAATCCTCACCAGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACACA
B ..... T ..... C ..... T ..... A ..... TTTTCGGTTCCTCCTGGGAATCTGCCTAATCTTACAAATCCTCACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACATCCGACACA
S ..... T ..... ..... T ..... T ..... A ..... CTTTGGCTCTCTCCTAGGCATTTGCTTAATTTTACAGATTCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTATACACTGACACA
P ..... C ..... C ..... ..... A ..... CTTTCGGTTCCTCCTAGGCATCTGCCTAATCTTGCCTAATCTTACAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA
H ..... A ..... C ..... C ..... T ..... A ..... CTTTCGGCTCCCTCCTAGGAATCTGCCTAATCTTCAAATCTTAAACAGGCCTATTCTAGCCATACACTACACATCAGACACC
                                                                                                                                           240
G ATAACAGCATTTCCTCTGTAACACATTTGTCGAGATGTA AATTATGGCTGAATCATCCGATACATACACGCAAACGGG A A A A T CC A CATACATATCGGA
C TCCCTAGCCTTCT ..... C ..... C ..... C ..... G A ACGTACAATACGGCTGACTCATCCGGAATCTCCACGCAAACG CGCCCTCATTCTTCTCATCTGTATCTT CTTACATATCGGA
B ACAACAGCATTCT ..... T ..... C ..... T ..... C ..... ACGTAACTACGGCTGAATCATCCGATACATACACGCAAACGGG T A A T T T C T A ATATGCACGTAGGA
S ACAACAGCATTCT ..... C ..... C ..... C ..... ACGTAACTATGGCTGAATTAATCCGATATATACACGCAAACGGG A A A T T T C C A TATGCATGTAGGA
P ACAACAGCTTTCT A A T A ..... ACGTAAATTACGGATGAGTTATTCGCTATCTACATGCAAACGGG A A C A A T T T C C A CATCCACGTAGGC
H ACAACTGCCTTCT A A C C ..... C ..... C ..... ACGTAACTACGGATGAATTATTCGCTACTCCATGCCAACGGG A A A A T T T C C CATTACGTAGGA
                                                                                                                                           360
G CGAGGTC ..... T A A T C ..... AAACATGAAACATTGGAGTAATCCTCCTGCTC ..... G ..... GCTATGTTTACCATGAGGACAAATATCA
C CGAGG C ..... C ..... C ..... CTC ACAAG AAACCTGAAACACAGGAGTAATCCTCCTCCTCA ACTC ..... C C TG C GCTATGTTCTCCCATGGGCCAAATATCA
B CGAGGCTTATATTACGGGCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATCCTTCTGCTCA AGT ..... T ..... GATACGCTCCTACCATGAGGACAAATATCA
S CGAGG C ..... C T A A T C ..... AAACATGAAACATCGGAGTAATCCTCCTATTTCGACAAATAGCCACAGCATTTCATAGGCTATGCTTACCATGAGGACAAATATCA
P CGAGGTC ..... C ..... A C T A C ..... AAACATGAAACATTGGAGTAGTCTACTATT A CGTT ..... A ..... G ..... GCTACGCTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA
H CGCGG C C C ..... C ..... A C ..... AGACATGAAACATTGGAATCATCTACTTTTCA AGTT ..... T ..... G ..... GCTATGCTCCTACCATGAGGCCAAATATCC
                                                                                                                                           439
G TTTTGAGGGGC A A ..... T ..... T ..... T ..... AATCCCATATATTGG C A A A ..... A .....
C TTCTGAGGGGC C C T ..... C ..... T C ..... AATCCCTACATTGGACAC ..... A A ..... GC .....
B TTCTGAGGAGC A A ..... C ..... C ..... CT ..... AATCCCATACATCGC C A ATT A ..... A .....
S TTCTGAGGAGC A A T T C C C T ..... AATCCCATATATTGG C A A A ..... A ..... G .....
P TTCTGAGGAGC TACGGTCATCACAAATCTACTATCAGG TATCCCTTATATCGG A AGA ..... A A .....
H TTTTGAGGAGC A A ..... G C C ..... AATCCCTACATCG TACTACCCTCGTCGAGTGAATCTGAG

```

Figura 14 Secuencia de los *primers* utilizados. SIM: *primer* frontal universal; C: Pollo y H: Caballo (Matsunaga et al., 1998).

Como puede observarse, el *primer* universal (SIM) tiene, en su extremo 5' una secuencia parecida a las secuencias complementarias de las especies a estudiar. Esto indica que va a hibridar con cada una de las especies por separado aunque no en su totalidad, sino en ciertas regiones donde por complementariedad de bases pueda unirse satisfactoriamente, esto es lo que lo caracteriza como universal.

Debido a que las secuencias de cada especie son parecidas, los *primers* reversos fueron diseñados en sitios en donde la cadena comienza a diferenciarse de las demás en el orden de los nucleótidos. Esto garantiza que los *primers* reversos solo amplificaran para la especie para la cual fueron diseñados y no para otras especies.

#### *Primers para la identificación de carne de cerdo y pavo*

Para la selección de la zona de amplificación para la detección de estas especies se refirió a un trabajo publicado por Hernández *et al.*, 2011 en donde se reportan *primers* para ambas especies. El *primer* para la identificación de carne de cerdo fue diseñado en base a la región codificante para ATPasa subunidad 8 mientras que el *primer* para la identificación de carne de pavo fue diseñado en base al gen codificante del citocromo b, ambos contenidos en el ADN mitocondrial.

#### *Primers para la identificación de carne de res*

Los *primers* utilizados para la detección de carne de res fueron diseñados por Casas *et al.*, 2005, los cuales corresponden al gen codificante de la calpaína, marcador molecular C-530.

### **3.2.Objetivo particular 2**

*Seleccionar las muestras biológicas de carne de cerdo, bovino, pollo, caballo y pavo en diferentes lugares de abasto para la extracción de ADN y la obtención de controles positivos en el desarrollo de la PCR para la detección de posibles adulteraciones en productos cárnicos tipo salchichas.*

Las muestras de tejido de las diferentes especies mencionadas (a excepción del caballo y pavo) se obtuvieron en una tienda de autoservicio. El ADN de pavo se extrajo de una muestra de tejido obtenida en el taller de cárnicos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4 y el ADN de caballo se obtuvo a partir de la extracción en una muestra sanguínea provista por el laboratorio de biotecnología de la misma facultad. Cada muestra fue empacutada independientemente para su transporte y mantenida en congelación hasta

el día de la extracción de ADN. La extracción se realizó siguiendo el método propuesto por Sambrook, 2001 en el que se obtuvieron las siguientes concentraciones de ADN total sin diluir.

Cuadro 9 Resultados de la extracción de ADN de muestras biológicas.

<b>Muestra</b>	<b>Relación 260/280</b>	<b>ADN extraído en ng/μl</b>
Pollo 1.1	1.81	1,066.7
Pollo 1.2	1.88	994.2
Bovino 1.1	1.55	529.7
Bovino 1.2	1.60	483.2
Cerdo 1.1	1.88	650.9
Cerdo 1.2	1.98	588.4
Pavo 1.1	1.94	1,985.8
Pavo 1.2	1.89	2,406
Caballo 1.1	1.5	90
Caballo 1.2	1.44	53.9

En el cuadro 9 se puede observar que la relación 260/280 se encuentra entre 1.8 y 1.9 (a excepción de las muestras de caballo y bovino) lo que indica que el ADN extraído se encuentra relativamente libre de contaminación por proteínas o ARN y permitió llevar a cabo la PCR. En las muestras de caballo se obtuvo una cantidad de ADN muy baja y una relación 260/280 que indica contaminación por proteínas, en las muestras de bovino solo se presentó contaminación por proteínas. Esto se debe a que la muestra de sangre de caballo se mantuvo en almacenamiento mucho tiempo lo que degrado el ADN contenido, debido a esto, las proteínas se encuentran en mayor proporción en ambas muestras, aun así no representan un problema ya que las altas temperaturas experimentadas en el termociclador pueden desnaturalizarlas.

La cantidad de ADN obtenido en la extracción es muy elevada para llevar a cabo la PCR ya que de una pequeña cantidad de ADN se obtienen millones de copias, por lo que las muestras fueron diluidas, ajustando su concentración a 60 ng/μl. Los resultados de las diluciones son los siguientes:

Cuadro 10 Resultados obtenidos de las diluciones de ADN extraído de muestras biológicas.

Muestra	Relación 260/280	ADN extraído en ng/μl
Pollo 1.1	1.76	76.1
Bovino 1.2	1.57	71.6
Cerdo 1.1	1.83	69.4
Pavo 1.1	1.86	63.2

En el cuadro 10 se observa que la relación 260/280 permanece en valores de 1.7 a 1.8 (exceptuando bovino) lo que sigue indicando que el ADN se encuentra relativamente libre de contaminación por proteínas o ARN para realizar la PCR. A pesar de que la muestra de bovino resulto contaminada con proteínas (de acuerdo a la relación 260/280 obtenida) no representa un problema ya que estas se desnaturalizaran dentro del termociclador. De las 10 muestras extraídas sin diluir las que se usaran como controles positivos son: pollo 1.1, bovino 1.2, cerdo 1.1 y pavo 1.1 debido a que la cantidad de ADN presente es suficiente para llevar a cabo la PCR. No fue necesario diluir el ADN extraído de caballo ya que las cantidades obtenidas son bajas. El control positivo a utilizar será caballo 1.1.

### 3.3.Objetivo particular 3

*Evaluar mediante PCR la especificidad de los primers seleccionados y sintetizados, para la correcta amplificación y detección específica de las especies de interés.*

La especificidad de los distintos *primers* se probó mediante PCR en donde se mezcló cada *primer* seleccionado con distintas especies filogenéticamente cercanas (cerdo, res, pollo, pavo y caballo) y filogenéticamente lejanas (zanahoria, tomate verde y trigo). En esta prueba cada *primer* solo debe amplificar con la especie para la cual fue diseñado con lo que se concluirá si es o no específico para la especie para la cual se diseñó. Esta prueba se realizó para evitar errores en la detección de las especies de interés.

### *Prueba de especificidad del primer para la identificación de carne de res*

Esta prueba se realizó bajo las condiciones de PCR descritas en la figura 12. Los resultados fueron los siguientes:

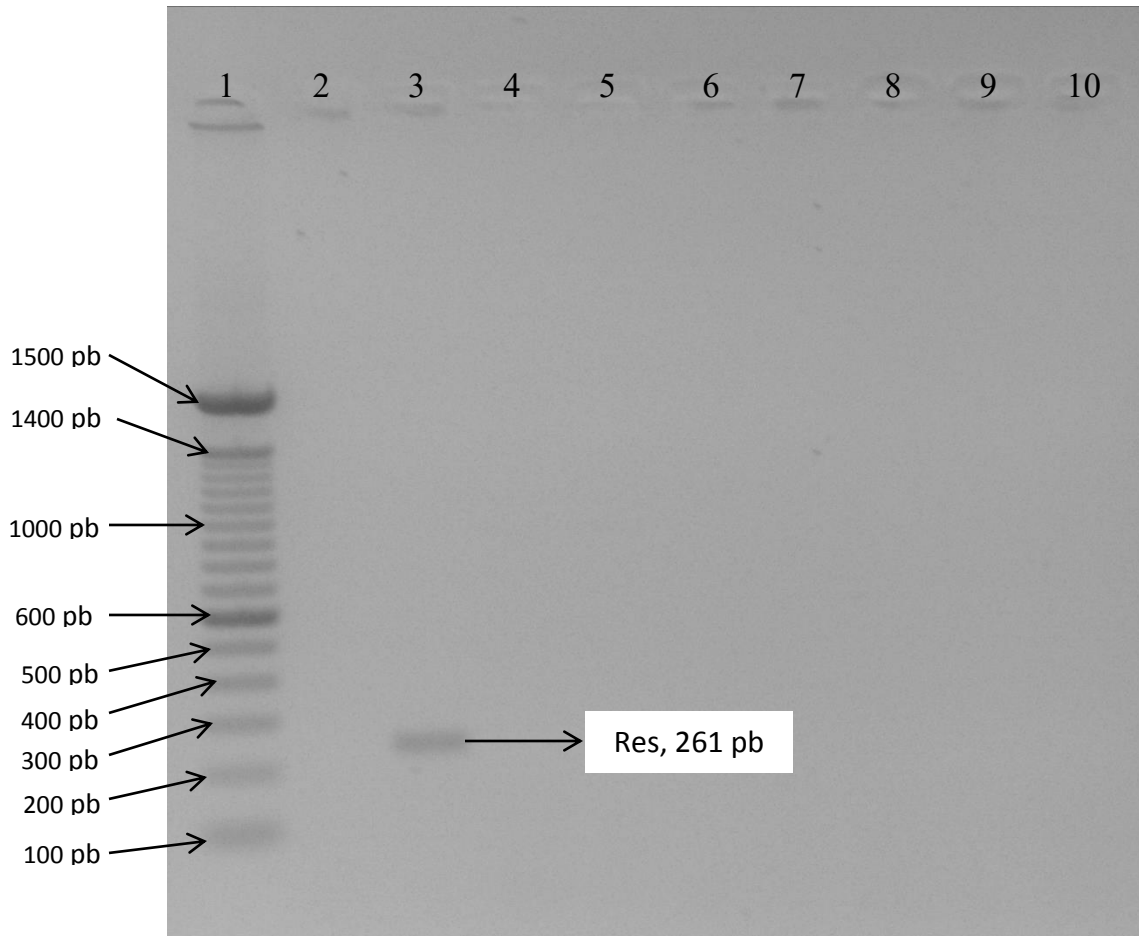


Figura 15 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del *primer* para la identificación de carne de res. 1) Marcador de peso molecular; 2) Blanco; 3) Res; 4) Pollo; 5) Cerdo; 6) Caballo; 7) Pavo; 8) Zanahoria; 9) Tomate verde; 10) Trigo

Como puede observarse en la figura 15 sólo amplificó el control positivo de carne de res, lo que demostró que los *primers* utilizados para dicha especie son específicos y no hibridarán con otras especies al momento de efectuar las pruebas en muestras comerciales.

### *Prueba de especificidad del primer para la identificación de carne de cerdo*

Para esta prueba se utilizaron las condiciones descritas en la figura 10. Los resultados fueron los siguientes:

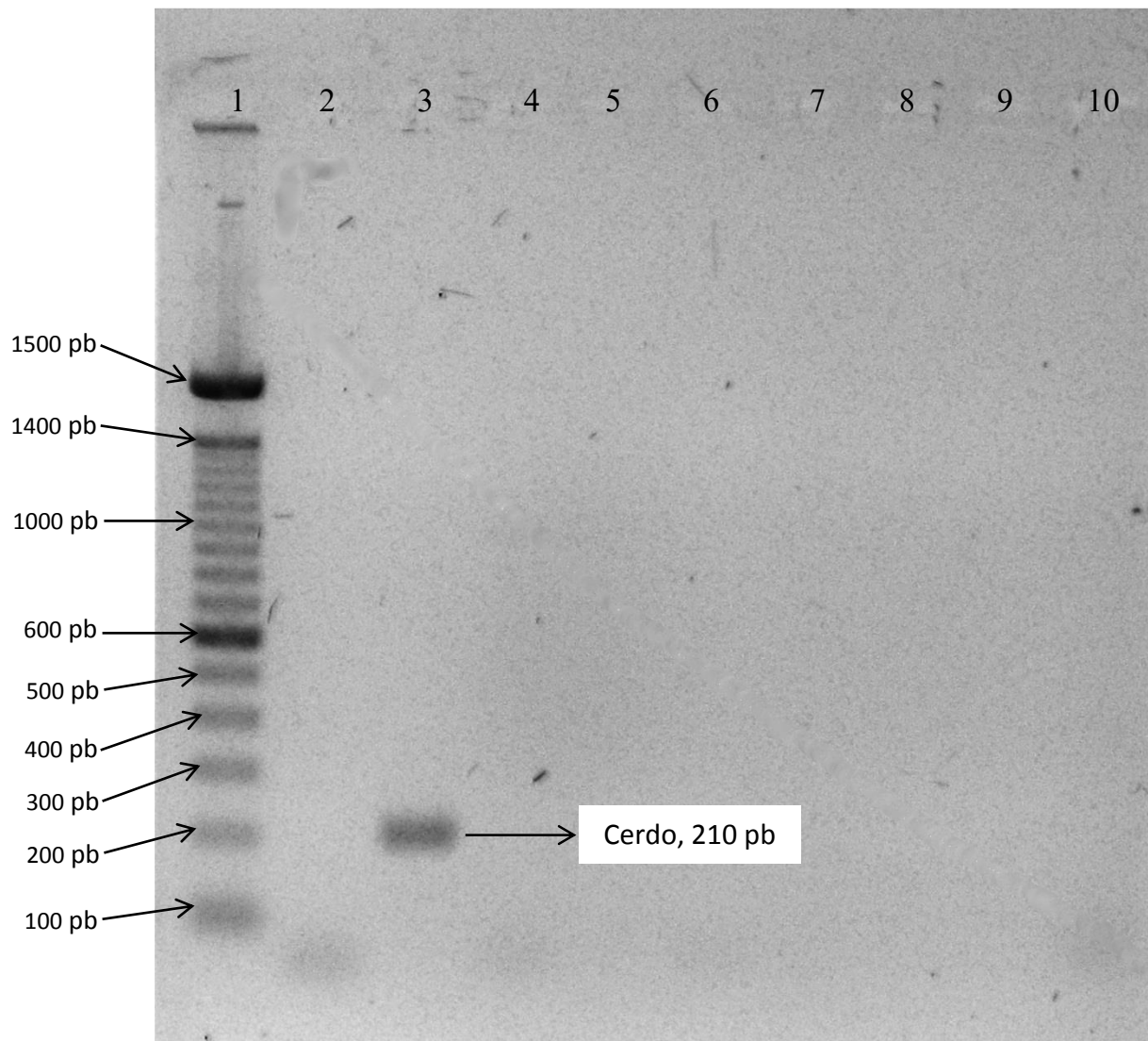


Figura 16 Gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los resultados de la prueba de especificidad del *primer* para la identificación de carne de cerdo. 1) Marcador de peso molecular; 2) Blanco; 3) Res; 4) Pollo; 5) Cerdo; 6) Caballo; 7) Pavo; 8) Zanahoria; 9) Tomate verde; 10) Trigo

En la figura 16 se observa que la única especie que amplificó fue el control positivo de carne de cerdo por lo cual también se concluyó que este *primers* es específico para dicha especie.



### *Prueba de especificidad del primer para la identificación de carne de pollo*

Las condiciones de esta prueba fueron establecidas en la figura 9. En esta prueba se utilizó un *primer* universal denominado SIM que fue diseñado a partir de la semejanza entre secuencias previamente seleccionadas de diferentes especies (entre ellas pollo y caballo) como se muestra en la figura 14.

Los resultados de la prueba fueron los siguientes:

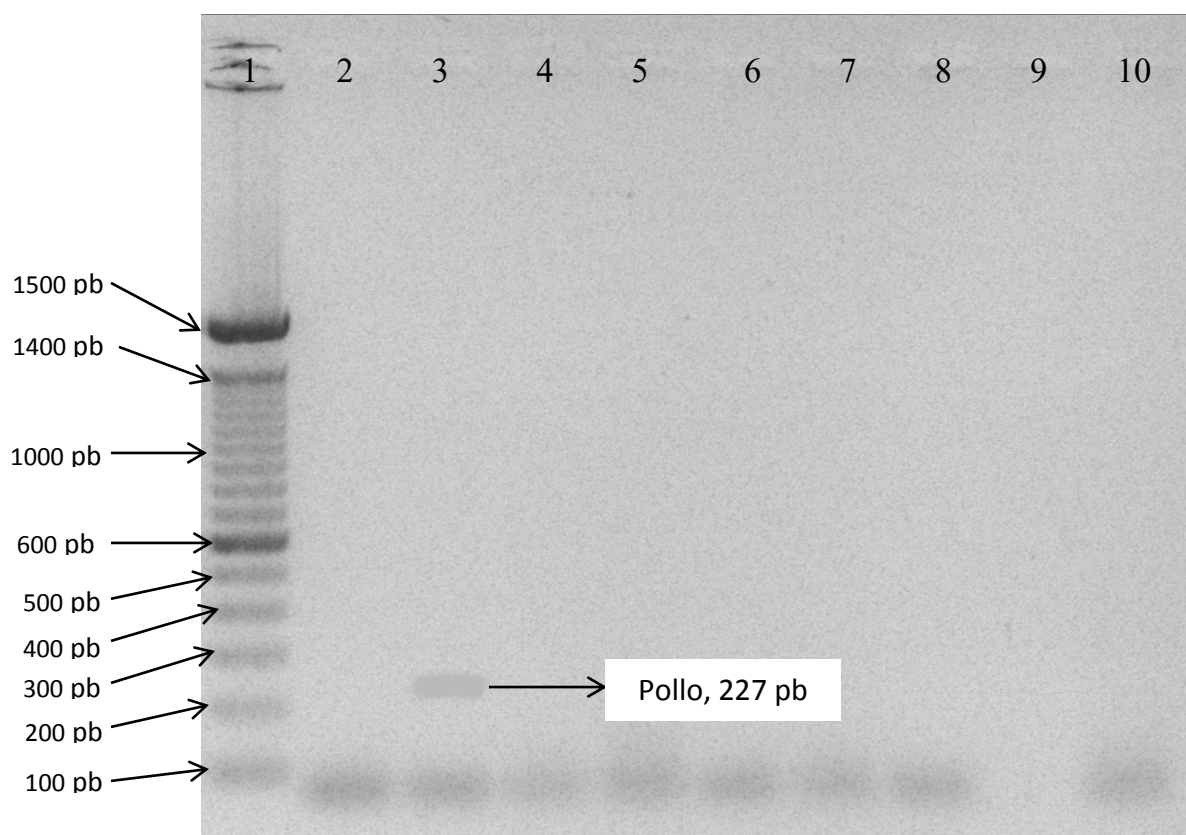


Figura 17 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del *primer* para la identificación de carne de pollo. 1) Marcador de peso molecular; 2) Blanco; 3) Pollo; 4) Res; 5) Cerdo; 6) Caballo; 7) Pavo; 8) Zanahoria; 9) Tomate verde; 10) Trigo

En esta prueba (figura 17) se observa que el amplificado correspondiente a ADN de pollo es muy tenue, casi invisible, esto debido a que al principio el *primer* universal SIM se encontraba contaminado, por lo que fue necesario realizar lavados utilizando un kit para extracción de ADN llamado “*Wizard Magnetic DNA Purification System for Food*” con lo cual se logró mejorar la calidad del *primer*. También pudo deberse al estado del ADN de

pollo extraído al momento de la prueba. Sin embargo, los resultados mostraron que los *primers* utilizados solo hibridaron con la especie de interés por lo que se concluyó que son específicos.

#### *Prueba de especificidad del primer para la identificación de carne de pavo*

La prueba de especificidad para los *primers* de pavo se realizó bajo las condiciones establecidas en la figura 11. Esta fue la prueba más larga, teniendo una duración total de 4 horas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

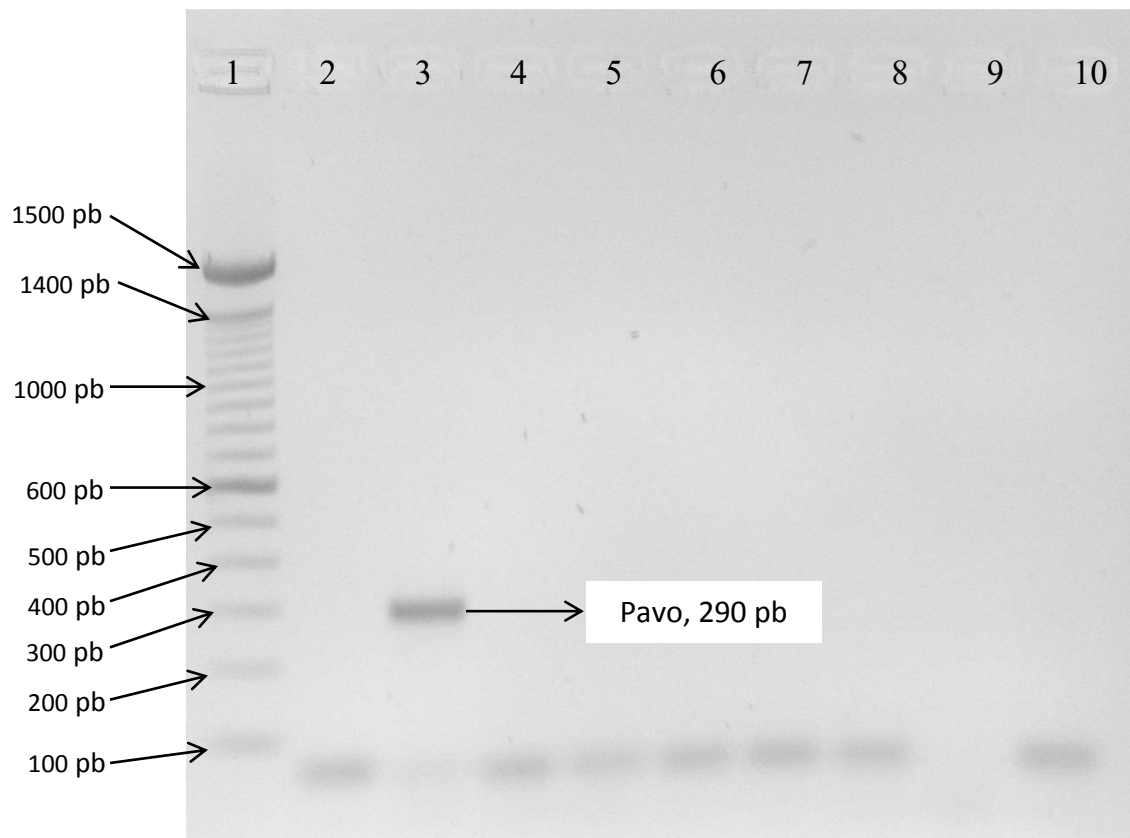


Figura 18 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del *primer* para la identificación de carne de pavo. 1) Marcador de peso molecular; 2) Blanco; 3) Pavo; 4) Pollo; 5) Res; 6) Cerdo; 7) Caballo; 8) Zanahoria; 9) Tomate verde; 10) Trigo

Se observa en la figura 18 que el amplificado correspondiente a ADN de pavo está claramente definido ya que el ADN se extrajo de una muestra fresca de tejido procedente del taller de cárnicos por lo que se conservó en óptimas condiciones hasta el momento de la prueba. Como el único amplificado corresponde a pavo se concluyó que los *primers* utilizados son específicos para dicha especie.

### Prueba de especificidad del primer para la detección de carne de caballo

Se realizó la prueba de especificidad para los *primers* de caballo bajo las condiciones establecidas en la figura 9.

Los resultados de la prueba fueron los siguientes:

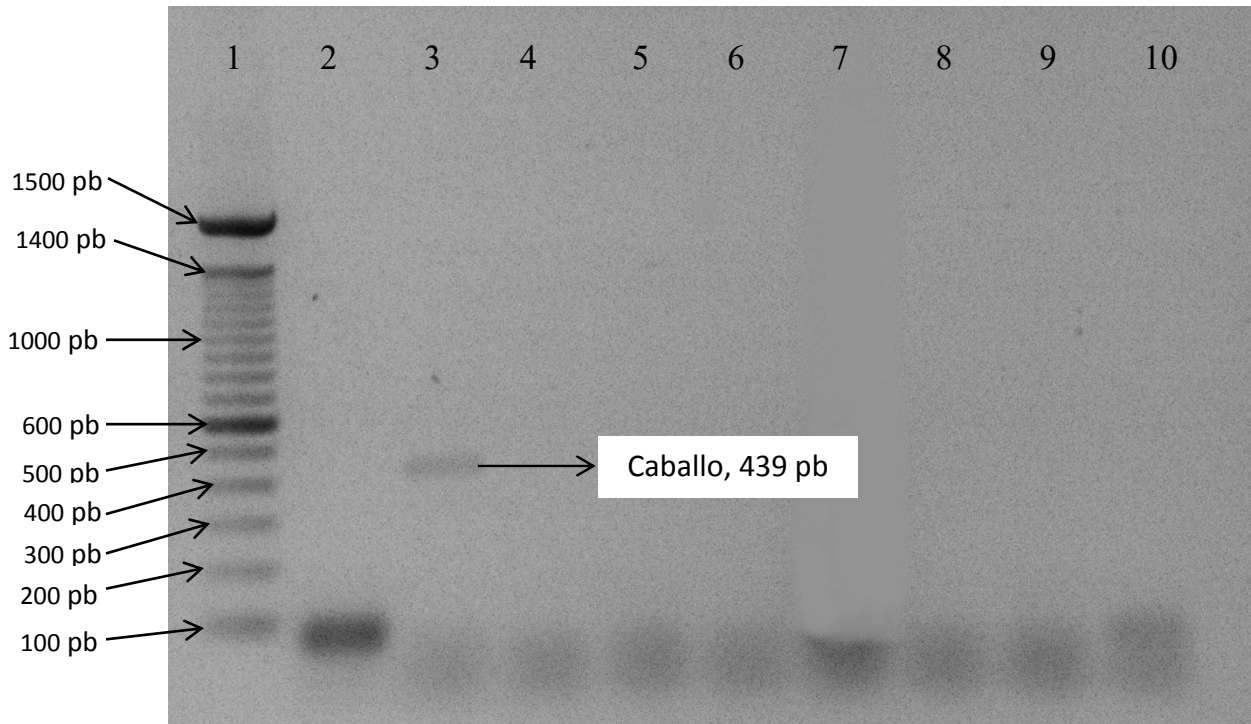


Figura 19 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba de especificidad del *primer* para la identificación de carne de caballo. 1) Marcador de peso molecular; 2) Blanco; 3) Caballo; 4) Pollo; 5) Res; 6) Cerdo; 7) Perro; 8) Zanahoria; 9) Tomate verde; 10) Trigo.

En la figura 19 se observa que el amplificado correspondiente a ADN de caballo es muy tenue, esto se debe a la baja cantidad de ADN extraído de la muestra sanguínea, sin embargo, fue posible la identificación de la especie. También puede observarse que ninguna otra muestra amplificó por lo cual se concluyó que los *primers* utilizados son específicos para dicha especie.

En resumen, las 5 diferentes pruebas de especificidad realizadas demostraron que los *primers* seleccionados son específicos para cada especie para la cual fueron diseñados, por lo que fueron utilizados para la identificación de las especies mencionadas en muestras comerciales.

### 3.4. Objetivo particular 4

*Diseñar la metodología de extracción y purificación de ADN de muestras de salchichas comerciales de diferentes lugares de abasto para la evaluación y detección de posibles especies cárnicas adulterantes.*

Se obtuvieron 11 muestras diferentes de salchichas comerciales en diferentes establecimientos (tiendas de conveniencia y de autoservicio) y se procedió a realizar la extracción de ADN de cada muestra mediante el protocolo descrito anteriormente por Sambrook. Los resultados obtenidos de la extracción se muestran a continuación:

Cuadro 11 Resultados obtenidos de la extracción de ADN sin diluir de salchichas comerciales.

<b>Muestra</b>	<b>Relación 260/280</b>	<b>Concentración de ADN en ng/<math>\mu</math>L</b>
<b>Muestra comercial 1</b>	1.91	1,282.2
<b>Muestra comercial 2</b>	1.8	1,056
<b>Muestra comercial 3</b>	1.88	1,202.8
<b>Muestra comercial 4</b>	1.82	1,518.5
<b>Muestra comercial 5</b>	1.74	2,018.4
<b>Muestra comercial 6</b>	1.71	1,699.1
<b>Muestra comercial 7</b>	1.75	54.6
<b>Muestra comercial 8</b>	1.76	977.7
<b>Muestra comercial 9</b>	1.89	578
<b>Muestra comercial 10</b>	1.69	1,049.9
<b>Muestra comercial 11</b>	1.9	694.2

En los resultados se observó que las cantidades de ADN obtenidas por lo general fueron altas, a excepción de la muestra comercial 7 en donde se obtuvo una cantidad muy baja de ADN, esto pudo deberse a la distribución no equitativa del sobrenadante resultante de la centrifugación con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en la extracción. También se observó que los resultados de la relación 260/280 se mantienen en un intervalo de 1.6 a 1.9 lo que indica que el ADN extraído se encuentra relativamente libre de contaminación por proteínas o ARN y se puede realizar la PCR. La diferencia existente en los resultados de

extracción de la muestra comercial 7 no es significativa por lo que también se encuentra libre de contaminación.

Debido a que la cantidad obtenida de ADN fue muy elevada (a excepción de la muestra comercial 7) se diluyeron las muestras para ajustarlas a una concentración de 60 ng/ $\mu$ L para poder llevar a cabo la PCR. Los resultados de las diluciones se muestran a continuación:

Cuadro 12. Resultados obtenidos de las diluciones de ADN de las salchichas comerciales.

<b>Muestra</b>	<b>Relación 260/280</b>	<b>Concentración de ADN en ng/<math>\mu</math>L</b>
<b>Muestra comercial 1</b>	1.92	71
<b>Muestra comercial 2</b>	1.81	67.7
<b>Muestra comercial 3</b>	1.81	66.9
<b>Muestra comercial 4</b>	1.86	72.4
<b>Muestra comercial 5</b>	1.71	85.3
<b>Muestra comercial 6</b>	1.56	94.7
<b>Muestra comercial 7</b>	1.75	54.6
<b>Muestra comercial 8</b>	1.76	77.6
<b>Muestra comercial 9</b>	1.81	67.5
<b>Muestra comercial 10</b>	1.66	62.5
<b>Muestra comercial 11</b>	1.76	62.4

Al realizar las diluciones se observó que la relación 260/280 de las muestras se mantiene en un intervalo de 1.6 a 1.9 (esta vez a excepción de la muestra comercial 6) lo que indica que el ADN diluido se encuentra libre de contaminación para realizar la PCR. La diferencia existente en la muestra comercial 6 no es significativa por lo que puede utilizarse para la reacción.

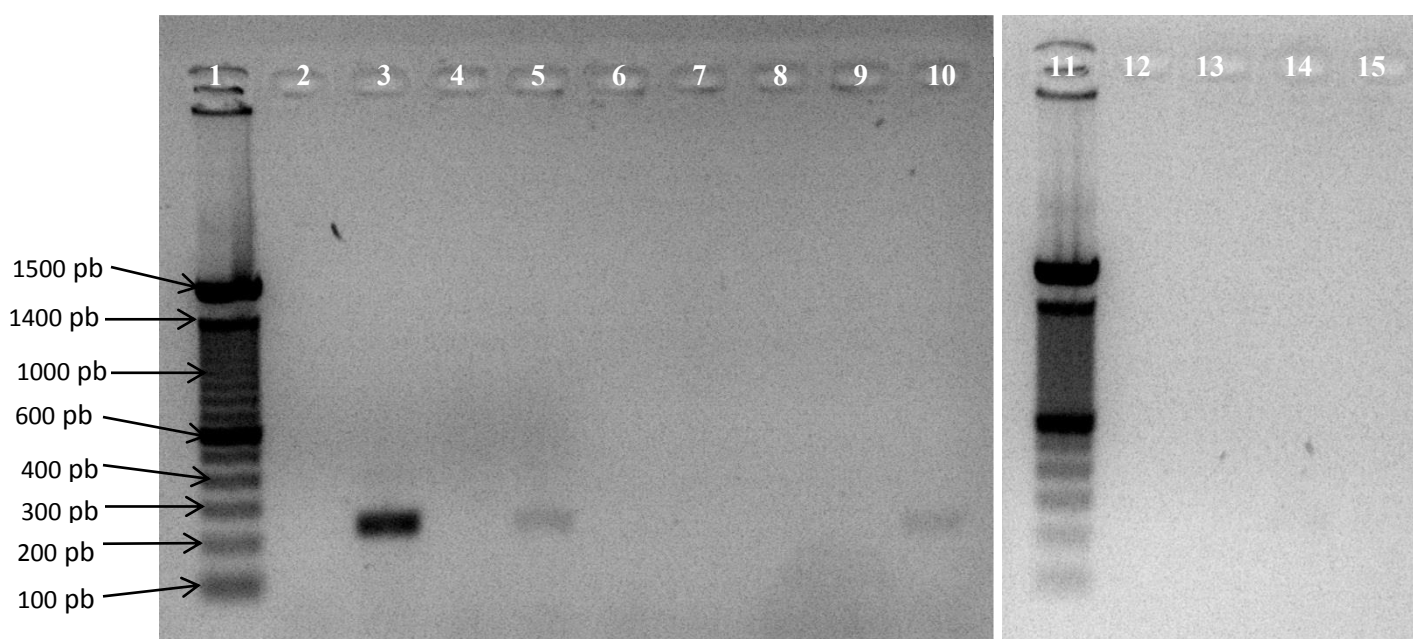
También se observó que las concentraciones de ADN varían entre 50 y 90 ng/ $\mu$ L, esto debido a que la cantidad de ADN cuantificada en las muestras sin diluir es aproximada con lo cual los cálculos realizados para las diluciones también son aproximados y esto es lo que provocó que las muestras de ADN diluidas tuvieran dichas variaciones.

### 3.5.Objetivo particular 5

*Evaluar los primers específicos seleccionados y sintetizados para cada especie, así como las condiciones seleccionadas durante la obtención del ADN de salchichas comerciales en la aplicación de la PCR para la detección de la presencia de especies no reportadas en la etiqueta de las diferentes salchichas comerciales elegidas.*

Se llevó a cabo la PCR en cada una de las muestras comerciales en busca de las especies adulterantes mencionadas. Cada prueba se llevó a cabo bajo las condiciones establecidas con anterioridad. Los resultados fueron los siguientes.

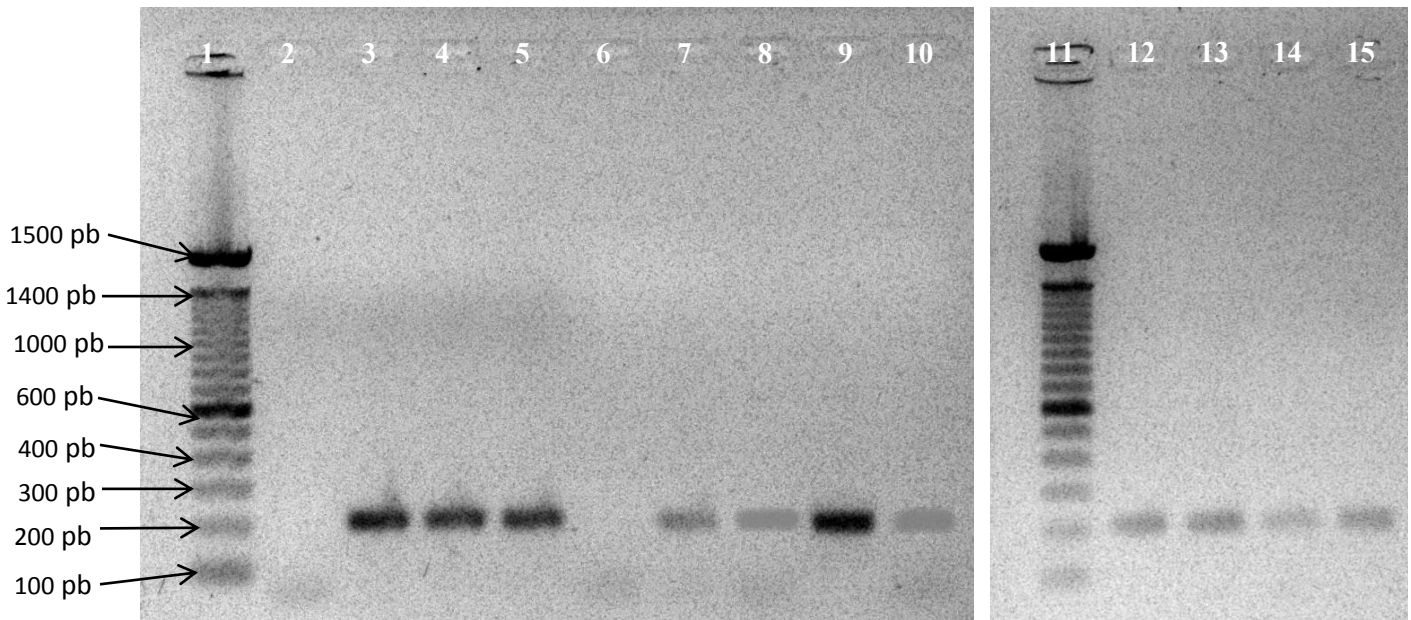
*Prueba en salchichas comerciales para la identificación de la presencia de carne de res*



Figuras 20 y 21 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de res en salchichas comerciales. 1)Marcador de peso molecular, 2)Blanco, 3)C+ de res, 4)Muestra comercial 1, 5)Muestra comercial 2, 6)Muestra comercial 3, 7)Muestra comercial 4, 8)Muestra comercial 5, 9)Muestra comercial 6, 10)Muestra comercial 7, 11)Marcador de peso molecular, 12)Muestra comercial 8, 13)Muestra comercial 9, 14)Muestra comercial 10, 15)Muestra comercial 11.

Los resultados de la prueba (figuras 20 y 21) mostraron que solo 2 muestras contienen carne de res (carriles 5 y 10), mientras que las restantes no contienen. Estos resultados se contrastaron más adelante con lo que reporta la etiqueta de cada muestra. Se pudo observar que el amplificado correspondiente a las muestras comerciales es tenue (figura 20) y esto puede deberse a la cantidad de carne de res que contiene cada muestra ya que el C+ se aprecia correctamente. El marcador molecular utilizado fue de 1,500 pb y el tamaño del amplificado fue de 261 pb.

*Prueba en salchichas comerciales para la identificación de la presencia de carne de cerdo*

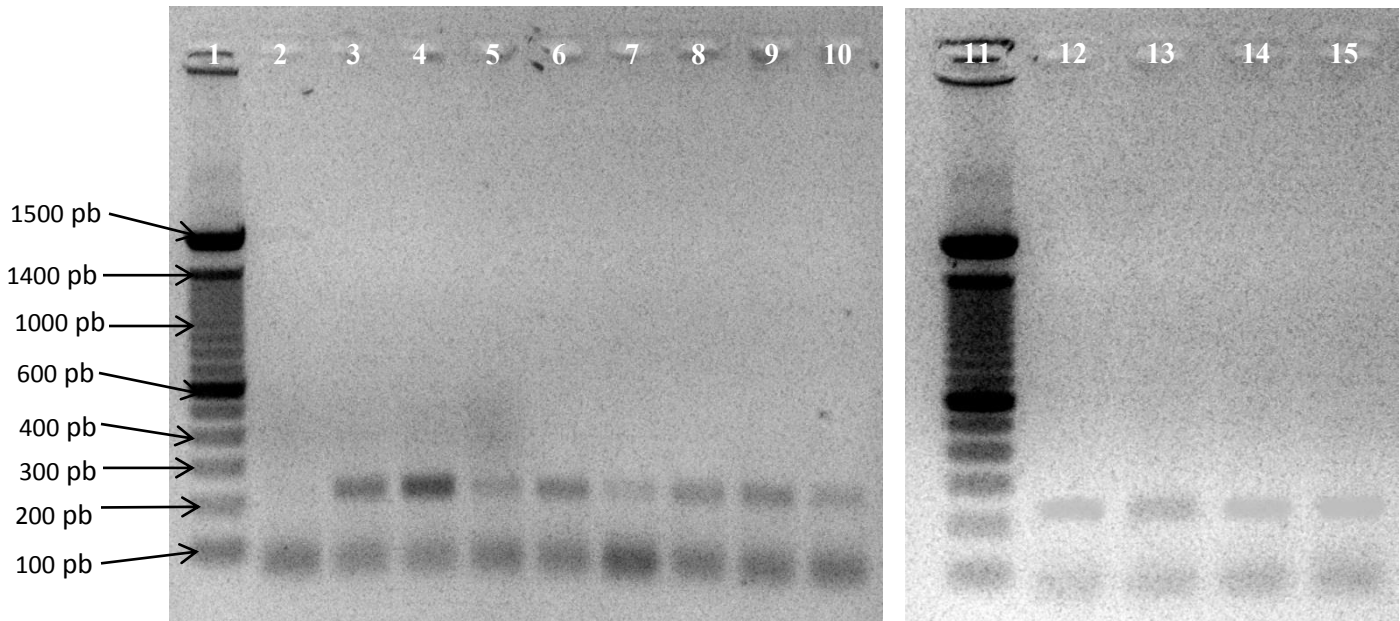


Figuras 22 y 23 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de cerdo en salchichas comerciales. 1) Marcador de peso molecular, 2) Blanco, 3) C+ de cerdo, 4) Muestra comercial 1, 5) Muestra comercial 2, 6) Muestra comercial 3, 7) Muestra comercial 4, 8) Muestra comercial 5, 9) Muestra comercial 6, 10) Muestra comercial 7, 11) Marcador de peso molecular, 12) Muestra comercial 8, 13) Muestra comercial 9, 14) Muestra comercial 10, 15) Muestra comercial 11.

En las figuras 22 y 23 se muestran los resultados obtenidos en la prueba para la identificación de carne de cerdo en salchichas comerciales en donde se observó que la mayoría de los amplificados son claramente visibles.

En esta ocasión, todas las muestras (a excepción de la muestra comercial 3 representada en el carril 6) mostraron la presencia de carne de cerdo. De estas muestras, las representadas en los carriles 4, 5 y 9 son las que se presentaron mayor contenido de carne de cerdo que las muestras restantes (aparentemente) en base a la intensidad de las bandas obtenidas. Estos resultados se contrastaron con lo reportado en las etiquetas de dichas muestras, lo que se muestra más adelante. El tamaño del amplificado para cerdo fue de 210 pb.

*Prueba en salchichas comerciales para la identificación de la presencia de carne de pollo*



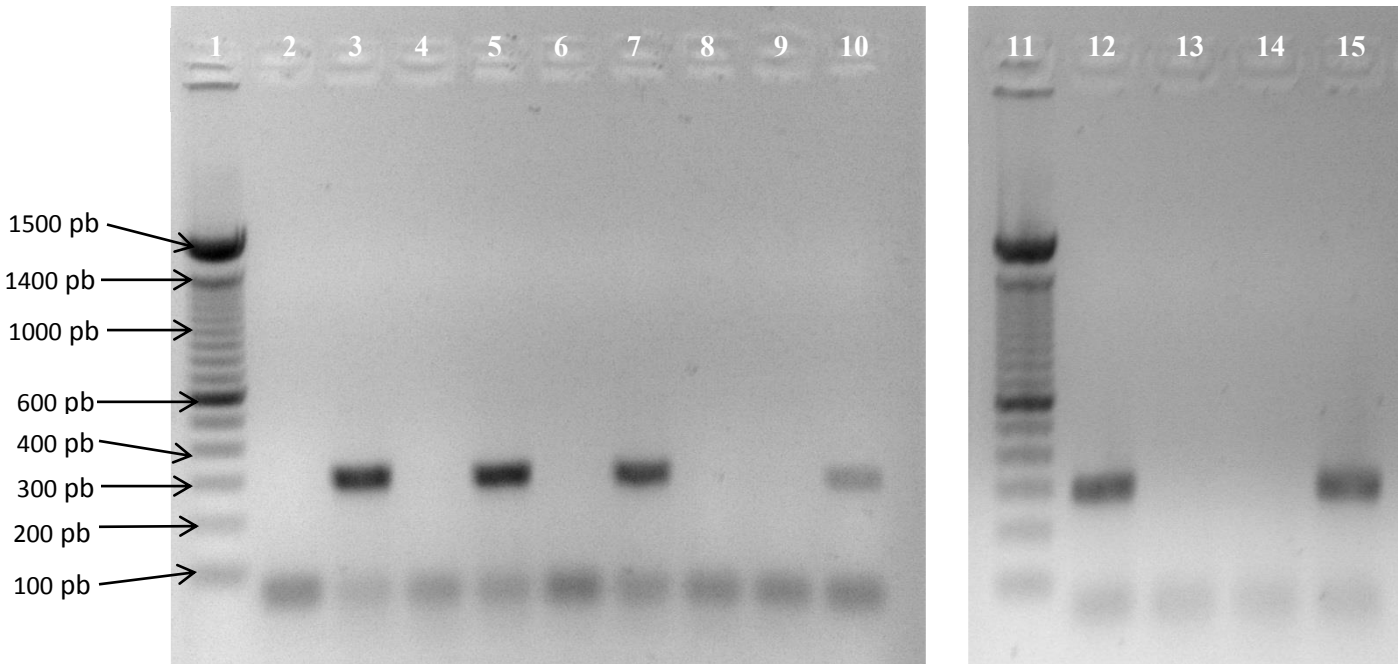
Figuras 24 y 25 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de pollo en salchichas comerciales. 1) Marcador de peso molecular, 2) Blanco, 3) C+ de pollo, 4) Muestra comercial 1, 5) Muestra comercial 2, 6) Muestra comercial 3, 7) Muestra comercial 4, 8) Muestra comercial 5, 9) Muestra comercial 6, 10) Muestra comercial 7, 11) Marcador de peso molecular, 12) Muestra comercial 8, 13) Muestra comercial 9, 14) Muestra comercial 10, 15) Muestra comercial 11.

Las figuras 24 y 25 mostraron que absolutamente todas las muestras analizadas contienen carne de pollo. Más adelante se contrastó si la etiqueta de las muestras reporta la adición dicha especie analizada. También se observó que dicha especie se encuentra en distintas proporciones en cada producto analizado (esto en base a la intensidad de cada banda obtenida). El tamaño del amplificado fue de 227 pb.

La sustitución de carne de cerdo, res o pavo por carne de pollo puede ahorrar costos a la empresa, sin embargo, si no se reporta la presencia de dichas especies o el producto tiene denominación de origen se estaría cometiendo una adulteración.



*Prueba en salchichas comerciales para la identificación de la presencia de carne de pavo*

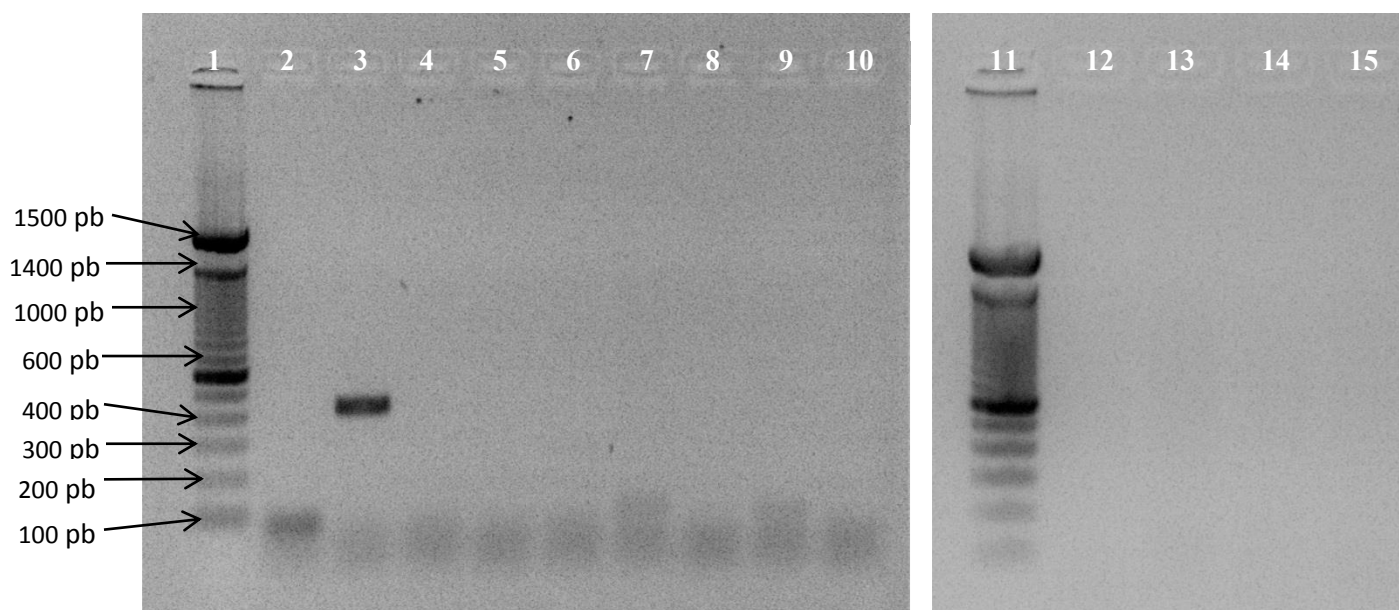


Figuras 26 y 27 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de pavo en salchichas comerciales. 1) Marcador de peso molecular, 2) Blanco, 3) C+ de pavo, 4) Muestra comercial 1, 5) Muestra comercial 2, 6) Muestra comercial 3, 7) Muestra comercial 4, 8) Muestra comercial 5, 9) Muestra comercial 6, 10) Muestra comercial 7, 11) Marcador de peso molecular, 12) Muestra comercial 8, 13) Muestra comercial 9, 14) Muestra comercial 10, 15) Muestra comercial 11.

Como se observó en las figuras 26 y 27 solo 5 muestras de las 11 que fueron recolectadas tuvieron presencia de carne de pavo en una cantidad significativa ya que el amplificado se aprecia clara y notablemente. Esto se cotejó más adelante con los ingredientes reportados en la etiqueta de dichas muestras para identificar si existe fraude por parte de la empresa que las elaboró. El tamaño del amplificado es de 290 pb.

La sustitución de carne de pavo con carne de otras especies repercute negativamente en la calidad del producto final, en la aceptación que el cliente tenga del mismo y en el cumplimiento de la normatividad vigente, más aun si dicho producto tiene denominación de origen.

### *Prueba en salchichas comerciales para la identificación de la presencia de carne de caballo*



Figuras 28 y 29 Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la prueba para la identificación de carne de caballo en salchichas comerciales. 1) Marcador de peso molecular, 2) Blanco, 3) C+ de caballo, 4) Muestra comercial 1, 5) Muestra comercial 2, 6) Muestra comercial 3, 7) Muestra comercial 4, 8) Muestra comercial 5, 9) Muestra comercial 6, 10) Muestra comercial 7, 11) Marcador de peso molecular, 12) Muestra comercial 8, 13) Muestra comercial 9, 14) Muestra comercial 10, 15) Muestra comercial 11.

En las figuras 28 y 29 se observó que el único amplificado que apareció corresponde al control positivo de caballo, de las 11 muestras analizadas ninguna muestra presentó carne de caballo en su composición, lo cual resulta benéfico para el consumidor. Los resultados de la prueba no presentaron errores ya que el amplificado correspondiente a caballo se aprecia clara y notoriamente. El tamaño del amplificado es de 439 pb.

La carne de caballo no es de consumo habitual como la carne de las demás especies analizadas, sin embargo, se han reportado adulteraciones con carne de caballo en varios productos cárnicos por lo que se realizó esta prueba para verificar si existe o no este tipo de adulteración en salchichas comerciales.

### 3.6. Comparación entre especies encontradas y especies reportadas

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el análisis de las muestras comerciales.

Cuadro 13. Comparación entre especies reportadas y especies encontradas en las muestras comerciales analizadas.

<b>Muestra</b>	<b>Especies encontradas</b>	<b>Especies reportadas en la etiqueta del producto</b>
Muestra comercial 1 de salchicha de pavo	Cerdo, Pollo	Ave y cerdo
Muestra comercial 2 de salchicha tipo Viena	Res, Cerdo, Pollo, Pavo	Ave y cerdo
Muestra comercial 3 de salchicha tipo Viena	Pollo	Ave
Muestra comercial 4 de salchicha de pavo	Cerdo, Pollo, Pavo	Ave
Muestra comercial 5 de salchicha tipo Viena	Cerdo, Pollo	Ave
Muestra comercial 6 de salchicha tipo Viena	Cerdo, Pollo	Ave y cerdo
Muestra comercial 7 de salchicha de pavo	Res, Cerdo, Pollo, Pavo	Ave
Muestra comercial 8 de salchicha tipo Viena	Cerdo, Pollo, Pavo	Ave y cerdo
Muestra comercial 9 de salchicha tipo Viena	Cerdo, Pollo	Ave
Muestra comercial 10 de salchicha tipo Viena	Cerdo, Pollo	Ave
Muestra comercial 11 de salchicha de pavo	Cerdo, Pollo, Pavo	Ave

En el cuadro 13 se muestran las especies que fueron encontradas en las pruebas realizadas en el laboratorio y las especies que fueron reportadas en la etiqueta de cada una de las

muestras analizadas. Esta tabla fue elaborada a partir de los resultados obtenidos en cada uno de los geles reportados en el objetivo particular 5.

Para el análisis de los resultados obtenidos se consultó la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 *“Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados”* en donde se establece que 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, de modo que la denominación que tenga un producto cárnico procesado (en este caso salchichas) debe coincidir con los ingredientes declarados en su etiqueta. Además, para la declaración de carne de aves de corral (pollo, pavo, etc) se establece que todos los tipos de carne de aves de corral, cuando dicha carne constituya un ingrediente de otro alimento, se podrán declarar como “carne de ave” siempre y cuando en la etiqueta y en la presentación del producto preenvasado no se haga referencia a un tipo específico de carne de aves de corral.

Con respecto a la primera muestra analizada se encontró en las pruebas realizadas que contiene carne y/o grasa de cerdo y de pollo (figuras 22 y 24 respectivamente). La etiqueta reporta “carne de ave” pudiéndose referir a la carne y/o grasa de pollo utilizada y también reporta carne y/o grasa de cerdo. De acuerdo con la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 el término “carne de ave” puede utilizarse solo en caso de que no se haga referencia a un tipo específico de carne de ave de corral y como esta muestra esta etiquetada como “salchicha de pavo” se comete una violación a la norma, por tanto, se concluyó que dicho producto se encuentra adulterado al no contener carne de pavo en su composición.

La muestra comercial 2 reporto en su etiqueta la utilización de carne de ave pero no se especifica a fondo cuál de las dos especies fue utilizada o si se agregaron ambas especies en su elaboración. La prueba realizada en el laboratorio para dicha muestra reporto la presencia de carne y/o grasa de res, cerdo, pollo y pavo. Esto no representa problema alguno ya que pollo y pavo se están declarando como “carne de ave” lo que se encuentra permitido por la norma al no tener denominación de origen alguna. De acuerdo a las figuras 20, 22, 24 y 26 la muestra contiene mayoritariamente carne y/o grasa de res y pavo y en menor proporción se encontró carne de pollo y res (esto debido a la visibilidad de los

amplificados obtenidos). La NMX-F-065-1984 establece que una salchicha tipo Viena puede ser elaborada con carne de cerdo, res y/o mezclas de estas especies, pero la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 determina que se debe declarar el uso de manteca de cerdo y/o bovino siempre por sus denominaciones específicas. Debido a esto se concluyó que esta muestra comercial se encuentra adulterada al no declarar el uso de grasa de bovino en su elaboración ya que puede inducir a engaño al consumidor además de causarle algún problema de salud.

Para la muestra comercial 3 se encontró que la etiqueta reporta la adición de carne de ave en su proceso de elaboración aunque no se detalla con exactitud la especie utilizada. Los resultados de la prueba realizada en dicha muestra revelaron que contiene carne y/o grasa de pollo (figura 24). Por definición de la NMX-F-065-1984 una salchicha estilo Viena está elaborada con carne de cerdo, res y/o mezcla de las mismas, sin embargo, una NMX no es de observancia obligatoria y debido a que la etiqueta detalla “carne de ave” como único ingrediente cárnico utilizado no se considera un producto adulterado.

Respecto a la muestra comercial 4 una vez más la etiqueta reporta la adición de carne de ave pero no detalla la especie de la cual procede dicha carne adicionada. Los resultados obtenidos en el laboratorio revelaron la presencia de 3 especies en dicha muestra: cerdo, pavo y pollo. De acuerdo a lo mostrado en las figuras 22, 24 y 26, la muestra contiene mayoritariamente carne de pavo, aunque también se observa que contiene significativamente carne y/o grasa de cerdo no declarada en la etiqueta del producto y carne y/o grasa de pollo en menor proporción. Debido a que la etiqueta del producto solo establece “carne de ave” como el único ingrediente cárnico utilizado en su elaboración, siendo una salchicha de pavo y a que también se encontró cerdo en la prueba efectuada dicho producto se encuentra adulterado.

Las pruebas realizadas a la muestra comercial 5 arrojaron que contiene carne y/o grasa de cerdo y pollo (figuras 22 y 24). Al apreciar la visibilidad del amplificado para pollo puede observarse que es claramente visible (de acuerdo a la visibilidad del control positivo) lo que significa que dicha especie se encuentra en una proporción considerable dentro del porcentaje de carne y/o grasa adicionados en dicha muestra. Sin embargo, se observó que el amplificado correspondiente a cerdo es muy tenue en comparación con el control positivo

de dicha especie lo que indica que la proporción en la que se encuentra es mucho menor que la proporción de carne y/o grasa de pollo que se adiciono. Dado que la etiqueta solo reporta la adición de pollo (carne de ave) y a que, siendo una salchicha tipo Viena, no se declara la grasa de cerdo en la etiqueta, la presencia de esta última se considera una adulteración y una violación a la normatividad vigente.

Los resultados obtenidos en la muestra comercial 6 indican la presencia de carne y/o grasa de cerdo y pollo (figuras 22 y 24), los cuales se encuentran reportados en la etiqueta del producto de acuerdo a la normatividad vigente. De acuerdo a la visibilidad de los amplificadores, la carne y/o grasa de cerdo adicionada se encuentra en una proporción mucho mayor que la de pollo. Como se trata de una salchicha tipo Viena se considera normal que la carne y/o grasa de cerdo se encuentre en una proporción mayor que cualquier otra especie adicionada, por lo que se puede concluir que esta muestra no se encuentra adulterada y su consumo no representa peligro alguno para el consumidor en general.

Para la muestra comercial 7 se obtuvieron resultados muy controversiales ya que de las 4 especies que se encontraron en dicha muestra solo se reporta la adición de “carne de ave” en la etiqueta del producto. En las figuras 20, 22, 24 y 26, en el carril 10 respectivamente, puede apreciarse la visibilidad de los amplificadores obtenidos, para lo cual, los amplificadores que corresponden a res, cerdo y pollo presentan una menor visibilidad con respecto al amplificador que corresponde a pavo, lo que indica que las 3 primeras especies se encuentran en una proporción y cantidad menor que la de pavo. Esto resulta sorprendente ya que la muestra fue tomada de una salchicha de pavo, por lo cual se esperaría que solo contuviera carne de pavo. Esto resulta en una adulteración y en una grave violación tanto a la normatividad en materia de etiquetado vigente como a la seguridad del consumidor ya que pueden presentarse problemas de salud al consumir este tipo de producto.

Al contrario de la muestra comercial 7, para la muestra comercial 8 se encontraron mejores resultados ya que las 3 especies identificadas (cerdo, pollo y pavo) se encuentran reportadas en la etiqueta del producto (aunque pollo y pavo pueden ser reportadas solo como “carne de ave”). Al igual que en la muestra comercial 7, la proporción de carne y/o grasa de pavo es mayor (figura 27) en comparación con las otras dos especies (figuras 23 y 25) de acuerdo a la visibilidad de los amplificadores obtenidos, esto no debería ser así ya que según a la NMX-

F-065-1984 una salchicha tipo Viena debe tener al menos 60% de carne de cerdo, res o mezcla de estas, sin embargo, esta norma no es de observancia obligatoria por lo que, a pesar esto, es un producto que no se encuentra adulterado, seguro para el consumidor y cumple con la normatividad en materia de etiquetado vigente para su comercialización.

Respecto a las muestras comerciales 9 y 10 se encontró en las pruebas realizadas la presencia de carne y/o grasa de cerdo y pollo cuando en la etiqueta solo se reporta “carne de ave”. Estos resultados pueden apreciarse en las figuras 23 (presencia de cerdo) y 25 (presencia de pollo). La normatividad vigente establece que la grasa de cerdo debe ser declarada siempre con sus denominaciones específicas por lo que, al no declarar la presencia de carne y/o grasa de cerdo, se incurre en una violación y, por tanto, se considera que ambas muestras se encuentran adulteradas ya que pueden inducir a error o engaño al consumidor.

Finalmente, los resultados obtenidos en la muestra comercial 11 mostraron que, además de contener carne de pavo, también contiene cerdo casi en la misma proporción y pollo en una proporción mucho menor, de acuerdo a lo observado en las figuras 23, 25 y 27. Esto resulta alarmante ya que la etiqueta de dicha muestra comercial afirma solo contener carne de pavo y no reporta la presencia de las dos especies restantes, con lo que se concluye que dicho producto se encuentra adulterado y viola la normatividad vigente.

## **Conclusiones y recomendaciones**

Gracias a la técnica de extracción de ADN de Sambrook, se logró obtener ADN relativamente puro tanto en la obtención de los controles positivos como de cada muestra comercial analizada, llevando a cabo el cumplimiento satisfactorio de los objetivos particulares 2 y 4 de este proyecto.

Los *primers* seleccionados fueron sometidos a pruebas de especificidad con especies filogenéticamente cercanas y filogenéticamente lejanas y, ya que no amplificaron con otra especie sino solo para la cual fueron diseñados, se comprobó que son específicos y no amplificaran con otras especies, cumpliendo así con el objetivo particular 3.

Todo lo anterior permitió realizar las pruebas de PCR en salchichas comerciales e identificar las muestras que se encuentran adulteradas. Dicha adulteración fue determinada utilizando la hipótesis propuesta al comparar los bandeos obtenidos de los controles positivos de cada especie con los obtenidos de cada muestra comercial y siempre en base a la normatividad vigente, de esta manera, se cumplió el objetivo general que hace hincapié a la detección de dichas adulteraciones en salchichas comerciales mediante el uso de PCR.

La Ley Federal de Protección al Consumidor regula la expedición de normas que aplican al etiquetado de los alimentos para garantizar que se expresen de forma transparente y entendible los ingredientes con los cuales ha sido fabricado un producto alimenticio. Para este trabajo se utilizó la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 en materia de etiquetado y la NMX-F-065-1984 en cuanto al porcentaje de cada especie dentro de salchichas comerciales para analizar cada muestra comercial.

En resumen, de las 11 muestras analizadas, 8 (muestras comerciales 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10 y 11) resultaron en alguna adulteración que generalmente fue la adición de carne y/o grasa de otras especies que no se reportó en la etiqueta de dicho producto. Esto se hace con la finalidad de ahorrar gastos en su fabricación y también de poder presentar un producto más competitivo (más barato) respecto a las otras marcas existentes en el mercado ya que la carne de pavo es mucho más cara en comparación de la carne y/o grasa de cerdo, res y pollo. También se pudo observar que muchas empresas prefirieron reportar el uso de carne de pavo y/o pollo como “carne de ave” en vez de reportar la especie como tal. Esto puede cumplir (en ocasiones) con la normatividad de etiquetado vigente pero puede traer



problemas al consumidor que puede creer que, si el producto asegura ser de pavo, lo contenga bajo la leyenda “carne de ave” (véase cuadro 13) sin saber que puede contener otro tipo de carne de ave (como por ejemplo pollo) o incluso no contenerla, violando lo estipulado en la ley federal del consumidor lo que hace considerar a estos productos como adulterados.

Las 3 muestras comerciales que aparentemente si reportaron todas las especies utilizadas en su fabricación también manejaron la leyenda “carne de ave” en su etiqueta pero, como se revisó anteriormente en la norma, se permite reportar la presencia de carne de aves de corral bajo dicha leyenda siempre que la etiqueta o la presentación no hagan referencia a un tipo específico de carne de aves de corral, por lo que se encuentran dentro de las especificaciones vigentes.

Por último, en ninguna muestra comercial analizada se encontró la presencia de carne de caballo (figuras 28 y 29) lo cual resultó benéfico para los consumidores.

En este proyecto solo se realizó la búsqueda de 5 especies cárnicas en cada muestra comercial, sin embargo, existen otras especies que pueden resultar adulterantes o se pueden adicionar otros ingredientes que pueden reducir la calidad de dicho producto (como lo es la fécula de maíz) por lo que se recomienda revisar los ingredientes de las muestras comerciales y proponer el análisis por medio de PCR de las especies que también pudieran resultar adulterantes.

## Referencias

- Aranguren, J. M., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil, Y. O., Yañez, L., Borjas, L., y Zabala, W. (2009). Identificación de especies en productos de origen animal mediante PCR. *Revista Científica (Maracaibo)*, 19(2).
- ArgenBio. (2014). Estructura de cada base nitrogenada que compone al AND nuclear. Recuperado el 9 de marzo del 2014, de [www.argenbio.org](http://www.argenbio.org)
- Asensio, L., González, I., García, T., y Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19(1), 1-8.
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577-587.
- Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., y Karlsson, A. H. (2009). Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83(2), 165-174.
- Barbut, S. (2013). Review: Automation and meat quality-global changes. *Meat Science*, 96(1), 335-345.
- Bartlett, J. M. S., y Stirling, D. (2003). *PCR Protocols* (2nd ed.). New Jersey: Humana Press Inc.
- Binnie, M. A., Barlow, K., Johnson, V., y Harrison, C. (2014). Red meats: Time for a paradigm shift in dietary advice. *Meat Science*, 98(3), 445-451.
- Cardoso, P. M. de C., y Baltazar, A. F. (2012). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586-592.
- Carrillo, M. F. B., Velazco, O. H. G., Gamero, M. B., e Ibarra, M. A. (2010). *Desarrollo de hamburguesa utilizando granza de frijol extruido como agente extensor*. Trabajo presentado en el XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos de 2010, Guanajuato, Gto.
- Cornejo, A. R., Serrato, A. D., Rendón, B. A., y Rocha, M. M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1ra ed.). Mexico: INEEC-SEMARNAT.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., y Fennema, O. R. (2010). *Fennema química de los alimentos*. España: Editorial Acirbia.
- Dirección General de Normas. (1984). *NMX-F-065-1984 "Alimentos. Salchichas. Especificaciones"*. México: DGN.

Dominguez, J. (2011). *Inspeccion ante mortem y post mortem en animales de produccion*. España: Servet editorial.

Espinosa, L. A. (2007). Guia practica sobre PCR. In I. N. d. Ecología (Ed.), *Ecología molecular*. México, D.F.

FAO. (2007). Producción y sanidad animal. Recuperado el 19 de agosto del 2014, de [http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr\\_composition.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html)

FAO. (2015). *Perspectivas alimentarias, resúmenes de mercado*. Estados Unidos: FAO.

Forrest, J. y col. (1979). *Fundamentos de ciencia de la carne*. Acribia, Zaragoza, España.

Gallardo, J. M., Ortea, I., y Carrera, M. (2013). Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. *Trends in Analytical Chemistry*, 52, 135-141.

Hernández, J., González, A., Rodríguez, R. y Vallejo, B. (2011). Development of a polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis method for the detection of chicken or turkey meat in heat-treated pork meat mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 708(1-2), 149-154.

Hoogenkamp, H. W. (2008). *Proteína de soya y fórmulas para productos cárnicos*. España: Editorial Acribia.

Hui, Y. H., Legarreta, Isabel G., y Rosmini, Marcelo R. (2010). *Ciencia y tecnología de carnes*. Mexico, D.F.: Editorial Limusa.

Kamruzzaman, M., Maniko, Y., y Oshiita, S. (2014). *Non-invasive analytical technology for the detection of contamination, adulteration, and authenticity of meat, poultry, and fish: A review*. *Analytica Chimica Acta*.

Lawrie, R. A., y Ledward, D. A. (2006). *Lawrie's meat science* (7th ed.). England: Woodhead Publishing Limited.

Ley Federal de Protección al Consumidor (LFPC) y su reglamento. Diario Oficial de la Federación, 3 de agosto del 2006.

Lopez, R., y Casp, A. (2004). *Tecnología de mataderos*. España: Ediciones Mundi-Prensa.

Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., y Shinmura, Y. (1998). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143-148.

Mondragón, P. C., y Ulloa, J. (2011). Identificación de alimentos adulterados mediante espectroscopía de infrarrojo. *Revista Fuente* 3(6), 5-9.

Muller, S. G., y Ardoíno, M. A. (2000). Procesamiento de carnes y embutidos, un manual práctico de experiencias. Recuperado el 6 de mayo del 2014, de [http://www.pasqualinonet.com.ar/PDF/carnes\\_all.pdf](http://www.pasqualinonet.com.ar/PDF/carnes_all.pdf).

Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2014). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed.). New York: W. H. Freeman.

NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-213-SSA1-2002. Productos y Servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. México. Secretaria de Salud, 2003.

Ramírez, A. F., Córser, P. I., Leaf, K. V., Cagnasso, M. A., González, M. P., y Urdaneta, A. G. (2006). Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la calidad microbiológica de carne de hamburguesa. *Revista Científica FCV-LUZ*, 16(4), 428-437.

Roman, N. A. (2012). Genoma mitocondrial y enfermedades relacionadas. Recuperado el 8 de septiembre del 2014, de [www.kizzurblood.blogspot.com](http://www.kizzurblood.blogspot.com)

SAGARPA. (2000). *Elaboración de productos cárnicos*. México: SAGARPA.

SAGARPA. (1994). *NOM-009-ZOO-1994 "Proceso Sanitario de la Carne"*. Mexico: SAGARPA.

SAGARPA. (2011). *Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011-2020*. México: SAGARPA.

Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3ra ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Secretaria de Comercio y Fomento Industrial (2010). *NOM-051-SCFI/SSA1-2010 "Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados"*. México: SCFI

Secretaría de Salud. (2003). *NOM-213-SSA1-2002 "Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba"*. México: SSA.

Segura, H. P. (2004). ADN mitocondrial, envejecimiento y cancer. *Umbral Científico*, 3, 12-18.

Thitika, K., Kuangtiwa, S. y Phuvadol, T. (2014). Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chemistry*, 163, 77-82.

UNED. (2000). La Reacción en Cadena de la Polimerasa, Principios Basicos de la Manipulación Genética. Recuperado el 17 de abril del 2014, de <http://cosmolinux.no-ip.org/uned/pcr.pdf>.

Velazco, R. (2004). La biología molecular y el ADN. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 2(1).

## Anexo

### Búsqueda y comprobación de los *primers* utilizados

Este anexo tiene como finalidad verificar que las secuencias de *primers* utilizados en este proyecto sean las correctas, así como corroborar el tamaño del amplificado, su ubicación dentro de la cadena original y su exactitud. Dichas secuencias se corroboraron en la base de datos “GenBank” del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Accesar al NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y aparecerá la siguiente pantalla, seleccionar en la opción “nucleotide” e introducir el nombre científico de la especie y la región de ADN de interés.

The image is a screenshot of the NCBI website's search interface. At the top, there is a search bar with a 'Search' button. Below the search bar, a dropdown menu titled 'All Databases' is open, showing a list of databases including dbGaP, dbVar, Epigenomics, EST, Gene, Genome, GEO DataSets, GEO Profiles, GSS, GTR, HomoloGene, MedGen, MeSH, NCBI Web Site, NLM Catalog, Nucleotide (highlighted in blue), OMIM, PMC, PopSet, and Probe. A red box highlights the search bar, and a red arrow points to the 'Nucleotide' option. Text overlays on the image read 'CUADRO DE BUSQUEDA' and 'SELECCIONAR "/>

También puede introducirse el código GI de la especie de interés (si se cuenta con la información de una secuencia previamente publicada) para encontrar exactamente dicha publicación.

2. Una vez que se da click al botón “buscar” mostrara los resultados que concuerden con la búsqueda realizada, dar click a la liga de interés.

The screenshot shows the NCBI Nucleotide search interface. The search term 'sus scrofa' is entered in the search bar. The results are displayed in a list format, showing 1 to 20 of 609232 items. The first five items are listed, each with a checkbox, a title, and a brief description. The first item is 'Sus scrofa selenoprotein X mRNA, complete cds' with 1,215 bp linear mRNA. The second item is 'Sus scrofa type III cytochrome p450 aromatase gene, partial cds' with 6,381 bp linear DNA. The third item is 'Sus scrofa domesticus mitochondrial DNA, D-loop region, isolate: Satsuma 29' with 1,055 bp linear DNA. The fourth item is 'Sus scrofa mitochondrial DNA, D-loop region, isolate: Europeanwild boar 3' with 1,045 bp linear DNA. The fifth item is 'Sus scrofa mitochondrial DNA, D-loop region, isolate: European wild boar 1' with 1,045 bp linear DNA. On the right side, there are sections for 'Results by taxon', 'Find related data', and 'Search details'.

3. Una vez identificada la especie de interés y dar click en ella se mostrara toda la información sobre su publicación y al final su secuencia. Dar click en “Find in this sequence” para poder introducir la secuencia del *primer* frontal que se tenga o, si no se tiene ninguna secuencia previamente establecida, se puede seleccionar una región para poder diseñar un *primer*.

The screenshot shows the NCBI Nucleotide search interface for the specific entry 'Sus scrofa domesticus mitochondrial DNA for repeat sequence'. The entry is displayed in a detailed view, showing the GenBank ID (D42182.1), the FASTA sequence, and the full text of the publication. The publication title is 'Geographic population structure and sequence divergence in the mitochondrial DNA control region of the Japanese wild boar (Sus scrofa leucomystax), with reference to those of domestic pigs'. The authors are Okumura, N., Ishiguro, N., Nakano, M., Hirai, K., Matsui, A. and Sahara, M. The journal is 'Biochem. Genet.' 34 (5-6), 179-189 (1996). A red arrow points to the 'Find in this Sequence' button in the 'Analyze this sequence' section. The page also includes sections for 'Related information' and 'Recent activity'.

4. Al dar click en “find in this sequence” se mostrara un campo en la parte inferior de la pantalla donde se introducirá la secuencia del *primer* que se quiere encontrar. En caso de que la secuencia introducida no se encuentre entre la secuencia reportada en la referencia regresar al paso 2 y seleccionar otra referencia.

The image shows a screenshot of a sequence viewer interface. The main area displays a DNA sequence with line numbers from 14581 to 16741. A search bar at the bottom contains the text "cgcctcattcttctcatctglatctt" and a "Find" button. A callout box with a black border and white background contains the text "Escribir la secuencia aquí y presionar 'enter'", with a black arrow pointing from the box to the search bar. The search bar also shows "1 of 1" and "AB086102 : 15162-15188".

Si la secuencia introducida se encuentra entre la secuencia reportada se resaltara en color café y nos indicara la posición de la misma dentro del genoma, con esto podremos calcular el tamaño del amplificado y tener una idea de la exactitud y viabilidad del *primer* seleccionado.

Cabe mencionar que las secuencias publicadas corresponden a un solo extremo de la doble cadena del ADN (dirección 5' a 3') por lo que el *primer* frontal se busca introduciendo directamente la secuencia que se tiene desde el extremo 5' hacia el extremo 3' y para encontrar el *primer* reverso primero se obtiene la cadena complementaria de la secuencia del *primer* reverso en dirección 3' a 5' y la cadena complementaria resultante es la que se introduce en el buscador.