



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Detección de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays*) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), en miel de abeja, mediante PCR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

YAZMIN CRUZ HERNÁNDEZ

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa

COASESOR: M. en M. Josefina Moreno Lara

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2019



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

Detección de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays*) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), en miel de abeja, mediante PCR.

Que presenta la pasante: **Yazmin Cruz Hernández**
Con número de cuenta: **311286418** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Enero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en A. Liborio Carrillo Miranda	
SECRETARIO	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Adela Lira Vargas	

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

DEDICATORIA

A:

Mi madre Yazmin Vázquez por siempre brindarme su ayuda y cariño incondicionales, por todos los valores que me inculcó, por creer en mí y apoyarme en mi formación académica y como persona.

Mi padre David Mayén por todo su apoyo, paciencia, ayuda y estar presente en los momentos más importantes de mi vida.

Mi hermano Brentz Cruz por siempre hacerme sonreír aún en los momentos difíciles, por creer en mí y considerarme un ejemplo a seguir.

Mis titos Gloria Mayén y Marco Antonio Pichardo por su cariño, su ayuda, sus atenciones, consejos, historias y por consentirme siempre.

Un historiador que me ayudó incondicionalmente en la elaboración de esta tesis y a crecer y aprender a ser mejor persona y profesionista (TUFH).

Golem por llegar a mi vida y hacerme compañía.

Mis amigos por todos los momentos divertidos y gratos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Montiel Sosa por su apoyo, paciencia y asesoría.

A la M. en M. Josefina Moreno Lara por todo su tiempo, paciencia, consejos y gran ayuda brindada.

A mis sinodales por la dedicación que tuvieron al revisar mi trabajo de tesis. Sobre todo, al maestro Liborio Carrillo Miranda, por brindarme su conocimiento en abejas y miel y por ayudarme a perder el miedo a las abejas.

A mi queridísimas UNAM y FES Cuautitlán por hacer posible mi formación académica como ingeniera en alimentos con excelentes profesores.

Por último, quiero agradecer a todos los seres de luz que hicieron posible la elaboración de este trabajo de tesis.

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Resumen.....	1
Introducción	2
CAPITULO I. ANTECEDENTES	4
1.1 La abeja productora de miel (<i>Apis mellifera</i>).....	4
1.2 Definición de la miel	5
1.3 Producción de la miel	5
1.4 Clasificación de la miel	7
1.5 Microbiología de la miel.....	8
1.6 Propiedades fisicoquímicas de la miel	9
1.6.1 Carbohidratos	9
1.6.2 Proteínas y aminoácidos	9
1.6.3 Vitaminas y minerales	10
1.6.4 Humedad.....	10
1.6.5 Enzimas	10
1.6.6 Acidez y ácidos orgánicos	11
1.6.7 Hidroximetilfurfural.....	11
1.6.8 Aroma, color y sabor de la miel	11
1.6.9 Conductividad eléctrica.....	11
1.7 La miel en México y el mundo.....	12
1.8 Calidad de la miel.....	16
1.9 ¿Qué es una adulteración y un adulterante en alimentos?.....	17
1.10 Legislación	18
1.11 Adulterantes de la miel	20
1.12 Métodos de detección de adulteraciones en la miel.....	20
1.13 Reacción en cadena de la polimerasa.....	22
1.13.1 Fundamento y características de la PCR	22
1.13.1.1 Elementos de la PCR.....	24
1.13.1.2 Diseño de primers	27
1.13.1.3 Etapas de la PCR	27
1.13.1.4 Tipos de PCR.....	30
1.13.1.5 Ventajas y desventajas	31

1.13.1.6 Aplicaciones	32
1.13.2 Electroforesis.....	32
Justificación.....	35
CAPTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	36
2.1 Cuadro metodológico	36
2.2 Descripción del cuadro metodológico	37
2.2.1 Objetivo general.....	37
2.2.2 Objetivo particular 1.....	37
2.2.3 Objetivo particular 2.....	37
2.2.4 Objetivo particular 3.....	37
2.3 Materiales	38
2.3.1 Materiales biológicos.....	38
2.3.2 Reactivos	39
2.3.3 Equipos.....	40
2.4 Metodología	40
2.4.1 Diseño de primers	40
2.4.2 Preparación de la muestra de miel de abeja	41
2.4.3 Extracción de ADN.....	41
2.4.4 Cuantificación	42
2.4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	42
2.4.6 Programas para la PCR.....	43
2.4.6.1 Programa de PCR para caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	43
2.4.6.2 Programa de PCR para levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	44
2.4.6.3 Programa de PCR para maíz (<i>Zea mays</i>).....	44
2.4.7 Electroforesis	45
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1 Objetivo particular 1	46
3.1.1 Diseño de primers	46
3.2 Objetivo particular 2	47
3.2.1 Especificidad de los primers	47
3.2.1.1 Gel de integridad del ADN.....	47
3.2.1.2 Control positivo para maíz y caña de azúcar	49
3.2.1.3 Control positivo para levadura	50
3.2.1.2 Especificidad <i>Saccharum officinarum</i> (caña de azúcar)	51

3.2.1.3 Especificidad <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura).....	52
3.2.1.4 Especificidad <i>Zea mays</i> (maíz)	53
3.3 Objetivo particular 3	54
3.3.1 Detección de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura) en la miel	55
3.3.2 Detección de <i>Saccharum officinarum</i> (caña de azúcar) en la miel.....	57
3.3.3 Detección de <i>Zea mays</i> (maíz) en la miel	59
Conclusiones.	62
Referencias	63
ANEXOS	67
Anexo 1.....	67
Anexo 2.....	78

Índice de figuras

Figura 1. Tipos de abeja <i>Apis mellifera</i>	4
Figura 2. Ecuación química de la inversión de los azúcares de la miel	5
Figura 3. Miel cristalizada	7
Figura 4. Petroglifo maya de una abeja Melipona.....	12
Figura 5. Estados con mayor producción de miel.....	13
Figura 6. (Izquierda) Tablilla sumeria de los usos de la miel.	14
Figura 7. (Derecha) Libro de medicina chino de 1505.....	14
Figura 8. Molécula de ADN	26
Figura 9. Etapas de la PCR.....	29
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa	34
Figura 11. Programa diseñado para la amplificación de un segmento de ADN de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) con los primers frontal y reverso para esta especie.	43
Figura 12. Programa diseñado para la amplificación de un segmento de ADN de levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) con los primers frontal y reverso para esta especie.	44
Figura 13. Programa diseñado para la amplificación de un segmento de ADN de maíz (<i>Zea mays</i>) con los primers frontal y reverso para esta especie.....	45
Figura 14. Gel de electroforesis elaborado al 1% y corrido a 90v, para verificar la concentración e integridad del ADN.....	48
Figura 15. Gel de agarosa al 1%, corrido a 90v, para los controles positivos de maíz y caña de azúcar.	50
Figura 16. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v para control positivo de levadura.	51
Figura 17. Gel de agarosa al 1%, corrido a 90v, con los primers frontal y reverso para caña de azúcar de 760Pb, para corroborar la especificidad de los primers.	52
Figura 18. Gel de electroforesis en del de agarosa al 1%, corrido a 90v, con los primers frontal y reverso para levadura de 564Pb, para corroborar la especificidad de los primers.	53
Figura 19. Gel de electroforesis en del de agarosa al 1%, corrido a 90v, con los primers frontal y reverso para maíz de 738Pb, para corroborar la especificidad de los primers.	54
Figura 20. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de levadura en las muestras 1-5 de miel.	56
Figura 21. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de levadura en las muestras 6-10 de miel.	57
Figura 22. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de caña de azúcar en las muestras 1-5 de miel.	58
Figura 23. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de levadura en las muestras 6-10 de miel.	59
Figura 24. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de maíz en las muestras 1-5 de miel.	60
Figura 25. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de maíz en las muestras 6-10 de miel.	61

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes principales de la miel de abeja.....	6
Tabla 2. Carbohidratos presentes en la miel de abeja.....	9
Tabla 3. Países exportadores de miel.....	15
Tabla 4. Parámetros de calidad de la miel.....	16
Tabla 5. Especificaciones de las muestras utilizadas.....	38
Tabla 6. Especies utilizadas para controles positivos y especificidad.....	38
Tabla 7. Temperaturas de hibridación para los primers diseñados.....	41
Tabla 8. Preparaciones por muestra de cada componente para la PCR.....	43
Tabla 9. Características de los primers diseñados para <i>Saccharum officinarum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Zea mays</i>	46
Tabla 10. Concentración del ADN extraído de diferentes especies para corroborar la especificidad para los primers de caña de azúcar, levadura y maíz.....	47
Tabla 11. Concentración del ADN extraído para controles positivos de caña de azúcar, levadura y maíz.....	49
Tabla 12. Concentraciones de ADN de diferentes mieles comerciales.....	55



Resumen

Actualmente, las adulteraciones en miel de abeja son muy frecuentes. Esta problemática ha afectado en primer lugar la economía de México y sus principales estados productores de miel, y segundo, la reputación de los apicultores, ya que estos no pueden competir con los precios establecidos por los adulteradores. Incluso se ha visto deteriorada la credibilidad de los consumidores, ya que muchos de ellos no consumen miel al considerar que ya no hay miel 100% pura de abeja.

Existen diversos métodos químicos y físicos para detectar las adulteraciones en la miel de abeja, sin embargo, en algunos casos la adulteración es casi imposible de identificar mediante estos métodos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podría ser una técnica bastante aplicable para esta problemática, ya que con ella puede ser posible detectar fragmentos de genes de los precursores de los azúcares que no pertenecen a la miel.

Es por esta razón que el objetivo principal de este estudio es evaluar la presencia de las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays* en miel de abeja comercial mediante la técnica de PCR para identificar posibles adulteraciones.

En el presente trabajo se analizaron diez diferentes muestras de miel provenientes de recauderías, mercados y súper mercados para analizar la presencia, de adulteraciones directas con las especies de maíz (*Zea mays*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) e indirectas con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Mediante el uso de programas bioinformáticos se diseñaron primers para las especies mencionadas anteriormente. La extracción de ADN se realizó con ayuda del protocolo de Sambrook en todos los productos (mieles, controles positivos y especies para la especificidad de los primers). Se realizó PCR para la identificación de maíz, caña de azúcar y levadura. Por último, para obtener los resultados se realizaron geles de agarosa, se visualizaron en un trasluminador de luz ultravioleta y se interpretaron los resultados.

Como resultado a lo largo de la experimentación, se encontró que de las diez mieles evaluadas sólo en tres de ellas se pudieron visualizar adulteraciones.

Al haber la presencia de otros componentes, estos deberían estar especificados en la etiqueta de acuerdo con la normatividad nacional e internacional. Es de suma importancia hacer conciencia en los consumidores a cerca de la miel y de las adulteraciones en ésta para que puedan hacer una mejor elección y consumirla sin el prejuicio de que ninguna miel de la actualidad es miel real.



Introducción

La miel es uno de los alimentos con mayor antigüedad que el ser humano aprovechó como fuente de alimento nutritivo. Está compuesta por diferentes azúcares, ácidos orgánicos, minerales, aminoácidos, enzimas y partículas sólidas. Lo que hace que este alimento se considere como altamente nutritivo por sus propiedades beneficiosas para la salud y como edulcorante (Rico y Cáceres, 2017 y Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Reséndiz y Rosas, 2010).

La apicultura en México tiene una gran importancia ecológica y socioeconómica, ya que esta actividad se considera como una importante generadora de divisas. Dicha labor se asocia únicamente con la producción de miel y sus derivados, no obstante, la cría de abejas juega un papel fundamental para el ambiente (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2016).

En nuestro país se producen más de 57 mil toneladas de miel al año, es por ello por lo que México se encuentra entre los primeros diez lugares en producción y exportación de este alimento (Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2017).

Con el propósito de mantener la demanda de miel dentro de los mercados nacionales e internacionales, los productores se han preocupado -en gran medida- por garantizar su autenticidad, ya que la práctica de adulteraciones en este producto es muy común (Ulloa et al., 2010).

Un alimento denominado adulterado es aquel al que, con fines fraudulentos y de forma premeditada, se le ha adicionado, quitado o sustituido alguna sustancia o ingrediente de menor calidad y/o valor (Beltrán, 2016 y Castro, 2017).

La normativa internacional para la comercialización de la miel determina que solo puede ser mínimamente procesada -por centrifugación, filtración o mínimo calentamiento-, pero en ningún caso está permitido añadir ningún tipo de sustancia o aditivo (Rico y Cáceres, 2017).

La adulteración en la miel se produce, mediante la adición de soluciones azucaradas de forma fraudulenta, al ser estas soluciones mucho más económicas que la propia miel, por ejemplo, sacarosa, fructosa, azúcar de caña, jarabe de maíz (para aumentar el volumen del producto), o bien por alimentar a las abejas en exceso con azúcar u otros sustitutos como la levadura para cerveza durante el flujo del néctar. Lo cual conlleva a la una alteración en su valor nutricional y por tanto una pérdida de la mayoría de sus propiedades y beneficios para la salud, junto al perjuicio económico por el descredito hacia el producto, debido al sabor y a la calidad notablemente disminuida, lo que repercute en la disminución de su consumo (Andrade, Torres y Pérez, 2016; Cavero, 2016 y Rico y Cáceres, 2017).



Una de las técnicas más confiables para detectar adulteraciones en alimentos es la reacción en cadena de la polimerasa. La PCR es una reacción enzimática *in vitro*, que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, sin la necesidad de hacer uso de células vivas durante el proceso de clonación (Gardner, Simmons y Snustad, 2017 y Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

Por lo mencionado anteriormente, es de suma importancia detectar posibles adulteraciones en la miel de abeja vendida comercialmente, con la finalidad de mantener informados a los consumidores acerca de este producto, y las consecuencias que podría tener la adulteración del producto, como baja calidad, alteración en sus nutrientes, etc. Para que de esta manera puedan hacer una elección más consciente al respecto y alertarlos en caso de padecer alergias a alguno de estos aditivos.



CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1 La abeja productora de miel (*Apis mellifera*)

Las abejas que producen la miel son conocidas como *Apis mellifera* son insectos denominados sociales, debido a que viven formando colonias constituidas por 40,000 individuos aproximadamente, los cuales se dividen ordenadamente las labores y el alimento. Se alimentan de néctar que transforman en miel, habitan en zonas con floración abundante, construyen panales con cera en colmenas o huecos naturales, algunas poseen un aguijón con forma de arpón que sólo utilizan al verse atacadas, muriendo al clavarlo y se reproducen formando enjambres. En cada colonia, pueden encontrarse tres diferentes individuos, como se muestra en la figura 1: La abeja reina, las obreras y los zánganos (Herrero, 2004).

La reina, siendo la máxima autoridad de la colonia, es la única hembra perfecta y fecunda, se caracteriza por ser más grande que el resto y por sus alas cortas en relación con el cuerpo, tiene un aguijón que utiliza exclusivamente para luchar contra otras abejas reinas y necesita la compañía de las obreras para sobrevivir. Las abejas obreras son parte de la población más numerosa siendo 70,000 en primavera y 20,000 en invierno aproximadamente. Desarrollan diferentes funciones de acuerdo con su edad, por ejemplo, cuando nacen trabajan como limpiadoras, al cuarto día son nodrizas que alimentan a las larvas y proporcionan calor al nido de cría, en el décimo día son las acompañantes de la reina, después actúan como ventiladoras, segregan cera, fabrican miel, retiran cuerpos extraños y mantienen segura la colmena. Por último, a los veinte días y hasta que perecen, salen al campo en busca de néctar, polen, propóleos y agua. Los zánganos, nacen de un huevo no fecundado, en cada colmena hay de 500 a 1500, su tarea es doble, fecundan a la reina y dan calor al nido de cría (Herrero, 2004).



Figura 1. Tipos de abeja *Apis mellifera*

Fuente: Encyclopedia Britannica, 2006



1.2 Definición de la miel

Se entiende por miel la sustancia dulce natural, no fermentada, producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas (miel de néctar) o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas (miel de mielada) y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje (Food and Agriculture Organization [FDA], 2001).

La miel es originaria de las plantas, y se obtiene gracias a la acción intermediaria de las abejas. El proceso comienza cuando las abejas percoreadoras incorporan la saliva fluidificante y algunas enzimas al néctar que han recolectado, con la finalidad de transformar sus azúcares; para lo cual, hacen uso de una de sus partes del cuerpo, denominada buche, éste lo llenan de néctar y posteriormente lo han de trasportar a su colmena. Después, el néctar es transmitido de una abeja a otra por trofalaxis varias veces, lo que hace que se adicione más saliva y así se puedan transformar los azúcares. Finalmente, se deposita en las celdas y el proceso bioquímico para la producción de la miel comenzará (Jean-Prost, 2007).

1.3 Producción de la miel

La producción de la miel se realiza mediante la transformación física y química del néctar. Los cambios físicos, se originan principalmente por un proceso de evaporación, en el que el néctar pierde hasta una tercera parte de su contenido de humedad durante su almacenamiento en la colmena y los cambios químicos (figura 2) se producen por la reacción de enzimas que las obreras adicionan al néctar, como es el caso de la invertasa (sacarasa), la cual hidroliza la sacarosa presente en el néctar a glucosa y fructosa (Zamora y Arias, 2011). De acuerdo con Jean-Prost (2007), la transformación o inversión de los azúcares del néctar puede expresarse con la siguiente ecuación química: $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \Rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$

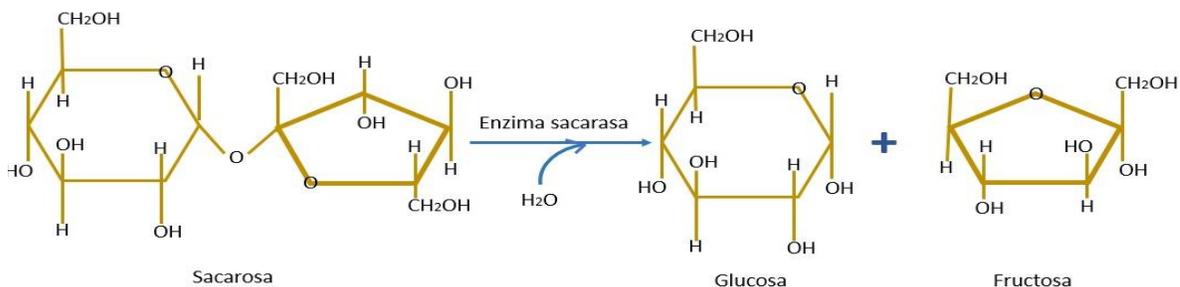


Figura 2. Ecuación química de la inversión de los azúcares de la miel
Fuente: Elaboración propia



Finalmente, el néctar es convertido en miel, siendo una solución sobresaturada de azúcares y una de las mezclas de carbohidratos más complejas y nutritivas producidas naturalmente, conteniendo pequeñas cantidades de ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, vitaminas, compuestos fenólicos y compuestos volátiles (Zamora y Arias, 2011).

Las abejas resguardan la miel con un opérculo de cera para protegerla. No obstante, las mieles que contienen un porcentaje de agua de 21 o mayor, pueden fermentar en los panales, aún cubiertas por los opérculos. Sólo las mieles con menor porcentaje de agua (18% o menos) pueden conservarse bien (Jean-Prost, 2007)

Los componentes de la miel (ver tabla 1) son principalmente azúcares (fructosa y glucosa), además de otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas y partículas sólidas de la recolección (FAO, 2001).

Tabla 1. Componentes principales de la miel de abeja

Componente	Rango
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido	Mínimo 60
Sacarosa	Máximo 5. % (g/100g)
Glucosa	Máximo 30. % (g/100g)
Contenido de humedad	Máximo 20. %(g/100g)
Acidez	Máximo 40. Miliequivalentes de ácido/kg

Fuente: Elaboración propia con datos de PROY-NOM-004-SAG/GAN-2018

La composición de la miel es dependiente de diversos factores, como las especies de las plantas de las cuales las abejas hayan tomado el néctar, la química del suelo, el clima, el manejo apícola y de la miel cosechada. Por ejemplo, las mieles oscuras con sabor fuerte que son cosechadas en zonas de costa de vegetación tropical suelen tener un alto contenido de hierro y otros minerales, por otro lado, las mieles sin procesar o filtrar, contienen pequeños trozos de polen lo cual provoca que el contenido de proteína sea mayor (Revista del consumidor, 2015).

La miel también contiene granos de polen, de 100 a 5, 000 granos por gramo de miel, los cuales ayudan con su determinación botánica y geográfica. Además, todas las mieles encierran granos de almidón, polvos minerales y partículas de cera. Cuando se encuentra un contenido elevado de las sustancias mencionadas anteriormente, quiere decir que esas mieles fueron procesadas sin precaución (Jean-Prost, 2007).



Acorde con la Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006, alimentos-miel-especificaciones y métodos de prueba y el proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones, así como la especificación de la Unión Europea: Directiva 2001/110/CE, el color de la miel varía, por lo que puede ser de color blanco agua, extra blanca, extra clara ámbar, ámbar claro, ámbar u oscura. Su olor y sabor es propio característico.

La consistencia de la miel puede ser líquida, cremosa o sólida y su cristalización, parcial o total. Con el tiempo, la miel cristaliza en la mayoría de los casos, este proceso es una característica natural que se liga al contenido y composición de azúcares, de tal manera que las mieles con mayor contenido de glucosa cristalizan con mayor rapidez (SAGARPA, 2002).

La cristalización es una modificación que sucede en las mieles naturales, ya que la sobresaturación de diversos azúcares (más de 70% contra 20% o menos de agua) hace que se produzcan granos finos o gruesos con facilidad. Es decir, a mayor cantidad de glucosa y fructosa, mayor saturación, mientras que, a mayor cantidad de agua, menor es la tendencia a que la miel cristalice. Gracias a este fenómeno es que el color de la miel puede cambiar de negro u oscuro, a marrón o blanco (ver figura 3). El tiempo de cristalización varía entre los diferentes tipos de miel, en algunas es inmediato y en otras puede tardar años. Además de la relación azúcar-agua, la temperatura de almacenamiento y el manejo que se le da a la miel, también influyen; A temperaturas menores a 21°C se retrasa el proceso de cristalización y entre los 10 °C o menores temperaturas, se promueve (Revista del consumidor, 2015).



Figura 3. Miel cristalizada

Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Miel_cristalizada#/media/File:MielCristalizada.jpg

1.4 Clasificación de la miel

De acuerdo con Zandamela (2008), existen diversos rubros para clasificar la miel. Uno de ellos es por su origen, que puede ser:

- ⇒ Miel de flores o miel de néctar: Es la que se produce a partir del néctar de las plantas.



- ⇒ Miel de mielada: Su procedencia es de las excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas.

Otra clasificación es según su elaboración o presentación:

- ⇒ Miel de panal: Es la miel que las abejas depositan en los alvéolos operculados (cerrados o tapados) de panales que ellas mismas elaboran a partir de láminas de cera.
- ⇒ Miel con trozos de panal o panal cortado en miel: Es aquella que tiene uno o más trozos de miel en panal sin larvas.
- ⇒ Miel centrifugada: Como su nombre los indica, es la miel que se obtiene por medio de la centrifugación de los panales desoperculados y sin larvas.
- ⇒ Miel prensada: Se obtiene mediante la compresión de los panales, no debe tener larvas y puede realizarse con o sin aplicación de calor de hasta 45°C como máximo.
- ⇒ Miel filtrada: Se adquiere eliminando la materia orgánica o inorgánica ajena a la miel mediante filtración, de tal manera que se genere una eliminación de polen importante.
- ⇒ Miel para uso industrial: Es la que se utiliza en la industria como ingrediente de diversos productos alimenticios. Esta miel puede presentar sabores u olores no característicos, haber comenzado a fermentar o haberse sobrecalentado.

Según la Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006 alimentos-miel-especificaciones y métodos de prueba, la miel puede clasificarse de la siguiente manera:

- ⇒ Miel en panal: Es la que no ha sido extirpada de su depósito natural de cera y puede ser consumida como tal.
- ⇒ Miel líquida: Es aquella que ha sido extraída de los panales en estado líquido y sin la presencia de cristales visibles.
- ⇒ Miel cristalizada: Se encuentra en estado sólido o semisólido granulado, resultante del fenómeno natural de cristalización de los azúcares que la constituyen.

1.5 Microbiología de la miel

La miel como un alimento con humedad intermedia, puede presentar una flora adaptada a las condiciones hostiles para su crecimiento; Por su pH ácido, baja humedad y actividad de agua, una alta viscosidad, alta concentración de azúcares y presión osmótica, este producto es un sustrato poco apto para que los microorganismos se desarrollen, sin embargo, la supervivencia de algunos de ellos es posible (Zandamela, 2008).



La flora microbiana propia de la miel, le es introducida por las abejas que la producen, por ejemplo, algunas esporas de diferentes especies de bacilos, mohos, levaduras banales u osmófilas. Además de la microflora original, pueden integrarse al alimento otros microorganismos considerados contaminantes que proceden de las condiciones de obtención, como lo son el hombre, insectos predadores, roedores, animales de compañía que pueden aportar una contaminación secundaria por la presencia de gérmenes patógenos como *Salmonella*, entre otros. De los microorganismos patógenos que pueden transferirse a la miel, se encuentran: *Bacillus larvae*, *Bacillus alvei*, *Aspergillus flavus*, *Ascospheara apis*, *Ascospheara alvei*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringes* o *C. botulinum* (Zandamela, 2008).

1.6 Propiedades fisicoquímicas de la miel

1.6.1 Carbohidratos

Son los carbohidratos los componentes principales de la miel. Dentro de ellos, los azúcares primordiales son los monosacáridos glucosa y fructosa, estos representan el 85% de los sólidos contenidos en este alimento son en esencia una solución con concentraciones altas de azúcares en agua. El resto de los sólidos de la miel, incluyen 25 azúcares complejos (ver tabla 2), algunos de ellos presentes en bajos niveles y todos ellos conformados por la unión de glucosa y fructosa en diferentes combinaciones (Ulloa *et al.*, 2010).

Tabla 2. Carbohidratos presentes en la miel de abeja

Monosacáridos	Disacáridos	Trisacáridos	Sacáridos complejos
Fructosa	Gentibiosa	Centosa	Isomaltopentosa
Glucosa	Isomaltosa	Eriosa	Isomaltotetraosa
	Maltosa	Isomaltotriosa	
	Maltulosa	Isopanosa	
	Nigerosa	Laminaritriosa	
	Palatinosa	Maltotriosa	
	Sacarosa	Melezitosa	
	Turalosa	Panosa	

Fuente: Ulloa *et al.*, 2010.

1.6.2 Proteínas y aminoácidos

El contenido de aminoácidos en la miel es dependiente de su contenido de nitrógeno y entre el 40-80% del nitrógeno total de la miel es proteína. Existen cerca de 20 proteínas no enzimáticas identificadas en la miel, algunas son originadas por las abejas y otras por el néctar de la planta. Debido a la presencia de proteínas, es que la miel posee una tensión superficial baja, lo que provoca la tendencia al espumado mediante la formación de pequeñas y finas burbujas de aire. Se han encontrado entre 11 y 21 aminoácidos libres de los cuales, la prolina abarca más de la mitad del contenido total; Otros aminoácidos encontrados en mayor cantidad son la alanina, fenilalanina,



tirosina, leucina e isoleucina. La función de los aminoácidos en la miel es reaccionar con algunos de sus azúcares, produciendo sustancias responsables del oscurecimiento de la miel durante su almacenamiento de color amarillo o café (Ulloa *et al.*, 2010).

1.6.3 Vitaminas y minerales

Aunque la cantidad de vitaminas en la miel y su contribución a la dosis diaria recomendada no es suficiente, su contenido de vitaminas es considerada por bromatólogos o expertos en la salud como necesarias para el bienestar y nutrición humana: Las del grupo B, tiamina, niacina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina y ácido ascórbico (vitamina C). La miel, a menos que sea sometida a algún proceso térmico, no pierde sus vitaminas (Lavandera Rodríguez, 2011 y Ulloa *et al.*, 2010).

De igual manera, contiene minerales esenciales para la salud, siendo el potasio cerca de la tercera parte del contenido total de minerales en la miel, excediendo 10 veces el contenido de sodio, calcio y magnesio. En menor cantidad, pero también importantes, se encuentran el hierro, magnesio, cobre, cloro, fósforo, azufre y sílice (Ulloa *et al.*, 2010).

1.6.4 Humedad

El contenido de humedad en la miel es de suma importancia y dependiente de diversos factores ambientales y del contenido de humedad del néctar; Por ejemplo, cuando la miel madura excede su contenido normal de humedad (>18.5%) tiene una alta probabilidad de comenzar a fermentar, en particular cuando la cantidad de levaduras osmófilas es lo suficientemente alta. El contenido de agua en la miel también influye en su viscosidad, peso específico y color, lo que a su vez condiciona su conservación y cualidades organolépticas (Ulloa *et al.*, 2010).

1.6.5 Enzimas

La mayor parte de las enzimas que contiene la miel, son añadidas por las abejas, sin embargo, algunas otras provienen de las plantas. Con la finalidad de llevar a cabo el proceso de maduración del néctar a la miel, las abejas añaden enzimas dándole así a la miel su composición tan compleja (Ulloa *et al.*, 2010).

La enzima de mayor importancia en la miel es la sacarasa, también conocida como invertasa o α -glucosidasa, debido a que es responsable de varios de los cambios que ocurren durante la conversión de néctar a miel, su función es convertir la sacarosa de la miel en fructosa y glucosa. Otras enzimas presentes en la miel son la glucosa oxidasa, que proporciona a la miel su propiedad antibacteriana; la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua; la ácido fosfatasa que se encarga de degradar el almidón y la diastasa cuya función es como indicador de aplicación de calor a la miel (Ulloa *et al.*, 2010).



Estas enzimas se producen en las glándulas hipofaríngeas y la saliva de las abejas. La actividad enzimática de las sustancias mencionadas con anterioridad, puede deshacerse por fuertes temperaturas y decrecer con el paso del tiempo (Jean-Prost, 2007).

1.6.6 Acidez y ácidos orgánicos

El contenido de ácidos orgánicos en la miel representa aproximadamente el 0.5% de los sólidos contenidos, son los responsables del bajo pH y de la excelente estabilidad de este alimento. El ácido glucónico es el ácido orgánico predominante, se origina mediante la acción de la enzima glucosa oxidasa añadida por las abejas a partir de la glucosa; y combinado con el peróxido de hidrógeno ayuda a la conservación del néctar y la miel. En menor proporción, también se encuentran los ácidos fórmico, acético, butírico, láctico, oxálico, succínico, tartárico, maleico, pirúvico, piroglutámico, α -cetoglutárico, glicólico, cítrico y málico (Ulloa *et al.*, 2010).

La miel tiene un pH que oscila entre 3.2 y 5.5, esta propiedad es inferior a 4 en mieles de néctar y superior a 5 en las de mielada. Las mieles que presentan un bajo pH tienden a degradarse con facilidad, por lo que se deberá tener cuidados especiales para su conservación (Jean-Prost, 2007).

1.6.7 Hidroximetilfurfural

El hidroximetilfurfural o HMF, es una molécula que procede de la deshidratación de los monosacáridos, siendo la fructosa el principal. En todas las mieles se lleva a cabo lentamente esta degradación y rápidamente durante el calentamiento. Por lo que el contenido de HMF puede indicar la edad de la miel, entre más pasa el tiempo, mayor es el contenido de ésta molécula. Mundialmente se ha estipulado que la miel no debe poseer un contenido de HMF mayor a 80mg/Kg. La Unión Europea fijó la tasa máxima que es de 40mg/Kg (Jean-Prost, 2007).

1.6.8 Aroma, color y sabor de la miel

La gran variedad de aromas, colores y sabores en los diferentes tipos de miel, son dependientes de su origen botánico. El sabor tan característico de la miel es el resultado de los azúcares que contiene, es decir, una miel con un contenido de fructosa alto es más dulce que una con alta concentración de glucosa. El aroma de la miel es resultado de la cantidad de ácidos y aminoácidos. Finalmente, el color de la miel está relacionado con el contenido de minerales, polen y compuestos fenólicos, es por esta razón que varía desde extra-clara, pasando por tonos ámbar y llegando a ser casi negra; Estas últimas, por ejemplo, tienen una cantidad de fenoles alta y por ello una alta capacidad antioxidante (Ulloa *et al.*, 2010).

1.6.9 Conductividad eléctrica

El rango de conductividad eléctrica en la miel es de 0.60 y 2.17 mS/cm; La conductividad eléctrica es un parámetro que se relaciona directamente con la



concentración de sales minerales, ácidos orgánicos y proteínas, por lo que su medición es importante para determinar el origen geográfico del producto y también como una técnica indirecta para la determinación del contenido de minerales de los diferentes tipos de miel ya que es un valor que no cambia durante el almacenamiento (Ulloa *et al.*, 2010).

1.7 La miel en México y el mundo

En México, las civilizaciones mesoamericanas de lo que hoy se conoce como América, especialmente los mayas, de acuerdo con los registros en algunas edificaciones y documentos, se encargaron de cultivar abejas de los géneros *Trigona* y *Melipona* (Figura 4), como actividad económica de suma importancia (Ulloa *et al.*, 2010).



Figura 4. Petroglifo maya de una abeja *Melipona*

Fuente: Ulloa *et al.*, 2010

Posteriormente, en la época de la colonia se hizo la introducción de la abeja *Apis mellifera* en lo que hoy en día es el estado de Yucatán en México. No obstante, aunque la cría de estas abejas europeas brindaba algunas ventajas como la resistencia a enfermedades y docilidad, no fue hasta mediados del siglo XX que desplazaron a su abeja nativa para iniciar la apicultura con esta especie que en un principio rechazaron (Ulloa *et al.*, 2010).

En el año 1950, la apicultura mexicana mostró un gran desarrollo mediante las primeras exportaciones, ubicando a México en años posteriores entre los países con un índice de exportación de miel alto a nivel mundial (Ulloa *et al.*, 2010).

En México, la apicultura tiene una gran importancia ecológica y socioeconómica, ya que esta actividad se considera como una importante generadora de divisas. Esta actividad agropecuaria, en la mayoría de los casos se asocia únicamente con la



producción de miel y sus derivados, no obstante, la cría de abejas es fundamental para que el ambiente se encuentre en un estado de equilibrio mediante lo que se conoce como polinización cruzada. Este fenómeno se da cuando las abejas, al obtener su alimento de las flores fomentan la capacidad de fecundación a las plantas (SIAP, 2016).

Al año se producen más de 57 mil toneladas de miel en México. Dentro de los principales estados productores destacan Yucatán y Campeche, siendo en el primer estado producido el 40% de la miel, seguido por Campeche y Quintana Roo, con más de once mil, ocho mil y tres mil toneladas, respectivamente. Por ello es por lo que México se encuentra en el séptimo lugar como productor de miel a nivel mundial, y en el tercero como exportador (Mares, 2017 y SAGARPA, 2017).



Figura 5. Estados con mayor producción de miel

Fuente: Mares, 2017

El mercado europeo representado por Alemania y Reino Unido es un gran y fiel comprador de miel desde hace cinco décadas donde su consumo anual por persona se mide en kilogramos (contrario a México en donde el consumo anual es de apenas 200gr por persona). En el año 2016, fueron exportadas 29.1 mil toneladas con un valor de 93.7 millones de dólares (SAGARPA, 2017).



En el mundo, existen evidencias arqueológicas donde se indica que la miel se utilizó como alimento a partir del periodo Mesolítico, es decir, por los años 7000 a.C. por ejemplo, una tablilla Sumeriana (figura 6) fechada en los años 2100-2000 antes de nuestra era, que menciona el uso de la miel como estupefaciente y ungüento. Por esta razón se afirma que la miel es el producto medicinal y nutricional conocido de más antigüedad (Ulloa *et al.*, 2010).

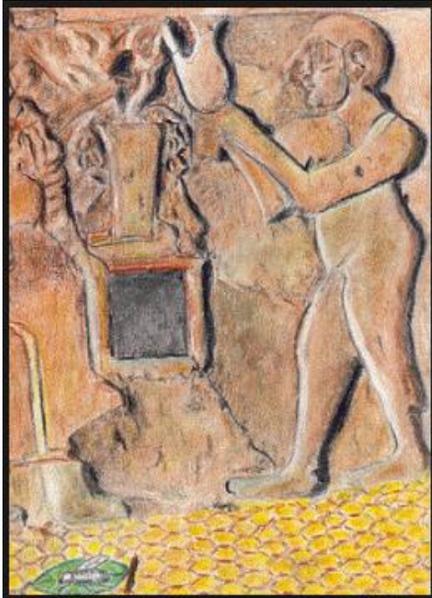


Figura 6. (Izquierda) Tablilla sumeria de los usos de la miel.

Fuente: <https://mieladictos.com/2013/12/31/la-primera-receta-con-miel-de-la-historia/>

Figura 7. (Derecha) Libro de medicina chino de 1505

Fuente: BBC Mundo, 2017.

El uso de la miel como un agente terapéutico data de tiempos muy remotos hasta nuestros días, por ejemplo, los antiguos egipcios, asirios, chinos (figura 7) y romanos utilizaron la miel combinada con otras hierbas para tratar heridas y enfermedades del intestino; Aristóteles en la Grecia antigua, declaraba que se podía aplicar producto para tratar heridas y dolor de ojos. En el año 50 d.C. Dioscórides la recomendaba para el tratamiento de quemaduras de sol, manchas en la cara y úlceras. Actualmente, en la india se sigue utilizando para tratar enfermedades de los ojos y en otras partes del mundo como terapia para piernas ulcerosas infectadas, dolor, tratamiento tópico para la rubeola y sarampión, úlceras gástricas, dolor de garganta y como antibacteriano (Ulloa *et al.*, 2010).



Hasta el siglo XIX, la miel era el único endulzador primario natural disponible, ya que su consumo fue superado por el azúcar de caña y el de remolacha, y más tarde por derivados del maíz. No obstante, el consumo de miel a nivel mundial y su producción aumenta año con año; China con un 20% y E.U. con un 14% fueron los países con mayor demanda de miel, seguidos por Turquía (6%), Alemania (5%) y Rusia (4%) en el 2015 (Avramenko, 2017 y Ulloa *et al.*, 2010).

En la siguiente tabla se detallan los países que exportaron máximos valores de miel durante el año 2015, de acuerdo con un estudio de mercado de miel, realizado por el Ministerio de Relaciones Exteriores y Culto del Consulado General de la República Argentina en 2017.

Tabla 3. Países exportadores de miel

País	Millones de US\$	% de las exportaciones totales de miel
China	288.7	12.3
Nueva Zelanda	199.3	8.5
Argentina	163.6	7
México	156	6.6
Alemania	139.4	5.9
India	121.7	5.2
Vietnam	111.4	4.7
España	101.5	----
Ucrania	95.9	4.1
Bélgica	83.4	3.5

Fuente: Elaboración propia con datos del Consulado General de la República Argentina (2017)

Dentro de las principales firmas exportadoras de miel del mundo, según el Consulado General de la República Argentina (2017), se encuentran:

- ⇒ Capilano Honey Ltd. (Australia)
- ⇒ Caprilush Internacional (México)
- ⇒ Duc Cuong Phat Company Limited (Vietnam)
- ⇒ Dutch Golld Honey (Estados Unidos)
- ⇒ Groeb Farms, Inc (Estados Unidos)
- ⇒ Navrang SL (España)
- ⇒ Nuxten Health Ltd. (Nueva Zelada)
- ⇒ Rowse Honey Ltd. (Reino Unido)
- ⇒ Zanchetta Alimentos LTDA. (Brasil)
- ⇒ Zhejiang Jiangshan Bee Enterprise Co, Ltd. (China)
- ⇒ Bee Honey (Vietnam)



- ⇒ Miel Mex (México)
- ⇒ Miel del Mayab (México)

De acuerdo con la revista del sector: *Bee Culture Magazine*, el 80% del consumo de la miel en Estados Unidos durante el 2016 fue importado; Los diez principales exportadores de miel a este país fueron: Argentina, Brasil, Vietnam, India, Canadá, Ucrania, Australia, Nueva Zelanda, México y Tailandia (Consulado General de la República Argentina, 2017).

1.8 Calidad de la miel

Para asegurar la calidad de la miel existen dos parámetros de suma importancia, la ausencia de contaminantes -es decir, de antibióticos, pesticidas y metales pesados-, y la frescura de la miel. Los índices para medir la frescura de este alimento mayormente utilizados son: el HMF (5-hidrometil furfural) y la actividad diastásica. El primero es un aldehído cíclico que tiene su origen de manera espontánea y lenta al tener fructosa en un medio ácido; cuando la miel se encuentra almacenada a temperaturas máximas de 30°C el aumento del HMF es de 1mg/Kg, y según algunas comisiones internacionales el contenido máximo de HMF debe ser de 40mg/Kg, a excepción de las mieles de origen tropical en las cuales es admitido un máximo de 80mg/Kg (Ulloa *et al.*, 2010).

No obstante, algunos países como E.U, Australia y Nueva Zelanda no consideran el parámetro anterior para evaluar la calidad de la miel. Por otro lado, la diastasa es una enzima que se puede encontrar en todas las mieles frescas y que durante el almacenamiento o calentamiento disminuye; Como valores máximo y mínimo de diastasa se tienen ocho y tres respectivamente (Ulloa *et al.*, 2010).

Los parámetros de calidad según la normatividad en México, de acuerdo con la Norma Mexicana de Miel NMX-F-036-NORMEX-2006 alimentos-miel-especificaciones y métodos de prueba, el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones, el Codex Alimentarius (FAO, 2001) y la Directiva 2001/110/CE del consejo de 20 de Diciembre de 2001 relativa a la miel de la Unión Europea, se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Parámetros de calidad de la miel

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido	63.88	-
Contenido de sacarosa % (g/100g)	-	5.00
Contenido de glucosa % (g/100g)	-	38.00
Humedad % (g/100g)	-	20.00
Sólidos insolubles en agua % (g/100g)	-	0.30
Cenizas % (g/100g)	-	0.60
Acidez expresada como miliequivalentes de ácido/Kg	-	40.00



Parámetros de calidad en la miel. (Continuación)		
Especificaciones	Mínimo	Máximo
HMF expresado en mg/Kg en miel envasada de más de 6 meses	-	80.00
HMF expresado en mg/Kg en miel envasada de menos de 6 meses	-	40.00
Índice de diastasa**		8.0

Fuente: Elaboración propia con datos de la Norma Oficial Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006. Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba (2006).

** Para las mieles con bajo contenido enzimático, el índice mínimo de diastasa en la escala de Gothe será de 3.0 siempre y cuando no exceda en el contenido en HMF de 15 mg/kg.

Además de los parámetros anteriormente mencionados, para considerar que una miel tiene buena calidad no deberá contener ningún ingrediente adicional como aditivos u otros alimentos que no sean miel, tampoco materia, olores, sabores o manchas extrañas. De igual manera no debe presentar indicios de que ha empezado a fermentar, ni calentarse o modificarse de tal manera que su composición inicial sea de menor calidad ni utilizar tratamientos químicos o bioquímicos para influir en la cristalización de la miel (FAO, 2001).

Igualmente, de acuerdo con la norma para la miel del Codex Alimentarius que presenta la FAO (2001), la miel deberá estar exenta de metales pesados, plaguicidas y medicamentos veterinarios en cantidades que puedan constituir un peligro para la salud de los consumidores.

1.9 ¿Qué es una adulteración y un adulterante en alimentos?

Un alimento denominado adulterado es aquel al que, con fines fraudulentos y de forma premeditada, se le ha adicionado, quitado o sustituido alguna sustancia. Se modifican para cambiar su composición, peso o volumen, para encubrir algún defecto, o bien cuando se realiza la sustitución parcial o total de un ingrediente por otro de menor calidad y/o valor (Beltrán, 2016 y Castro, 2017).

Las formas más comunes de adulteración son mediante: mejoras no autorizadas, encubrimiento, falsificación, sustitución, dilución y etiquetado fraudulento. Las adulteraciones en alimentos se llevan a cabo con la finalidad de engañar al consumidor, ofreciéndole un producto manipulado de manera incorrecta para beneficios económicos (Castro, 2017 y Herman, 2013).

Además de constituir un fraude de tipo económico, es importante resaltar que las adulteraciones suponen un riesgo grave para la salud de los consumidores, debido a que el alimento podría contener sustancias nocivas o generarlas al cambiar su composición de forma inesperada. De igual manera, los elementos alergénicos no



declarados en un alimento representan un peligro al consumidor sensible (Pelayo, 2011).

Por otra parte, un adulterante se denomina como la sustancia que se añade a un producto sin hacer mención de esta como ingrediente, o sustancia que se introduce en un producto accidentalmente mientras se elabora; pueden estar en alimentos, medicamentos y otros productos. Los adulterantes pueden hacer que un producto sea peligroso, más barato o no funcionar como debiera (Instituto Nacional del Cáncer, 2017).

Las sustancias adulterantes comúnmente utilizadas en alimentos son: productos farmacéuticos no permitidos o utilizados en proporciones superiores a los límites de tolerancia, aditivos o colorantes no permitidos, ingredientes de menor calidad o no permitidos para sustituir los originales y dioxinas como los bifenilos policlorados, Policlorodibenzodioxinas o Policlorodibenzofuranos (Beltrán, 2016).

1.10 Legislación

Alrededor del mundo existen diversas leyes y normas para la regulación de los alimentos, las cuales en la mayoría de los casos sirven para prevenir adulteraciones e informar a los consumidores. A continuación, se mencionarán algunas de ellas de diferentes países.

En México, La LEY GENERAL DE SALUD (2017) en su artículo 464, indica que:

“A quien, aduldere, falsifique, contamine, altere o permita la adulteración, falsificación, contaminación o alteración de alimentos, bebidas no alcohólicas, bebidas alcohólicas o cualquier otra sustancia o producto de uso o consumo humano, con peligro para la salud, se le aplicará de uno a nueve años de prisión y multa equivalente de cien a mil días de salario mínimo general vigente en la zona económica de que se trate.”

En Estados Unidos, la norma definitiva de la Ley de Modernización de la Seguridad en los Alimentos (FSMA, por sus siglas en inglés), de la Food and Drug Administration (FDA), está encaminada a prevenir la adulteración deliberada con la finalidad de causar daños a gran escala a la salud pública, en los que se incluyen los actos terroristas dirigidos al suministro de alimentos que, aunque no es probable que ocurran, pueden ser causantes de enfermedades, muerte y perturbación económica (FDA, 2013).

Para el caso específico de la miel en Estados Unidos, la FDA tiene como propuesta una guía llamada *“La declaración de azúcares añadidos en miel, jarabe de maple y algunos productos de arándano: Guía para la industria”* (*“The Declaration of Added Sugars on Honey, Maple Syrup, and Certain Cranberry Products: Guidance for*



Industry”), la cual tiene como propósito aconsejar a los manufactureros su intención de ejercer la aplicación en las etiquetas del símbolo "†" inmediatamente después de la información del porcentaje de azúcares agregados sobre ciertos alimentos (FDA, 2018).

Dicho símbolo llevaría al consumidor a declaraciones veraces y no engañosas fuera de la etiqueta de información nutricional con la finalidad de proporcionar información adicional sobre los azúcares agregados presentes en los alimentos mencionados en el título (FDA, 2018).

En México, la Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006. Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba (2006) y la NORMA Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria (2009), establecen las características para que la miel se considere un producto no adulterado y también las especificaciones de su envasado. En la primera se indica que el envasado de la miel debe llevarse a cabo en un material no tóxico, resistente e inocuo que garantice la estabilidad del producto, que evite su contaminación y no altere su calidad; Y en el caso de embalaje se deben utilizar cajas de cartón o de algún otro material apropiado que sea resistentes y que ofrezca la protección adecuada a los envases, impidiendo así su deterioro y que a su vez faciliten la manipulación al almacenar y distribuir el producto sin exponer a las personas que lo manipulan.

En la segunda se decreta que la información del etiquetado de los alimentos debe ser veraz y no presentarse o describirse de tal manera que induzca a error al consumidor respecto a la naturaleza o características del producto, es decir, que no use palabras, textos, diálogos, ilustraciones, imágenes, denominaciones de origen y otras descripciones que se refieran o sugieran, directa o indirectamente a cualquier otro producto con el que pueda confundirse, o que pueda inducir al consumidor a suponer que el alimento se relaciona en forma alguna con aquel otro producto. Y en el caso de que el producto alimenticio haya sufrido algún tipo de tratamiento, puede indicarse el nombre de éste, exceptuando aquellos que sean de carácter obligatorio como lo son todos los tipos de sacarosa y la dextrosa anhidra y la dextrosa monohidratada. De igual manera, declara que deben declararse todos los ingredientes o aditivos que causen hipersensibilidad, intolerancia o alergia.

Y finalmente, en la legislación inglesa “*The Honey Regulations 2003. Guidance Notes*” (2005) tiene como propósito mantener la pureza de la miel ya que es percibida por los consumidores como un producto 100% natural con ninguna sustancia añadida o extraída. Al igual que las normas mexicanas, esta guía regula el correcto etiquetado para las mieles comercializadas en el país, declarando que la miel sólo puede etiquetarse como tal si no presenta ninguna adulteración y que es necesario especificar si contiene ingredientes ajenos a ella, de igual manera, indica que cualquier violación a



las indicaciones estipuladas en ella tienen como consecuencia una multa de £5,000 (The Honey Regulations 2003. Guidance Notes, 2005).

1.11 Adulterantes de la miel

La miel como producto con un alto valor nutritivo y comercial, es un material sumamente vulnerable a adulteraciones debido a su alto precio en comparación con otros endulzantes o edulcorantes (Andrade *et al.*, 2016).

La adulteración de la miel puede ser de dos maneras, la primera denominada accidental, la cual puede deberse a un almacenaje incorrecto, altas temperaturas, condiciones higiénicas inadecuadas o exceso de alimentación no natural, lo cual provocaría alteraciones en su composición y propiedades (Rico y Cáceres, 2017).

Por otro lado, la adulteración intencionada se lleva a cabo mediante la adición de soluciones azucaradas con la finalidad de disminuir el costo y aumentar el volumen de la miel de forma fraudulenta, que resultan mucho más económicas, por ejemplo, sacarosa, fructosa, azúcar de caña, jarabe de maíz, o bien por alimentar a las abejas en exceso con azúcar u otros sustitutos artificiales durante el flujo del néctar (Andrade *et al.*, 2016; Cavero, 2016 y Rico y Cáceres, 2017).

También puede ser adulterada cuando se elimina el polen para evitar el reconocimiento de la procedencia del producto mediante calor y filtración. Un ejemplo de esta forma de adulterar es muy común en la miel procedente de China, en donde una vez refinada es imposible saber que la miel es de dicha procedencia y puede ser comprada a través de un tercer país que pudiese adoptarla y comercializarla como propia, ocultando su verdadera procedencia y evadiendo pruebas de control de calidad como la presencia de antibióticos o metales pesados (Rico y Cáceres, 2017).

Durante los últimos años, la detección de adulteración en la miel ha representado un gran reto ya que existen adulteraciones tan sofisticadas que el producto resultante puede llegar a ser químicamente muy similar a la miel, por no presentar aumento en la glucosa o sacarosa. Por lo que se tienen diversas técnicas para su detección (Cavero, 2015 y Revista del consumidor, 2015).

1.12 Métodos de detección de adulteraciones en la miel

El químico alemán Frederick Accum en el año de 1820, se encargó de alertar a la sociedad de esos tiempos acerca de la adulteración de alimentos, mediante su libro titulado "*Treatise on Adulteration of Food and Culinary Poisons*", siendo este el parteaguas para captar la atención de otros químicos y científicos para desarrollar métodos de prueba para detectar posibles adulteraciones en los alimentos (SAGARPA, 2011).



Gracias a este precursor, actualmente se pueden encontrar diversos organismos a nivel mundial cuyo trabajo es brindar apoyo y detectar las diferentes adulteraciones que pueden presentarse en alimentos como lo son la FDA en Estados Unidos y la PROFECO Y COFEPRIS en México. Dichos organismos han recomendado el uso de técnicas altamente especializadas para investigar las posibles adulteraciones en los productos alimenticios (SAGARPA, 2011).

En el siglo XX, en las décadas de los 50's, 60's y 70's se desarrollaron técnicas como 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 para la detección de alimentos adulterados. Próximamente en los años 90's estas técnicas se fueron actualizando y mejorando para obtener resultados más certeros y también hacerlas más fáciles de utilizar (SAGARPA, 2011).

Como se ha mencionado con anterioridad, hoy en día, detectar adulteraciones en los alimentos resulta ser un trabajo complicado, pero no imposible, ya que dichos alimentos suelen tener una composición química muy parecida a la del producto auténtico. Es por esta razón que los métodos analíticos modernos para detectar adulteraciones juegan un papel fundamental (SAGARPA, 2011).

Para la determinación de las características de autenticación de la miel existen varios métodos, uno de los más utilizados es el análisis de isótopos de carbono, cuyo principio se encuentra basado en las diferencias entre la relación carbono 13 y carbono 12 de las plantas C4 que proceden de las plantas monocotiledóneas del azúcar de caña y maíz. Esta relación indica la forma en que las plantas fijan y utilizan el bióxido de carbono, siendo así las plantas C3 las principales proveedoras del néctar de las abejas y las C4 son las que se encargan de producir los jarabes de azúcar (Rico y Cáceres, 2017).

Hay un acuerdo general en el que se estipula que la diferencia entre el valor del $\delta^{13}C$ (delta del carbono 13) de la proteína y la miel no debe ser superior al 1%, de ser así, entonces se considerará que la miel está adulterada en un 7%. De igual manera, este mismo valor deberá ser más negativo que 23.5% para ser clasificado como puro (Rico y Cáceres, 2017).

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-F-416-S-1982. Productos alimenticios para uso humano miel de abeja. Métodos de prueba (1982), se puede determinar si una miel es auténtica, mediante la realización de diversas pruebas fisicoquímicas; cómo lo son: La determinación del contenido de humedad, determinación de glucosa y sacarosa, determinación de acidez, determinación de cenizas (sustancias minerales), determinación de dextrinas y la determinación de HMF.



Además de las técnicas anteriormente mencionadas para detectar posibles adulteraciones en la miel se encuentran la espectroscopía de infrarrojo cercano, el análisis electroquímico, resonancia magnética nuclear e inclusive métodos genéticos como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (Andrade *et al.*, 2016).

1.13 Reacción en cadena de la polimerasa

Hace algunos años, dentro del estudio de ácidos nucleicos existió la problemática de la poca disponibilidad de muestras y la baja concentración en la que éstas se llegaban a encontrar, lo que hacía complicado en muchos casos su estudio. Afortunadamente, estos conflictos pudieron ser solventados mediante la aplicación de conocimientos en bioquímica y del uso de enzimas en el laboratorio (Roca, Oliver y Rodríguez, 2003).

Como se sabe, la célula necesita duplicar todo su material genético para poder dividirse, así pues, cada una de las células hijas recibe una copia exacta del ADN de su progenitora. La incorporación de nucleótidos a cada una de las cadenas que conforman el ADN genómico se cataliza mediante la ADN polimerasa en un proceso *In vivo*. Gracias al conocimiento de este proceso de replicación fue posible desarrollar técnicas *in vitro* que han permitido sintetizar cadenas de ADN complementarias a un ADN molde (Roca *et al.*, 2003).

Estos métodos que utilizaban el ADN recombinante se desarrollaron a principios de la década de los 70, y en los siguientes años revolucionaron la manera en que los genéticos y los biólogos moleculares dirigían las investigaciones, principalmente con la implementación de la PCR (Klug y Cummings, 1999).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, fue ideada en 1985 por Karry B. Mullis, un investigador de la *Cetus Corporation*, en Emerville, California. En 1989, *Science* seleccionó a la PCR como el principal desarrollo científico y a la TAQ polimerasa como la molécula del año. Y finalmente en el año de 1993, Mullis ganó el premio Nobel de química, considerando a la PCR como un aporte muy importante para el desarrollo de la biología molecular (Pedrosa, 1999 y Pinilla, Cubillos y Rodríguez, 2008).

1.13.1 Fundamento y características de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro*, que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, en los que esta secuencia denominada secuencia blanco es fielmente copiada, sin la necesidad de hacer uso de células vivas durante el proceso de clonación (Gardner *et al.*, 2017 y Tamay de Dios, *et al.*, 2013).

Básicamente, la idea de la técnica es sintetizar muchas veces un fragmento de ADN, utilizando una ADN polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, debido a que para conseguir la amplificación se hace uso de cebadores que hibridan con



los extremos a partir de los cuales actúa la ADN polimerasa (Espinosa, 2007 y Jiménez y Espino, 2013).

Esta técnica es muy simple y puede realizarse siempre y cuando se conozca al menos la secuencia de los flancos del segmento de ADN que se desea clonar, partiendo de homogenados, extractos crudos de tejido, sangre completa, mezclas de fragmentos de ADN obtenidos con enzimas de restricción, muestras resultantes de extracción y aislamiento de ADN, etcétera (Luque y Herráez, 2001 y Nelson y Cox, 2009).

Con el paso del tiempo esta técnica fue perfeccionada, dando lugar a dos importantes innovaciones clave que facilitaron su uso. La primera de ellas fue el descubrimiento de una ADN polimerasa estable a las altas temperaturas a las que se lleva a cabo el proceso de la PCR, denominada como TAQ polimerasa, ya que se obtiene de una bacteria con el nombre de *Thermus aquaticus*, que vive en manantiales de aguas calientes del Parque Nacional Yellowstone. Esta enzima, comparada con la que se utilizaba originalmente, proveniente de la bacteria *E. Coli*, no se desnaturaliza a temperaturas superiores a los 90°C, por el contrario, presenta una gran estabilidad y puede agregarse a la mezcla de reacción al principio de los ciclos de la PCR y continuará actuando durante muchos ciclos más (Pierce, Morando y López, 2016).

Y la segunda fue el desarrollo de cicladores térmicos automatizados, los cuales son aparatos que generan los cambios de temperatura necesarios para cada una de las etapas de la PCR. En las primeras experimentaciones, los tubos que contenían la mezcla de reacción se movían manualmente entre baños de agua a diferentes temperaturas para las tres etapas de cada ciclo. Posteriormente, Mullis y Faloona desarrollaron el primer dispositivo automático regulador de temperatura en ciclos llamado termociclador. En estos, los tubos de reacción se colocan en un bloque metálico que cambia de temperatura con rapidez según un programa computarizado (Paz y Miño y López, 2014 y Pierce, *et. al*, 2016).

Algunas características de ésta reacción, de acuerdo con Luque y Herráez, (2001) son:

- Rendimiento: Debido a que los productos de cada ciclo sirven de molde para el siguiente, la acumulación de copias es de manera exponencial. Por lo que el rendimiento en cada etapa es elevado. El número de copias al final de los ciclos puede ser calculado con ayuda de la siguiente ecuación:

$$N = N_0 (1+R)^x$$

Donde:

- N= número de copias obtenidas
- N₀= número de moléculas iniciales



- R= rendimiento de cada ciclo (generalmente de 70% a 85%, expresado en tanto por uno 0.70-0.85)
- X= número de ciclos
- Duración: La duración de cada etapa y de cada uno de los ciclos son dependientes de la secuencia que se desea amplificar, por lo que, en muchos casos, su determinación se hace de forma empírica.
- Especificidad: En la reacción, esta característica es muy elevada, y se encuentra determinada especialmente por la secuencia de primers y por las condiciones de la segunda etapa del proceso. La especificidad puede determinarse analizando los productos de la PCR mediante la técnica de electroforesis.
- Capacidad de detección: También llamada sensibilidad, es de igual manera muy alta, por lo que es capaz de detectar una única molécula de ADN de casi cualquier tipo de muestra. No obstante, también supone un riesgo elevado de contaminación por moléculas de origen ajeno a la muestra.
- Fidelidad: Es la capacidad de copiar secuencias con precisión sin introducir mutaciones, es decir, cambios en la secuencia de nucleótidos. Esta característica es dependiente -en su mayoría- de la ADN polimerasa que se utiliza en la reacción.

1.13.1.1 Elementos de la PCR

Los elementos más significativos en la reacción son el ADN molde -también llamado ADN templado, ADN diana o secuencia diana-, la enzima ADN polimerasa (Taq polimerasa), los oligonucleótidos (primers o cebadores), los dNTP's, es decir los desoxirribonucleótidos trifosfatados de adenina, timina, citosina y guanina, el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y agua preferentemente libre de nucleasas (enzimas que degradan ácidos nucleicos) (Tamayo de Dios *et al.*, 2013).

Todos estos elementos interactúan en las tres etapas del proceso y cumplen funciones específicas. A continuación, se explicarán cada uno de estos:

- ADN molde, ADN diana o ADN blanco: Es el elemento principal en la PCR, ya que contiene el segmento que se desea amplificar. Para entender de mejor manera su importancia, es relevante recordar que la molécula del ADN está constituida por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y alguna de las 4 bases nitrogenadas -adenina, timina, guanina o citosina- que es complementaria con la base de otra cadena, lo cual hace que la estructura del ADN sea en forma de doble hélice (ver figura 8). La complementariedad entre las bases se da gracias a puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, lo que a su vez provoca que la



doble hélice sea estable. Y finalmente, los grupos fosfatos son los que se encargan de darle carga negativa (Nelson y Cox, 2009 y Tamay de Dios, *et. al*, 2013).

- ADN polimerasa: Es un catalizador de la reacción que se encarga de dirigir la síntesis de las hebras complementarias, que llevan la secuencia de interés. La enzima utilizada con mayor frecuencia es la taq polimerasa, ya que como se ha mencionado anteriormente funciona a temperaturas elevadas impidiendo la formación de híbridos parcialmente desapareados y contribuye a la especificidad y rendimiento del proceso, aunque también hay otras enzimas como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis* (Luque y Herráez, 2001; Tamay de Dios *et al*, 2013 y Voet y Voet, 2006).
- Primers, iniciadores o cebadores: Se trata de dos (o más) oligonucleótidos sintéticos, específicos y complementarios a los extremos 3' del segmento del ADN de interés. Uno de éstos primers hibrida con una de las dos cadenas de la doble hélice de la molécula de ADN, y el otro con la otra cadena, delimitando así la región de ADN que se desea copiar y permitiendo así que la ADN polimerasa inicie la síntesis de ADN entrelazando los diferentes desoxirribonucleicos (Roca, *et. al*, 2003 y Lodish, *et. al*, 2005).
- dNTP's: Son las bases nitrogenadas con las que la ADN polimerasa construye nuevas cadenas de ADN y de suma importancia ya que contribuyen a la especificidad de la reacción, es por esta razón que su concentración sea la adecuada (0.2 a 1 mM) o de lo contrario podría afectar la función de la ADN polimerasa (Tamay de Dios *et al*, 2013).
- Buffer: Funciona como solución amortiguadora utilizada en la reacción y por lo general está compuesta por Tris-HCL de pH=8, cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. Sin embargo, también se utilizan otros buffers de diferente composición que son fáciles de adquirir en el mercado (Tamay de Dios *et al*, 2013).
- Magnesio: Es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por lo que debe mantenerse en la concentración adecuada - entre 0.5 y 2.5mM- con la finalidad de no afectar negativamente el rendimiento de la ADN polimerasa. En algunos casos es incluido con el buffer y en algunos otros se tiene que agregar (Tamay de Dios *et al*, 2013).

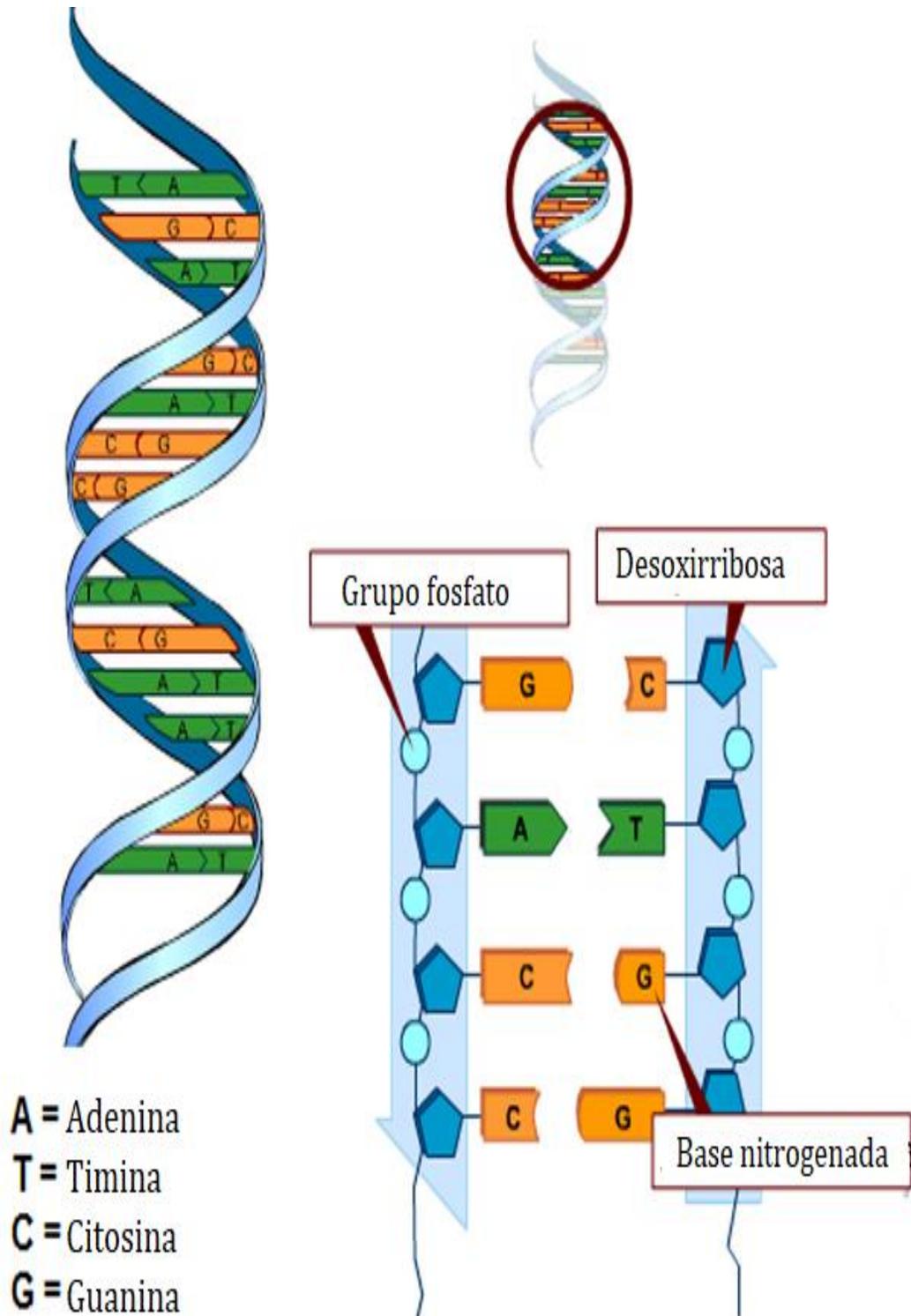


Figura 8. Molécula de ADN

Fuente: <http://www.pausaparanerdices.com/wp-content/uploads/2016/07/Microsoft-grava-arquivo-em-DNA3.jpg>



1.13.1.2 Diseño de primers

El diseño de primers es un punto clave para la técnica de PCR, ya que de ello depende su especificidad y rendimiento. Estos deben diseñarse a partir del conocimiento de la secuencia de interés que se desea amplificar (Roca *et al.*, 2003).

Su tamaño debe oscilar entre los 15-25 pares de bases y se eligen de manera que se evite la complementariedad de bases entre los propios primers o entre éstos y secuencias de ADN de regiones distintas a la que se quiere estudiar, por lo que es importante que la cantidad de G-C no sea de más del 55% de la secuencia, ya que existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers -o sea, productos inespecíficos- (Roca *et al.*, 2003 y Tamay, de Dios *et al.*, 2013).

Otro aspecto fundamental en el diseño de los primers es el valor de su temperatura de fusión T_m (por sus siglas en inglés *melting temperature*), ya que sirve de referencia para fijar una temperatura para la segunda etapa de la PCR (hibridación o *annealing*). Es por ello por lo que, en medida de lo posible se deberán elegir primers que presente cuyos valores de T_m sean similares entre sí (Roca *et al.*, 2003).

Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una llamada *forward*, frontal o sentido y otra con el nombre de *reverse*, reverso o antisentido; ambas deben diseñarse de tal manera que hibriden con la secuencia de ADN de interés y sus cadenas puedan ser extendidas por la ADN polimerasa en dirección 5'→3' (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Actualmente existen programas informáticos que se encargan de diseñar primers con alta especificidad e inclusive existen laboratorios de biología molecular dedicados a diseñarlos, sintetizarlos y validarlos, facilitando el trabajo al usuario (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

1.13.1.3 Etapas de la PCR

Cuando se hace la reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, pero dentro de un tubo, el cual debe someterse a diferentes cambios de temperatura altos y bajos con ayuda de un termociclador (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Típicamente, durante este proceso se hacen presentes tres etapas (ver figura 9) en cada uno de los ciclos, que se explicarán a continuación:

- 1) La primera etapa recibe el nombre de desnaturalización o disociación, en esta etapa la doble hélice del ADN se separa mediante desnaturalización térmica, con la finalidad de romper los puentes de hidrógeno entre las cadenas para que así se produzcan los moldes monocatenarios necesarios. Mediante una incubación breve de 3 a 5 minutos a una temperatura de 94 a 96°C. El tiempo depende del ADN molde, es decir, si la cantidad de Guanina/Citosina es alta, se necesitará mayor tiempo para



romper sus uniones ya que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que en el caso de la Adenina/Timina. Y sólo se realiza una vez ya que en las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción, el ADN molde no vuelve a renaturalizarse por completo (Jiménez y Espino, 2013; Paz y Miño y López, 2014; Pierce *et al.*, 2016; Roca *et al.*, 2003; Tamay de Dios *et al.*, 2013 y Voet y Voet, 2006).

- 2) La segunda etapa es la del alineamiento, también conocido como hibridación, anillamiento, templado o apareamiento. En esta fase la temperatura del medio disminuye para que pueda darse la unión de los primers a las cadenas simples del ADN, en un tiempo que oscila entre los 20 y 40 segundos, mediante el alineamiento de los cebadores al extremo 3' de estas cadenas. Para que se forme el complejo ADN-primers, es de vital importancia que la temperatura sea óptima. La temperatura de la fase se determina según las características del diseño de los primers, la cual puede estar entre los 50-60°C. La temperatura es seleccionada de tal manera que el procedimiento adquiera el máximo de especificidad y sensibilidad. Siendo las bajas temperaturas proveedoras de alta sensibilidad, es decir, favorece la unión entre los primers y el ADN pero la especificidad disminuye y podrían darse más uniones erróneas; por el contrario, cuando la temperatura es alta, la sensibilidad disminuye y la especificidad aumenta. Por lo tanto, si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad de esta etapa serán eficientes (Roca *et al.*, 2003 y Tamay de Dios *et al.*, 2013).
- 3) Por último, la tercera etapa se denomina como extensión, elongación, replicación o polimerización, en esta fase la temperatura del medio se incrementa hasta alcanzar la temperatura a la que la ADN polimerasa puede funcionar; en el caso de la taq polimerasa esta temperatura es de 72°C. El tiempo de esta etapa es dependiente del número de fragmentos que se desea amplificar, por ejemplo, en 20 segundos se amplifican fragmentos de 500 pares de bases y en 40 segundos se amplifican más de 1.2 kilobases; siendo el promedio de 30 a 90 segundos. La replicación transcurre en dirección 5'→3' a partir del extremo 3'-OH de cada primer, empleando como sustrato a los dNTP's hasta terminar la lectura del ADN molde o hasta que un nuevo ciclo inicie (Luque y Herráez, 2001; Pedrosa, 1999 y Roca *et al.*, 2003).

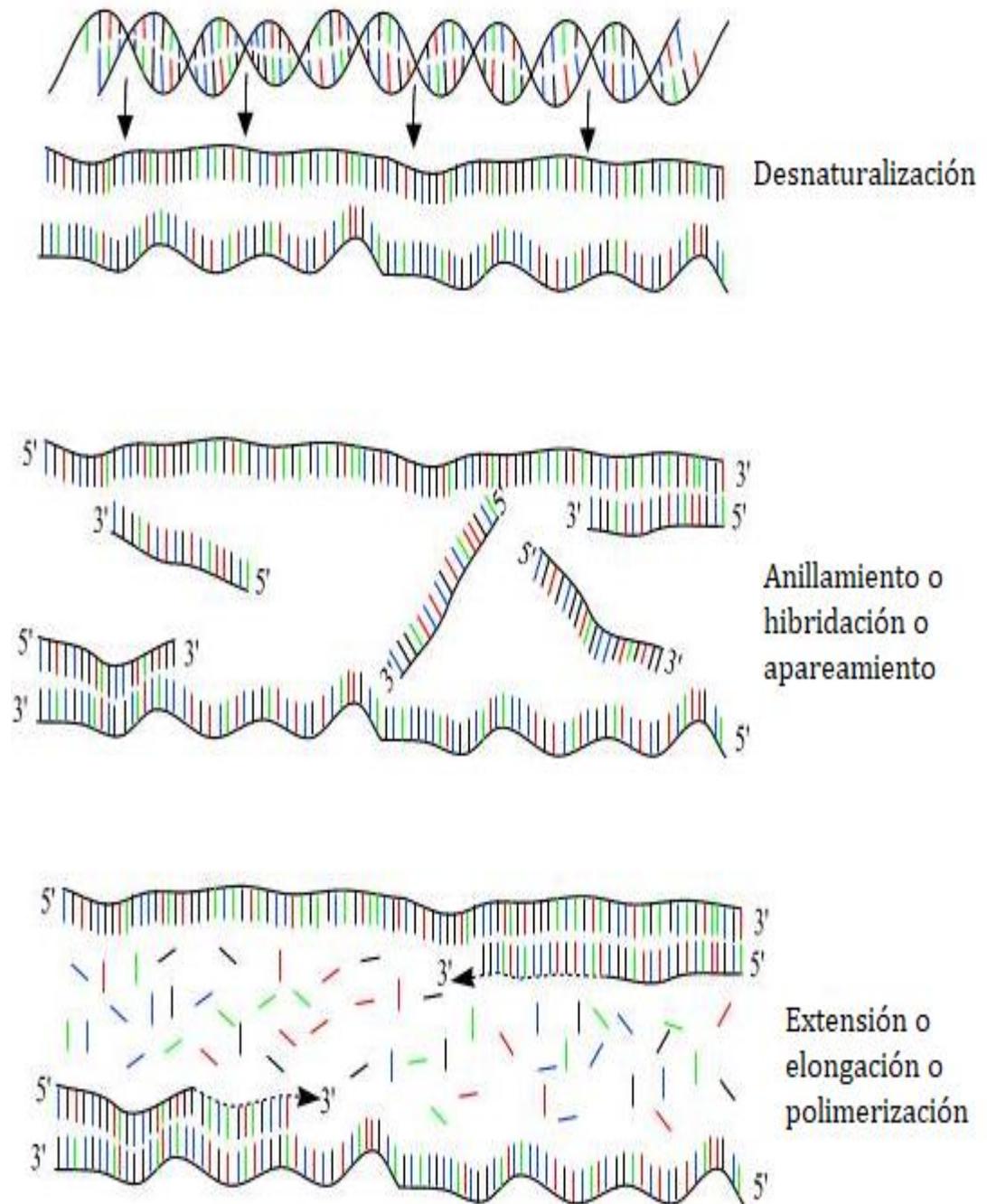


Figura 9. Etapas de la PCR
Fuente: Andy Vierstraete, 1999.

El ciclo siguiente comenzará en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción anterior, el único cambio que ocurre es que en lugar de haber una cadena sencilla de ADN molde, hay dos (Pedrosa, 1999).



1.13.1.4 Tipos de PCR

Existen algunas variantes de la PCR convencional -o PCR punto final- como es el caso de la:

- PCR inversa: La cual se utiliza para clonar regiones no conocidas de ADN, situadas en posición vecinal a alguna secuencia conocida. Dicho de otra forma, en lugar de amplificar la región interna, flanqueada por los dos iniciadores, como en el caso de la PCR convencional, se amplifica la región externa. Por lo cual es necesario cortar el ADN a ambos lados de la región de interés con una enzima de restricción y así los extremos cohesivos puedan hibridar entre sí, formando una molécula circular. Esta molécula es encerrada por una ligasa y entonces se realiza la PCR con cebadores que hibridan los extremos 5' de la secuencia conocida, por lo que la elongación se extenderá alrededor del círculo generando copias de ADN (Pinilla *et al.*, 2008).
- PCR anidada (Nested-PCR): Se emplea cuando se desea incrementar la especificidad al realizarse una segunda PCR, con dos iniciadores nuevos que hibridan dentro del fragmento de interés amplificado en la primera reacción y permitiendo la obtención de productos de PCR más cortos y específicos (Pinilla *et al.*, 2008).
- PCR con adaptadores: Es útil cuando se desconoce una secuencia, permite amplificar una región del ADN, ligando a fragmentos de restricción, secuencias adaptadoras, es decir, oligonucleótidos sintéticos con extremos cohesivos compatibles con los generados en la muestra. Estos iniciadores son específicos para las secuencias 3' de los adaptadores, logrando la amplificación del conjunto de adaptadores y la secuencia diana (Pinilla *et al.*, 2008).
- PCR asimétrica: Es la variante más sencilla de todas, consiste en generar copias de hebra sencilla de un ADN, donde se añaden diferentes concentraciones de ambos iniciadores, de manera que, tras los primeros ciclos de la PCR, uno de ellos se agota y deja disponible suficientes copias del ADN diana. Sólo que una de sus hebras continúa amplificando gracias al iniciador más abundante (Pinilla *et al.*, 2008).
- PCR Larga (L-PCR): Tiene como objetivo superar los límites de la PCR convencional para amplificar fielmente regiones de gran tamaño (entre 5 y 40kb), para ser utilizada en la amplificación de genomas virales, intrones, ADN mitocondrial y grupos de genes (Pinilla *et al.*, 2008).
- PCR múltiplex: Se emplea para detectar e identificar simultáneamente distintos genes de interés. Las reacciones de PCR ocurren al mismo tiempo y en un mismo tubo, amplificando de esta manera diferentes



secuencias diana, para lo cual se utilizan varias parejas de iniciadores (Pinilla *et al.*, 2008).

- PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR): Se puede utilizar para la amplificación y detección de la expresión de genes específicos o almacenaje de ADNc, a partir de un ARN diana y mediante la transcripción reversa del ARN a ADNc (Pinilla *et al.*, 2008).

1.13.1.5 Ventajas y desventajas

La reacción en cadena de la polimerasa ha revolucionado de manera muy significativa la biología molecular, siendo hoy en día una de las técnicas moleculares más utilizadas, debido a que presenta varias ventajas como: ser un procedimiento extremadamente eficaz y rápido, ya que en terminos de algunas horas, sin hacer uso de células vivas durante el proceso, amplifica fragmentos en cuestión de horas, cuando con otras técnicas este procedimiento llevaría días o semanas (Gardner *et al.*, 2017; Pierce *et al.*, 2016 y Voet y Voet, 2006).

Se ha comprobado que la PCR es capaz de amplificar un ADN que está presente una única vez en una muestra de 10^5 células, lo cual demuestra que el método puede usarse sin purificación previa del ADN. Lo cual es de gran ayuda para los científicos al obtener datos definitivos y confiables de la estructura de genes y secuencias de ADN aún cuando solo existan muy pequeñas cantidades de material genético (Gardner *et al.*, 2017 y Voet y Voet, 2006).

Otra ventaja es que su automatización es sencilla y de bajo costo, además de que su rendimiento, especificidad, capacidad de detección y fidelidad son muy elevadas. Por estas razones esta técnica ha sustituido a otras en la amplificación de secuencias de ADN específicas (Luque y Herráez, 2001 y Voet y Voet, 2006).

A pesar de que hoy en día la PCR suele utilizarse en lugar de la clonación de genes, tiene algunas limitaciones que son importantes de considerar. Primeramente es importante recalcar que la PCR requiere el conocimiento previo de por lo menos parte de la secuencia de interés para realizar el diseño de primers (Pierce *et al.*, 2016).

En segundo lugar la capacidad de ésta técnica para amplificar cantidades tan pequeñas, determina que la contaminación al momento de llevarla a cabo sea un problema significativo. Por lo que cantidades diminutas de ADN del manipulador o en el agua, podrían ser amplificadas con el ADN de interés. Es por ello que también se requieren técnicas de laboratorio meticulosas para evitar este riesgo (Pierce *et al.*, 2016).

La tercera limitante es la exactitud de la taq polimerasa, ya que esta a diferencia de otras polimerasas, no tiene capacidad de corrección, lo que provoca que a



condiciones estándares de la reacción, incorpore un nucleótido incorrecto una vez cada 20, 000 pares de bases (Pierce *et al.*, 2016).

Otra limitante que tiene que ver con la taq polimerasa dentro de éste proceso es que los fragmentos que puede amplificar suelen ser menores a 2000pb. Aunque, podría ser mayor con la adición de una ADN polimerasa con capacidad de corrección y la modificación de las condiciones de la reacción. Investigadores han logrado extender la amplificación de la PCR a fragmentos más grandes, sin embargo aún estos se limitan a 50,000pb o menos (Pierce *et al.*, 2016).

1.13.1.6 Aplicaciones

Las aplicaciones de la PCR son muy variadas y numerosas. Algunos ejemplos, relacionados con todos los procedimientos que se han explicado anteriormente, en especial el diseño de primers y las condiciones de la reacción, son: La secuenciación de ácidos nucleicos, establecimiento de polimorfismos de secuencia, rastreo de mutaciones, tipado de ADN para trasplantes, diagnóstico de enfermedades genéticas y/o prenatales, resolución de problemas forenses o de arqueología, estudios evolutivos, detección de microorganismos infecciosos o tumores, desarrollo de enzimas de restricción, pruebas de paternidad y mapeo de rasgos hereditarios, entre muchas otras (Luque y Herráez, 2001; Paz y Miño y López, 2014 y Pinilla *et al.*, 2008).

1.13.2 Electroforesis

Al finalizar la PCR, para corroborar si se amplificó correctamente la secuencia de interés, los productos de la reacción (también llamados amplicones), se analizan en geles de agarosa o en algunos casos de poliacrilamida para confirmar si la reacción fue exitosa. Estos geles funcionan como tamices moleculares al retardar el paso de las moléculas grandes más que el de las pequeñas (Gardner *et al.*, 2017 y Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La electroforesis en gel, constituye un medio muy eficaz para separar moléculas con tamaños y cargas diferentes. En el gel, se crean pozos (pequeñas concavidades) para contener las soluciones de fragmentos de ADN y se hacen pasar los fragmentos de ADN y mediante corriente eléctrica, estos migran hacia el polo positivo, ya que la carga de la molécula del ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato (Espinosa, 2007; Gardner *et al.*, 2017 y Pierce *et al.*, 2016).

Las moléculas de ADN compuestas por hasta 2,000 nucleótidos suelen separarse en geles de poliacrilamida debido a que las moléculas de acrilamida forman redes con tamaños de poros más uniformes y pequeños comparados con los de la agarosa, lo cual hace este tipo de gel sea útil (Espinosa, 2007 y Lodish *et al.*, 2005).

Por otro lado, las moléculas de ADN de alrededor de 200 nucleótidos hasta más de 20kb se separan en geles de agarosa, ya que la agarosa no forma redes tan uniformes,



pero permite separar dichas moléculas en grandes intervalos (Espinosa, 2007 y Lodish *et al.*, 2005).

La separación de moléculas en el gel se hace bajo un buffer -también llamado tampón- que puede ser TAE o TBE. El más común es el TBE -Tris Boratos de EDTA- ya que es muy estable y por ello puede utilizarse varias veces; El TAE -Tris Acetatos EDTA- pese a que es menos estable comparado con el TBE y tiende a ionizarse rápidamente, permite una separación de bandas mejor y es por esta razón que también es uno de los buffers más utilizados (Espinosa, 2007 y Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Otro compuesto que se añade al gel es conocido como BrEt o bromuro de etidio, este consiste en una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. La unión concentra el BrEt en el ADN, incrementando así su fluorescencia intrínseca, y cuando se somete a luz ultravioleta, a una longitud de onda de 264-366nm, el BrEt emite una señal que permite visualizar los amplicones en forma de bandas. Es importante recalcar que este reactivo debe manipularse con extremas precauciones ya que es mutagénico y teratógeno (Espinosa, 2007; Lodish *et al.*, 2013 y Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Antes de correr el gel, es necesario cargarlo con un marcador de peso molecular que contenga un número de segmentos de ADN conocidos, lo cual hará más sencilla la identificación de los amplicones y verificar que su tamaño corresponda con el esperado. El tamaño del amplicon está dado por el número de pares de bases (Espinosa, 2007).

También es necesario hacer uso de algún tipo de colorante que generalmente traen inmersos alguna sustancia espesa como glicerol o sacarosa, esto con la finalidad de que la muestra caiga hacia el fondo del pozo; Algunos otros colorantes nos permiten saber como van migrando los fragmentos de ADN, tal es el caso del xilen-cianol o azul de bromofenol (Espinosa, 2007).

Para hacer uso de esta técnica es necesario contar con cierto equipo especial como: una cámara de electroforesis, una fuente de poder, un transluminador de luz UV y un equipo de fotografía para guardar la imagen del gel. Y por último, para visualizar los amplicones se debe someter el gel a rayos UV y posteriormente tomar una fotografía digital (Espinosa, 2007 y Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Con la finalidad de hacer más clara la explicación anterior, en la figura 10 que sigue se muestra la electroforesis en gel de agarosa horizontal y sumergido para separar las moléculas de ADN.

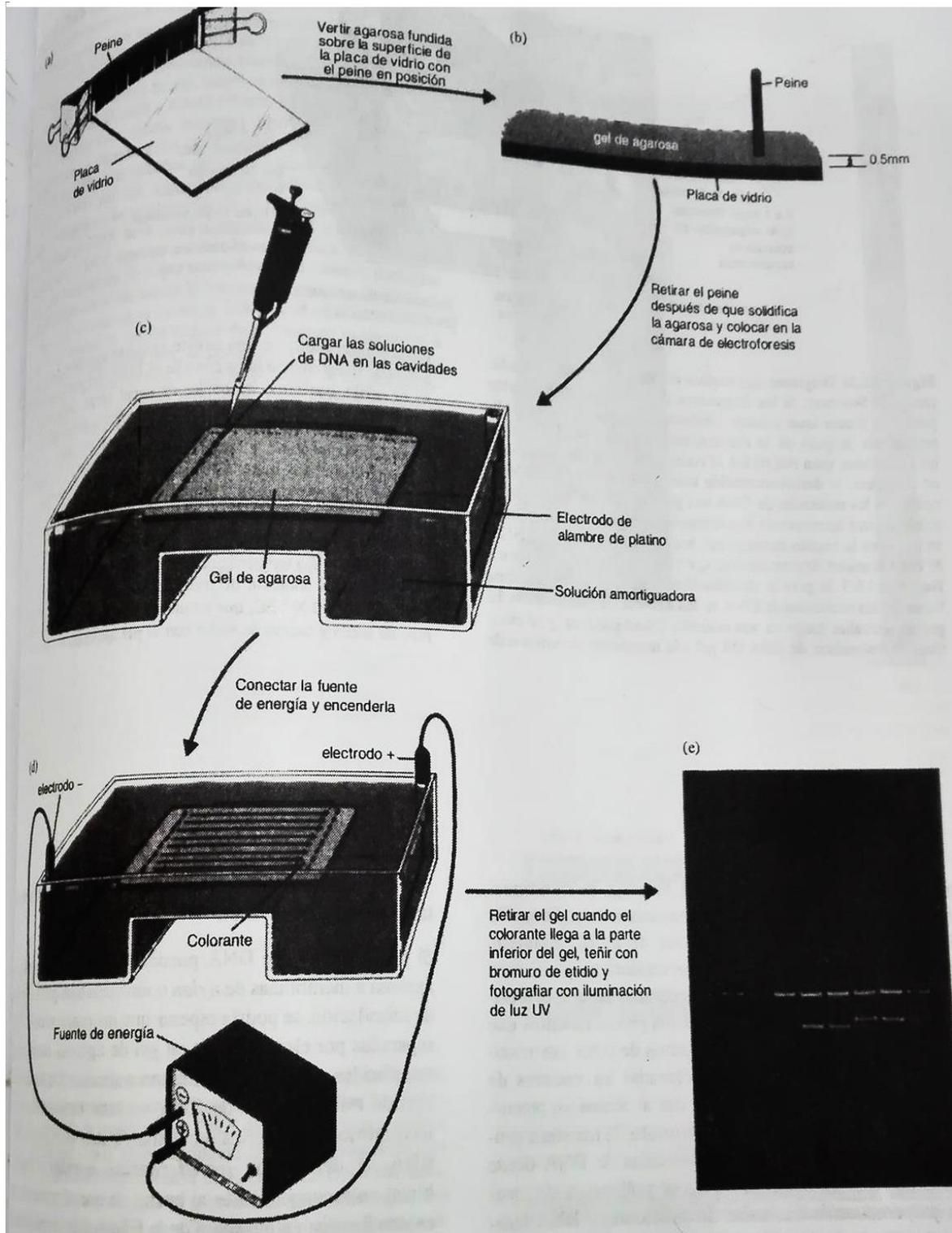


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa

Fuente: Gardner *et al.*, 2017



Justificación

La producción de miel en México es una actividad de suma importancia económica ya que aproximadamente 42,000 familias mexicanas dependen de su colecta y venta como sustento diario, ocupando el séptimo lugar en su producción y el tercero en exportaciones a nivel mundial, siendo Alemania el comprador más importante (SIAP, 2018).

No obstante, existen diversas publicaciones de diarios como *La vanguardia* (2016) y *El mundo* (2017), en las que la producción de miel se ve comprometida, al descubrir en ella adulteraciones con azúcar de caña, jarabe de maíz y piloncillo entre otros endulzantes artificiales, además de levaduras para la elaboración de cerveza como alimento para las abejas sustituyendo al polen, con el objeto de bajar los costos y acelerar su elaboración. De esta problemática, surge la necesidad de realizar estudios sobre la pureza del producto.

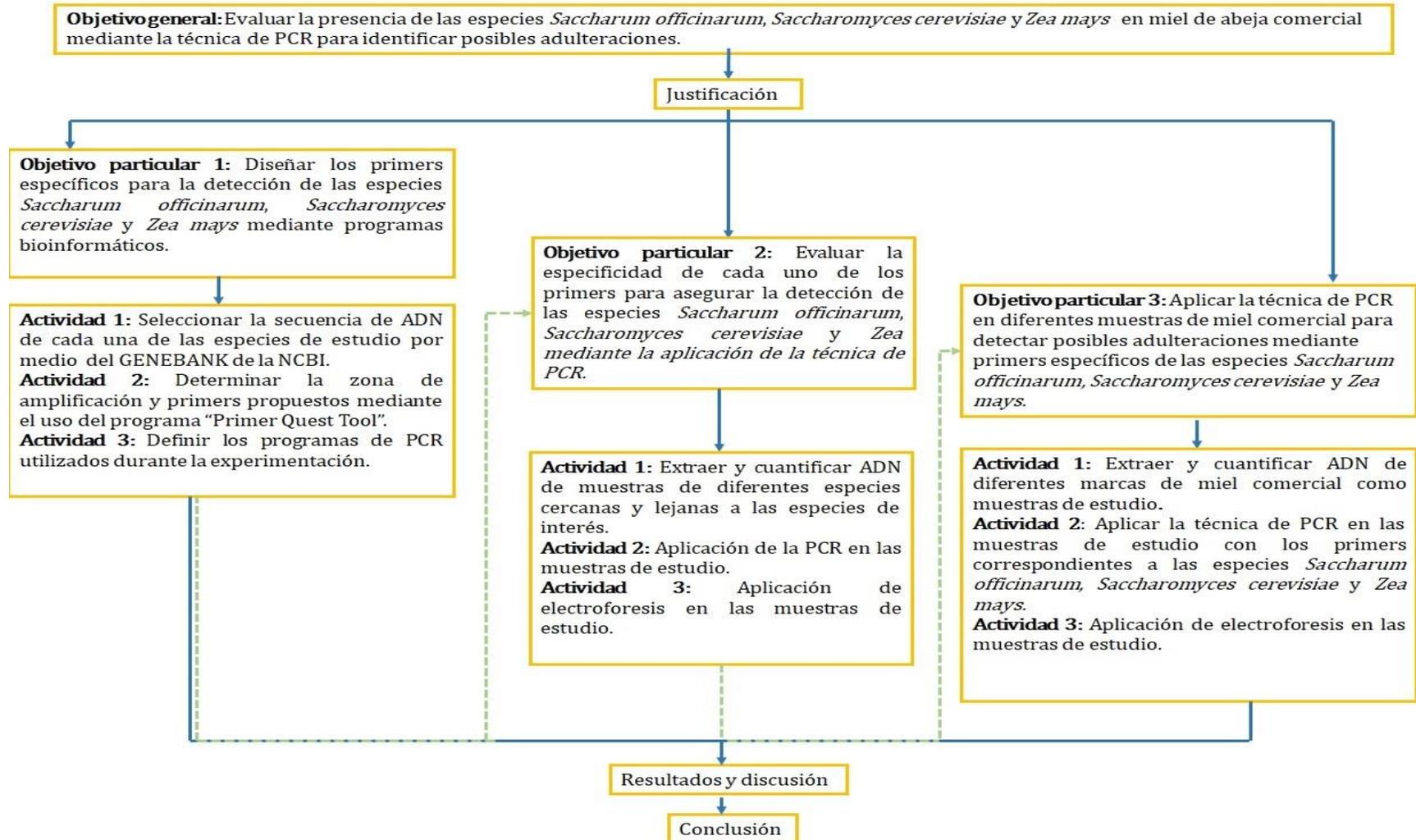
Existen diversas pruebas tradicionales para determinar si una miel de abeja ha sido adulterada, por ejemplo: Análisis enzimáticos, Métodos espectrométricos, electroquímicos, cromatográficos y espectroscopía infrarroja por mencionar algunos. La limitante de estas pruebas es que detectan adulteraciones, pero no se sabe con certeza de la procedencia del adulterante, es por esta razón que se ha elegido detectar posibles adulteraciones mediante la técnica de PCR, la cual permite detectar las especies involucradas en caso de presentarse dichas adulteraciones.

La elaboración de esta tesis tiene como objeto mantener informado al consumidor sobre el correcto etiquetado de las mieles vendidas en el supermercado, en cuanto a posibles aditivos no reportados y considerados adulterantes de acuerdo con la normativa nacional e internacional, cómo lo son el jarabe de maíz, el azúcar de caña y levadura para cerveza, teniendo por finalidad que éstos puedan hacer una elección más consciente al respecto y alertarlos en caso de padecer alergias a alguno de estos aditivos.



CAPTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Cuadro metodológico





2.2 Descripción del cuadro metodológico

2.2.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays* en miel de abeja comercial mediante la técnica de PCR para identificar posibles adulteraciones.

2.2.2 Objetivo particular 1

Diseñar los primers específicos para la detección de las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays* mediante programas bioinformáticos.

Actividades

1. Seleccionar la secuencia de ADN de cada una de las especies de estudio por medio del GENE BANK de la NCBI.
2. Determinar la zona de amplificación y primers mediante el uso del programa "Primer Quest Tool IDT".
3. Definir los programas de PCR a utilizar en la experimentación.

2.2.3 Objetivo particular 2

Evaluar la especificidad de cada uno de los primers para asegurar la detección de las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays* mediante la aplicación de la técnica de PCR.

Actividades

1. Extraer y cuantificar ADN de muestras de diferentes especies cercanas y lejanas a las especies de interés.
2. Aplicación de la PCR en las muestras de estudio.
3. Aplicación de la electroforesis en las muestras de estudio.

2.2.4 Objetivo particular 3

Aplicar la técnica de PCR en diferentes muestras de miel comercial para detectar posibles adulteraciones mediante primers específicos de las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays*.

Actividades

1. Extraer y cuantificar ADN de diferentes marcas de miel comercial como muestras de estudio.
2. Aplicar la técnica de PCR en las muestras de estudio con los primers correspondientes a las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays*.
3. Aplicación de la electroforesis en las muestras de estudio.



2.3 Materiales

2.3.1 Materiales biológicos

Se utilizaron 10 muestras comerciales de miel de abeja obtenidas de mercados, recauderías (M1-M5) y súper mercados (M6-M10) para realizar este estudio, sus especificaciones se muestran a continuación (tabla 5):

Tabla 5. Especificaciones de las muestras utilizadas

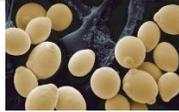
N° muestra	Marca	Nomenclatura	Procedencia	Peso	Precio	Lote
1	SM	M1	Edo. Méx	½ Kg	\$40	D*
2	SM	M2	Oaxaca	¼ Kg	\$70	D*
3	SM	M3	Puebla	½ Kg	\$50	D*
4	SM	M4	Michoacán	¼ Kg	\$35	D*
5	SM	M5	Yucatán	¼ Kg	\$50	D*
6	D'gari	M6	*D	300g	\$33.30	18166
7	Golden Hills	M7	*D	370g	\$48.90	096097
8	Queen Bee Escosa	M8	*D	340g	\$41.35	D*
9	Carlota	M9	*D	335g	\$57	15218
10	Great Value	M10	*D	300g	\$38	1526

Fuente: Elaboración propia

*D: Desconocido

Para llevar a cabo las pruebas de especificidad y obtener los controles positivos, se utilizaron las siguientes especies:

Tabla 6. Especies utilizadas para controles positivos y especificidad

Nombre común	Nombre científico	Imagen
Caña de azúcar*	<i>Saccharum officinarum</i>	
Levadura*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Maíz*	<i>Zea mays</i>	
Pavo	<i>Meleagris gallopavo</i>	



Especies utilizadas para controles positivos y especificidad (Continuación)		
Nombre común	Nombre científico	Imagen
Pollo	<i>Gallus domesticus</i>	
Cerdo	<i>Sus scrofa</i> (doméstica)	
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	
Avena	<i>Avena sativa</i>	
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	
Hongo	<i>Aspergillus flavus</i>	

Fuente: Elaboración propia

*Controles

2.3.2 Reactivos

Extracción de ADN

- ⇒ Solución de lisis: La cual contiene detergentes que desestabilizan la membrana celular y liberan el contenido al medio. Y se compone por:
 - Tris base: Se trata de un buffer que mantiene el pH en 8.
 - EDTA: Secuestra iones metálicos.
 - SDS: Es un detergente que rompe la membrana celular y nuclear.
- ⇒ Enzima proteinasa K: Se encarga de cortar las histonas del ADN.
- ⇒ Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico: La que cumple varias funciones como: disociar las proteínas de ADN (Fenol), desnaturaliza proteínas y lípidos (Cloroformo) y evita que se forme espuma (Alcohol isoamílico).
- ⇒ Etanol frio: Funge como precipitador del ADN.
- ⇒ Agua libre de nucleasas.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

- ⇒ Kit Go taq para PCR
- ⇒ Agua libre de nucleasas
- ⇒ Primers para detectar maíz
- ⇒ Primers para detectar caña de azúcar
- ⇒ Primers para detectar levadura



Electroforesis

- ⇒ Agarosa: Funciona como gel y tamiz molecular.
- ⇒ Marcador de peso molecular: Son fragmentos de ADN de longitud conocida que nos permite saber el tamaño de nuestro amplificado o muestra.
- ⇒ Bromuro de etidio (BrET): Se trata de un colorante que se une a las pares de bases del ADN y es fluorescente al exponerse a luz ultravioleta que permite visualizar las bandas amplificadas o muestras en el gel de electroforesis. Es un reactivo cancerígeno y teratógeno.
- ⇒ Blue/Orange: Funciona como tampón de carga y colorante que posibilita visualizar la corrida del gel en la cámara de electroforesis, además proporciona densidad a la muestra para facilitar la carga del gel.

2.3.3 Equipos

- ⇒ Agitador Vortex, *Genie K-550-G*.
- ⇒ Balanza analítica electrónica, *Sartorius*.
- ⇒ Cámara de electroforesis.
- ⇒ Cámara fotográfica para luz UV, *Kodac Digital Science*.
- ⇒ Centrífuga, *Minispin plus Eppendorf*.
- ⇒ Horno de microondas, *Mirage JMI-010*.
- ⇒ Juego de micropipetas, *Rainin* de 0.5-1000 μL .
- ⇒ Microcentrífuga, *Wiggen hauser*.
- ⇒ Espectrofotómetro, *Nanodrop ND-1000*.
- ⇒ Puntas para micropipeta.
- ⇒ Termociclador.
- ⇒ Termoblok, *Thermomixer compact Eppendorf*.
- ⇒ Trasluminador de luz UV, *Cleaver Scientific LTD*.
- ⇒ Tubos de Eppendorf.

2.4 Metodología

2.4.1 Diseño de primers

El diseño de primers se realizó mediante el uso de un programa bioinformático que se encuentra en la siguiente liga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> . La metodología completa con la que se diseñaron los primers se encuentra en el Anexo 1.

Para el presente proyecto, se diseñaron tres parejas de primers para la identificación de maíz (*Zea mays*) utilizando su secuencia completa (GenBank: AF031569.1), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con su secuencia completa (Accession: KU685411) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) usando su cromosoma IV (GenBank: U32274.1), por medio del programa bioinformático “Primer Quest Tool IDT” (<https://idtADN.com/PrimerQuestHome/index>). El programa diseñó 5 parejas de primers y se seleccionó la pareja que cumplió con las características mencionadas en la página 27.



La temperatura de hibridación (T_m), al ser un factor de suma importancia en la PCR, se obtuvo del laboratorio de procedencia de los primers.

Debido a que el contenido de guanina y citosina (G y C) afecta de manera directa la temperatura de hibridación de los primers, se tuvo sumo cuidado en seleccionar primers cuyo contenido de G y C oscilara entre 40 y 60%.

Tabla 7. Temperaturas de hibridación para los primers diseñados

Especie	Primer	T_m del proveedor (°C)	T_m considerada (°C)	CG%
Caña de azúcar	Frontal	62.7	63.2	50
	Reverso	64.4		50
Maíz	Frontal	61.6	63	50
	Reverso	64.1		50
Levadura	Frontal	63	62.9	50
	reverso	62.8		50

Fuente: Elaboración propia

2.4.2 Preparación de la muestra de miel de abeja

Previo a realizar la extracción de ADN se efectuó una dilución en la que 20g de miel fueron diluidos en 20ml de agua libre de nucleasas y posteriormente centrifugados a 6,000rpm por 12 minutos con ayuda de la centrifuga, este proceso se repitió hasta obtener un pellet color café al fondo del tubo. Finalmente, se descartó la fase superior del líquido centrifugado y el sedimento restante se utilizó para la extracción. (Jain, S.A., Jesus, F.T., Marchioro, G.M. y Araújo, E.D., 2013)

2.4.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por medio del método de Sambrook (2001), el cual permite extraer ADN de alimentos aun cuando estos han pasado por algún proceso, por ejemplo, pasteurización, clarificación, entre otros.

Se llevó a cabo una disgregación de tejido en la que se pesaron, con ayuda de la balanza analítica electrónica *Sartorius*, 0.125g de la muestra previamente preparada en un tubo de eppendorff, al cual se le agregaron 1250 μ L de solución de lisis y 7 μ L de solución de proteinasa K para incubarlos a 50°C en el *termoblock Thermomixer compact Eppendorf* por dos horas. Por último, después de este tiempo se elevó la temperatura del termoblock a 60°C por una hora para desactivar la enzima.

Posteriormente, se realizó la extracción de proteínas y polisacáridos del ADN en el cual se añadió al tubo de eppendorff 250 μ L de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, después se centrifugó a 10,000rpm por 10 minutos con ayuda de la



centrífuga *Minispin plus Eppendorf* y se recuperó la fase acuosa superior contenedora del ADN.

Para finalizar la extracción de ADN, este se tuvo que precipitar agregando 1500 μ L de etanol frío y centrifugarlo a 10,000rpm por 10 min. Enseguida se decantó el etanol y se dejó secar el ADN en la incubadora a 37°C por un lapso de una hora. Por último, se adicionaron 50 μ L de agua desionizada para volver a suspender el ADN y se prosiguió a cuantificar el ADN mediante absorbancia.

2.4.4 Cuantificación

Para cuantificar la cantidad de ADN extraído se hizo uso del espectrofotómetro *Nanodrop* junto con su programa computacional, por lo cual fue necesario encender el equipo de cómputo al que se encuentra conectado. Como paso consecuente se procedió a abrir el programa correspondiente y tras seleccionar la opción de “Ácidos nucleicos”, se limpiaron cuidadosamente los sensores del equipo, se pusieron 2 μ L de agua libre de nucleasas para iniciar la cuantificación y se pulsó “OK”. Posterior a ello, se limpió el sensor y se colocaron 2 μ L de agua libre de nucleasas, de nuevo para que este sirviera como blanco “blank”. Una vez que el equipo dio el valor, se limpió de nuevo el sensor, en seguida se colocaron 2 μ L de la muestra obtenida de la extracción de ADN y se seleccionó la opción “measure”. Finalmente, se registraron los valores de la relación 260/280 y la concentración de ADN en ng/ μ L.

Para poder llevar a cabo una PCR con eficiencia fue necesario mantener controlados ciertos parámetros en cuanto a la calidad del ADN, por lo que teóricamente de acuerdo con el método propuesto por Sambrook la concentración del ADN debe ser de 60ng/ μ L. Por otra parte, la relación 260/280 permite conocer un estimado de la pureza del ADN, su valor debe oscilar entre 1.7 y 1.9, en el cual, el valor ideal es de 1.8; obtener valores de 2 o mayores, es indicador de que existe una pureza en ARN; por el contrario, si los valores son menores a 1.7, quiere decir que hay gran presencia de proteínas o fenoles.

2.4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizaron los cálculos pertinentes para determinar la cantidad de cada componente que se utilizó en la reacción (tabla 8), posterior a esto se agregaron las cantidades calculadas del kit Go Taq, los primers y el agua libre de nucleasas en un tubo de Eppendorf, en seguida se dividió la mezcla y se colocó el ADN correspondiente en cada uno de los tubos para después centrifugar los tubos con ayuda de la microcentrífuga, *Minispin plus Eppendorf* por un tiempo de 5 segundos y finalmente se metieron los tubos al termociclador y se programó a las diferentes condiciones de acuerdo con el programa de PCR para cada caso.



Tabla 8. Preparaciones por muestra de cada componente para la PCR

Componente	Preparación por muestra (μL)
Kit Go Taq	12.5
Primer frontal	0.25
Primer reverso	0.25
ADN	1
Agua libre de nucleasas	11
Volumen total de la reacción	25

Fuente: Elaboración propia

2.4.6 Programas para la PCR

Para llevar a cabo cada una de las reacciones, fue necesario programar el termociclador con diferentes temperaturas obtenidas del manual del kit Go Taq y las T_m de la tabla 7. Quedando los programas para PCR de la siguiente manera.

2.4.6.1 Programa de PCR para caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

Este programa amplificó para 760pb. La desnaturalización inicial fue a 95°C por 2 min, la segunda desnaturalización se dio a la misma temperatura por 30 segundos. La hibridación fue a 63.2°C (ver tabla 7) por 30 segundos. La elongación a 72°C por 1 minuto cumpliendo 40 ciclos y la extensión final a 72°C por 5min (ver figura 11).

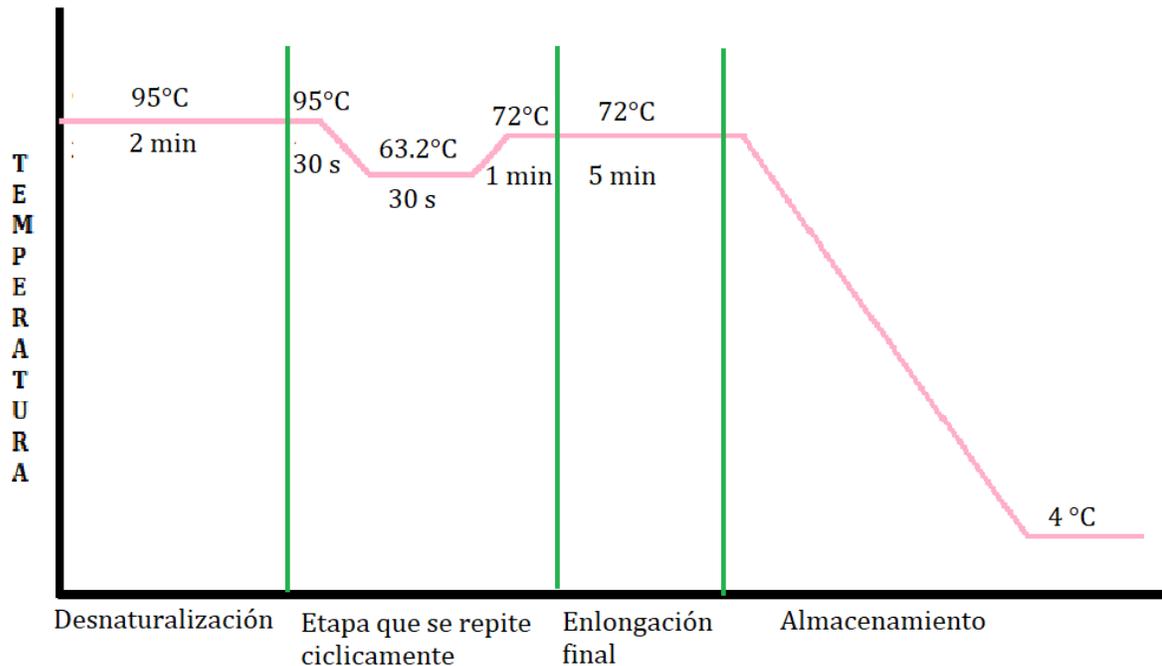


Figura 11. Programa diseñado para la amplificación de un segmento de ADN de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con los primers frontal y reverso para esta especie.



2.4.6.2 Programa de PCR para levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Este programa amplificó 564pb. La desnaturalización inicial fue a 95°C por 2 min, la segunda desnaturalización se dio a la misma temperatura por 30 segundos. La hibridación fue a 63°C (ver tabla 7) por 30 segundos. La elongación a 72°C por 1 minuto cumpliendo 40 ciclos y la extensión final a 72°C por 5min (ver figura 12).

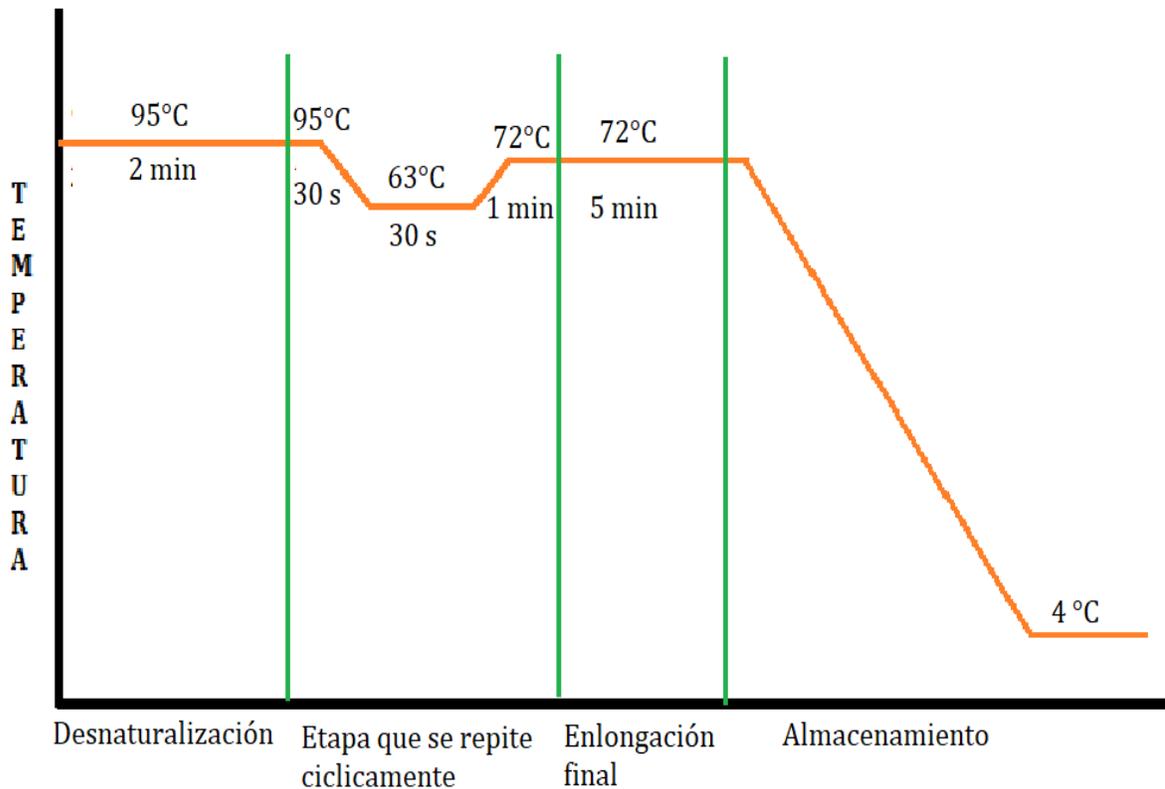


Figura 12. Programa diseñado para la amplificación de un segmento de ADN de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con los primers frontal y reverso para esta especie.

2.4.6.3 Programa de PCR para maíz (*Zea mays*)

Este programa amplificó 738pb. La desnaturalización inicial fue a 95°C por 2min, la segunda desnaturalización se dio a la misma temperatura por 30 segundos. La hibridación fue a 62.9°C por 30 segundos. La elongación a 72°C por 1 minuto cumpliendo 40 ciclos y la extensión final a 72°C por 5min (ver figura 13).

La temperatura de hibridación considerada para la elaboración del programa fue de las T_m dadas por el proveedor de los primers (ver tabla 7).

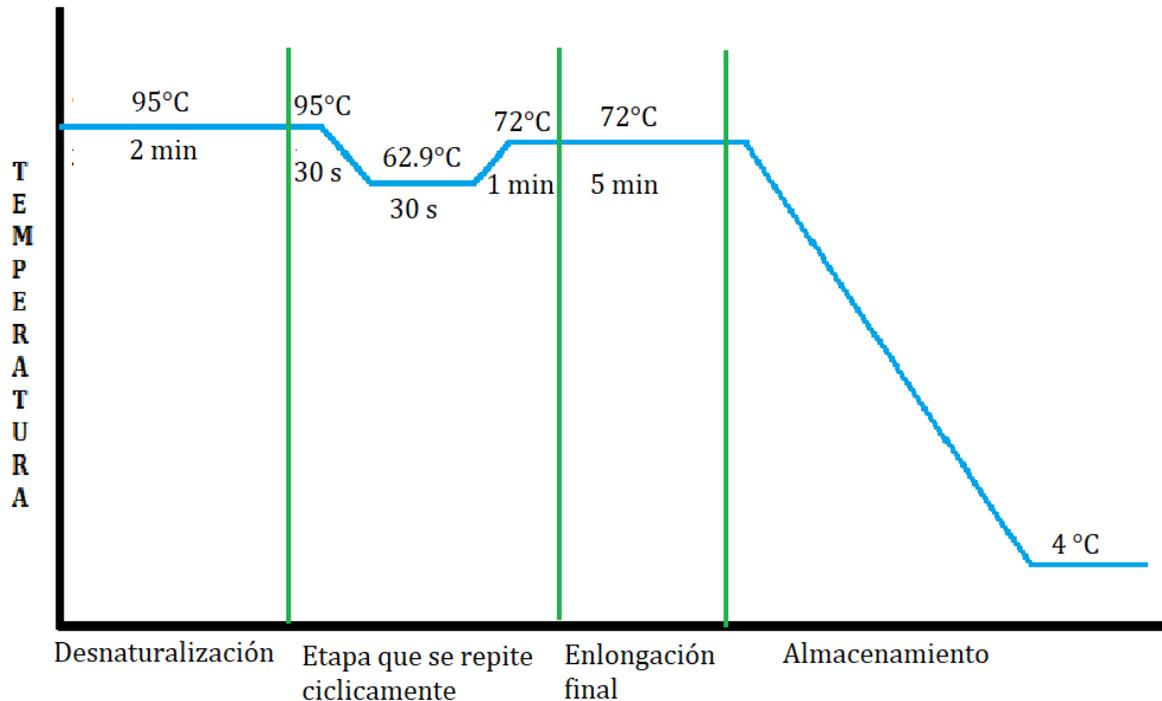


Figura 13. Programa diseñado para la amplificación de un segmento de ADN de maíz (*Zea mays*) con los primers frontal y reverso para esta especie.

2.4.7 Electroforesis

Para PCR y para evaluación de la integridad se realizó un gel con una concentración del 1% de agarosa, se disolvieron en 50mL de TAE 1x. Después, se calentó la dilución en el horno de microondas *Mirage JMI-010* aproximadamente por un minuto en intervalos de 20 segundos. Posteriormente se añadió una gota de BrET, se mezcló y se dejó enfriar. Luego se cerraron las aperturas laterales del soporte la cámara de electroforesis y se vertió la mezcla dentro de este (cuidando que no se formaran burbujas), se colocó el peine correspondiente al número de muestras y se esperó a que gelificara. Seguidamente, se retiraron los peines y se colocó el soporte dentro de la cámara de electroforesis y se agregó TAE 1x de modo que el gel quedó totalmente cubierto.

Para cargar el gel, se utilizó un trozo de parafilm y en él, se depositaron 3µL de BrET, 3µL de colorante blue/orange, y 2.5 µL de marcador de peso molecular. Para cargar las muestras de ADN se pusieron 5µL de muestra resultante de la PCR y se rellenaron cada uno de los pocillos por separado con los diferentes productos de la PCR. Se procedió a activar el campo eléctrico a 90v hasta que finalizó la corrida, es decir, hasta que el colorante se visualizó cerca del extremo opuesto.

Finalmente, para visualizar los fragmentos se colocó el gel dentro del trasluminador Cleaver Scientific LTD de manera centrada y se encendió. Como último paso se encendió la cámara fotográfica *Kodac Digital Science* y se fotografió el gel.



CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Objetivo particular 1

Diseñar los primers específicos para la detección de las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays* mediante programas bioinformáticos.

3.1.1 Diseño de primers

El diseño de los primers específicos para las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays* se logró con ayuda de los programas bioinformáticos de la NCBI y el Primer Quest Tool IDT (Ver Anexo 1).

Los tres primers diseñados amplificaron correctamente las secuencias de ADN de interés para las especies mencionadas anteriormente, además de cumplir con temperaturas de hibridación similares entre los primers frontal y reverso, y un contenido de G y C menor a 60%, lo que hizo posible la realización de este proyecto.

Los primers utilizados a lo largo de la experimentación fueron los siguientes:

Tabla 9. Características de los primers diseñados para Saccharum officinarum, Saccharomyces cerevisiae y Zea mays

Primer	Secuencia	Amplificado
<i>Saccharum officinarum</i>		
Frontal	CCG CTT CTC TGT CAT GTC TAT C	760pb
Reverso	CCG GAA CTA ACC GTC CTT AAT C	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Frontal	CTT GAG GCT AGG AGC GTT ATT C	564pb
Reverso	CCT CCA CCT CGT TTC TTA GTT C	
<i>Zea mays</i>		
Frontal	CAC GTG TCC TCA CTG CTA AA	738pb
Reverso	CTA CGA TTG GGT GGT GGA TAA G	

Fuente: Elaboración propia



3.2 Objetivo particular 2

Evaluar la especificidad de cada uno de los primers para asegurar la detección de las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays* mediante la aplicación de la técnica de PCR.

3.2.1 Especificidad de los primers

En la tabla 10 se observan la relación 260/280 y las concentraciones de las muestras de ADN extraídas. Como sabemos, el valor de la relación 260/280 debe oscilar entre 1.7 a 1.9 para considerarse un ADN de buena calidad.

No obstante, para el caso de la caña de azúcar, maíz y pollo, aunque sus valores no estuvieron dentro del rango, fue posible utilizarlos para la experimentación de este proyecto.

Tabla 10. Concentración del ADN extraído de diferentes especies para corroborar la especificidad para los primers de caña de azúcar, levadura y maíz.

Muestras	Nomenclatura	Relación 260/280	Concentración (ng/ μ L)
Caña de azúcar	Caña	2.08	2961.5
Levadura	Lev	1.8	1687.1
Maíz	Ma	1.62	1330.4
Pavo	Pav	1.78	1586.4
Pollo	Po	2.06	788.3
Cerdo	Ce	1.97	405.7
Trigo	Tri	1.68	56.9
Avena	Av	1.68	168.4
Zanahoria	Zan	1.66	925.8
<i>Aspergillus flavus</i>	Ho	1.90	4687.5

Fuente: Elaboración propia

3.2.1.1 Gel de integridad del ADN

En la figura 14, se puede observar un gel de electroforesis elaborado con agarosa al 1% y corrido a 90v, para verificar una vez más la calidad del ADN que fue extraído para los controles positivos (Caña, Levadura y Maíz) y para las especies cercanas y lejanas para posteriormente analizar la especificidad de los primers. Donde: Caña: caña de azúcar, Lev: Levadura, Ma: Maíz, Pav: Pavo, Po: Pollo, Ce: Cerdo, Tri: trigo, Av: Avena, Zan: Zanahoria y Ho: *Aspergillus flavus*.

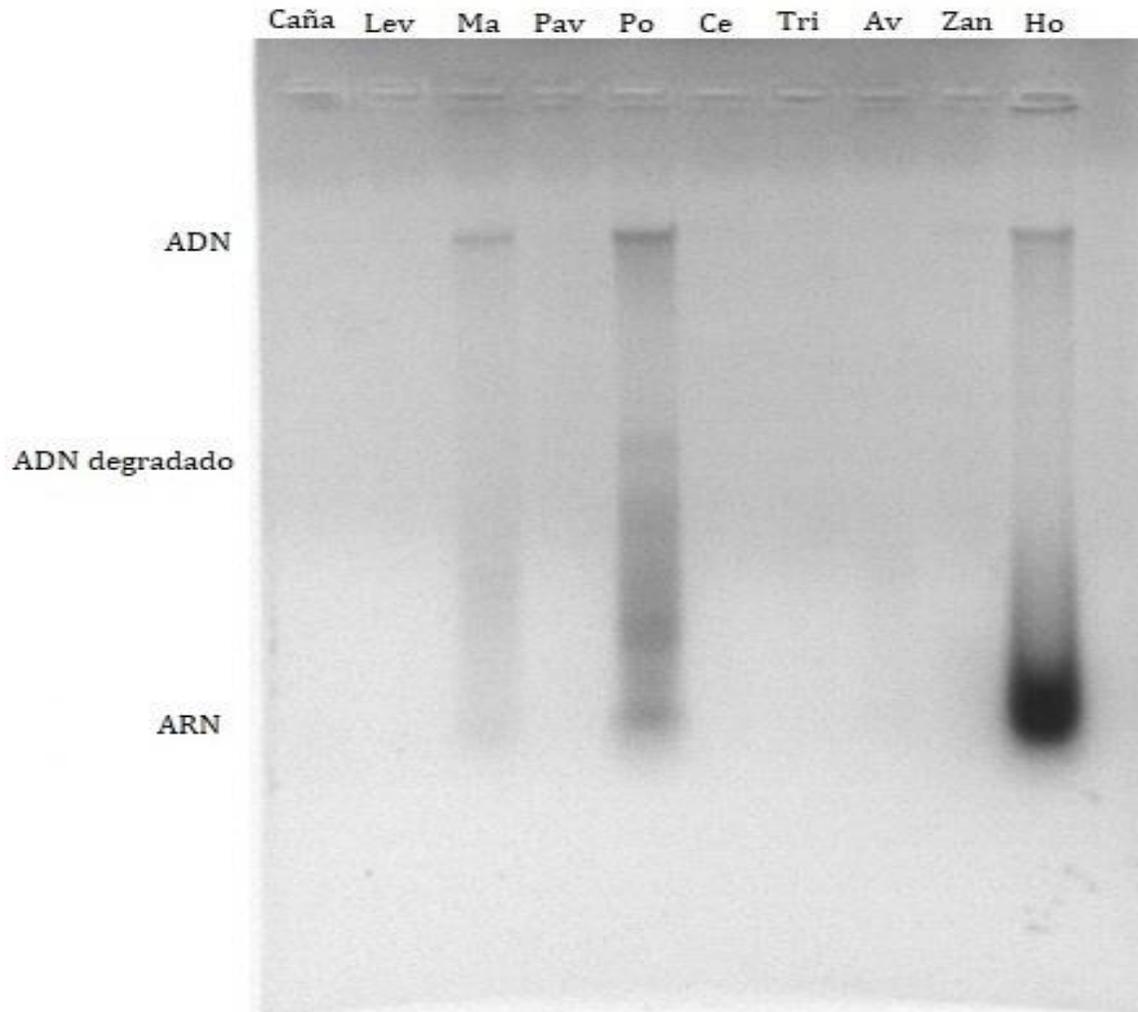


Figura 14. Gel de electroforesis elaborado al 1% y corrido a 90v, para verificar la concentración e integridad del ADN.

Se pueden visualizar claramente franjas en la parte superior, correspondientes a las especies de maíz, pollo y *Aspergillus flavus*, estas representan el ADN. Y las manchas a lo largo del gel es el ADN degradado. En el caso de la muestra de *Aspergillus flavus* se puede observar ARN, lo que indica que la calidad de su ADN es buena a pesar de tener presencia de ARN. No obstante, en las muestras de caña, levadura, pavo, cerdo, trigo, avena y zanahoria no se visualiza la presencia de ADN, pero pudieron utilizarse para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa.



Previo a realizar las PCR para evaluar la especificidad de los primers, se realizaron 3 diferentes PCR para verificar que cada uno de los controles positivos amplificaban. Debido a que en el gel de integridad de las especies (figura 14) no se lograron apreciar ADN de calidad para los controles positivos de caña de azúcar, levadura y maíz, se decidió volver a extraer ADN y realizar su cuantificación de ADN. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 11. Concentración del ADN extraído para controles positivos de caña de azúcar, levadura y maíz.

Muestras	Nomenclatura	Relación 260/280	Concentración (ng/ μ L)
Caña de azúcar 2	c2	1.87	1482.9
Levadura 2	L2	2.02	423.2
Maíz 2	m2	1.15	81.8

3.2.1.2 Control positivo para maíz y caña de azúcar

En la figura 15, en el primer carril se colocó el control positivo para maíz número 1 (Cm1), en el segundo carril el control positivo para maíz 2 (Cm2), después se dejaron tres carriles como separación y en el siguiente se colocó el control positivo para caña de azúcar 2 (Cc2), enseguida el control positivo para caña de azúcar 1 (Cc1), posteriormente el control negativo o blanco (B) y por último el marcador de peso molecular de 100pb (MP).

En el gel de electroforesis elaborado con agarosa al 1% y corrido a 90v, se pueden visualizar cuatro amplificados, dos de 738pb, correspondientes a los controles positivos de maíz (Cm1 y Cm2) y dos de 760pb concernientes a los controles positivos para caña de azúcar (Cc1 y Cc2). De acuerdo al programa bioinformático “Primer Quest Tool IDT” para el diseño de primers se obtuvieron los fragmentos amplificados al maíz y caña de azúcar de 738pb y 760pb respectivamente (Ver Anexo 1).

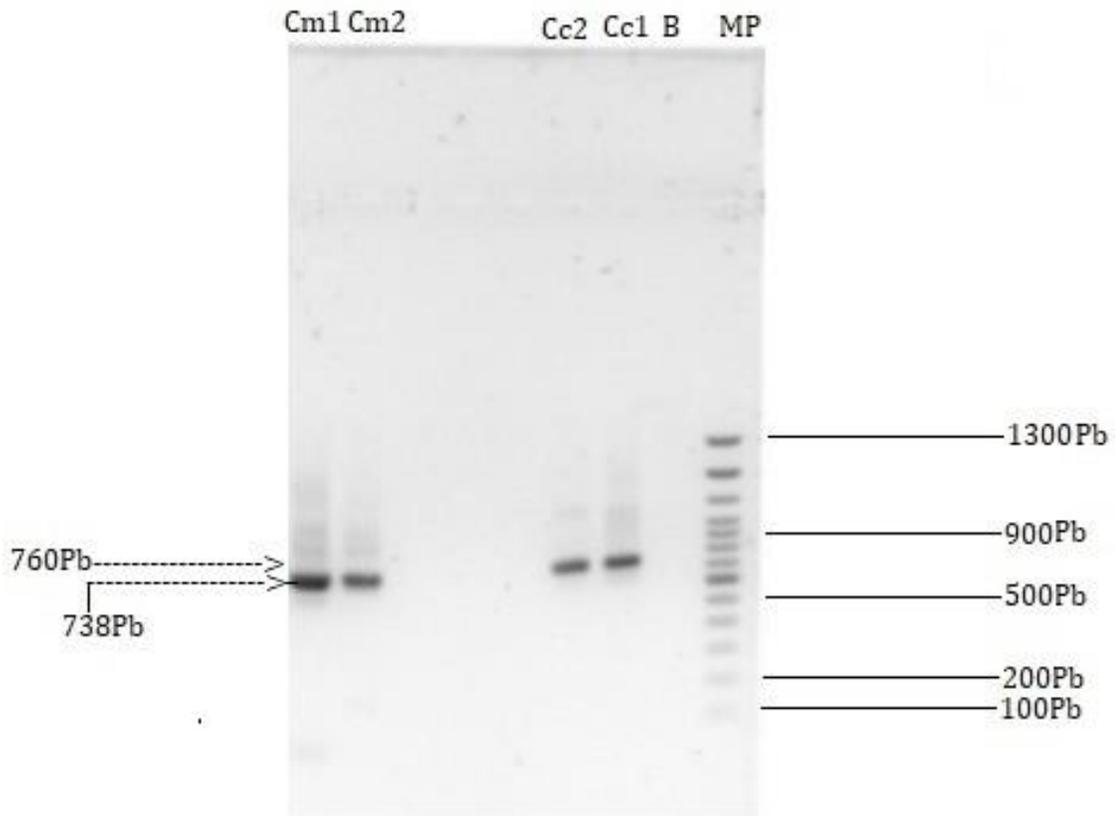


Figura 15. Gel de agarosa al 1%, corrido a 90v, para los controles positivos de maíz y caña de azúcar. Donde: Cm1: Control positivo de la primera muestra de maíz, Cm2: Control positivo de la segunda muestra de maíz, Cc2: Control positivo de la segunda muestra de caña de azúcar, Cc1: Control positivo de la primera muestra de caña de azúcar, B: Blanco y MP: marcador de peso molecular.

3.2.1.3 Control positivo para levadura

En la figura 16, en el primer carril se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo carril el control negativo o blanco (B), después se dejó un pocillo de separación y en seguida se colocó el control positivo para levadura 1 (CL1) y por último el control positivo para levadura 2 (CL2).

Se puede observar el gel de electroforesis elaborado al 1% y corrido a 90v en donde se puede visualizar un fragmento de ADN de 564pb correspondiente a la primera muestra de levadura, la segunda muestra de levadura (CL2) no se logró visualizar debido a que la calidad del ADN no fue buena.

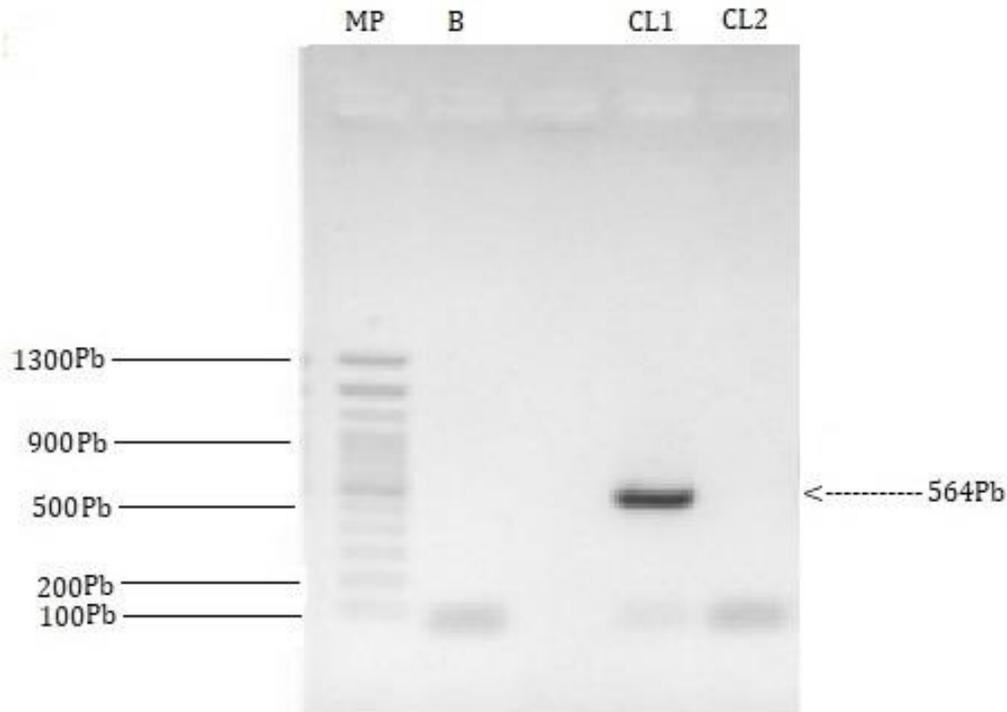


Figura 16. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v para control positivo de levadura. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: Blanco, CL1: Control positivo para la primera muestra de levadura y CL2: Control positivo para la segunda muestra

3.2.1.2 Especificidad *Saccharum officinarum* (caña de azúcar)

En la figura 17, en el primer pocillo se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+) correspondiente a *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), posteriormente en pocillos separados las muestras de pavo (Pav), pollo (Po), cerdo (Ce), maíz (Ma), levadura (Lev), trigo (Tri) y avena (Av).

Se puede visualizar el gel de electroforesis realizado con agarosa al 1% que fue corrido a 90v para corroborar la especificidad de los primers de caña de azúcar. Los primers diseñados resultaron no ser específicos, ya que pueden observarse fragmentos que indican la compatibilidad con dos especies lejanas, las cuales fueron pavo, levadura y una especie cercana que fue el trigo. Por lo tanto, se pueden observar cuatro amplificadas de 760pb (figura 17).

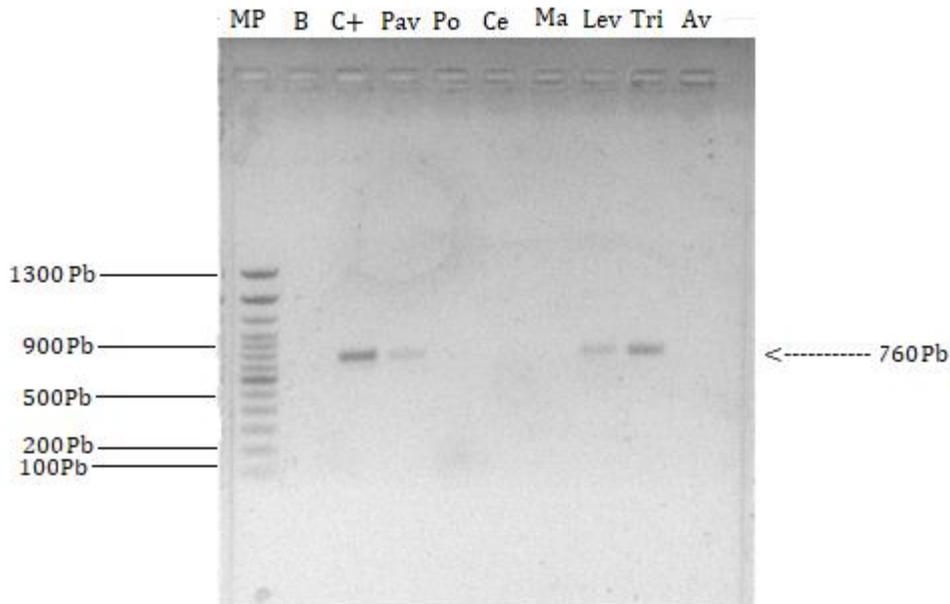


Figura 17. Gel de agarosa al 1%, corrido a 90v, con los primers frontal y reverso para caña de azúcar de 760Pb, para corroborar la especificidad de los primers. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: blanco, C+: Control positivo, Pav: Pavo, Po: Pollo, Ce: Cerdo, Ma: Maíz, Lev: Levadura, Tri: Trigo y Av: Avena.

3.2.1.3 Especificidad *Saccharomyces cerevisiae* (levadura)

Por otro lado, en la figura 18, en el primer pocillo se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+) correspondiente a *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), posteriormente en pocillos separados las muestras de avena (Av), pollo (Po), cerdo (Ce), zanahoria (Zan), caña, maíz (Ma) y *Aspergillus flavus* (Ho).

Se muestra el gel de electroforesis, realizado al 1% con agarosa y corrido a 90v, para evaluar la especificidad de los primers diseñados para de la levadura. Estos primers tampoco fueron específicos, ya que pueden observarse fragmentos que indican la compatibilidad con una especie lejana que fue la muestra de *Aspergillus flavus* y con dos lejanas, cerdo y zanahoria. Por lo tanto, pueden observarse cuatro amplificadas de 564pb (figura 18).

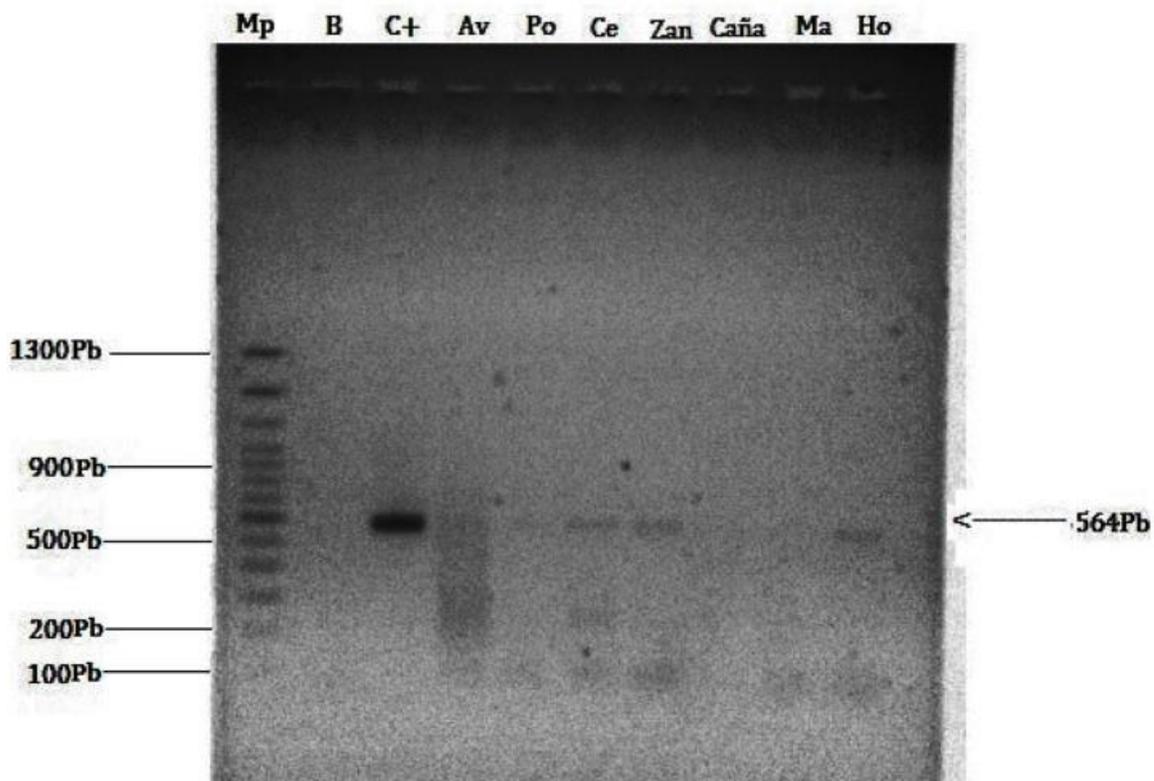


Figura 18. Gel de electroforesis en del de agarosa al 1%, corrido a 90v, con los primers frontal y reverso para levadura de 564Pb, para corroborar la especificidad de los primers. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: blanco, C+: Control positivo, Av: Avena, Po: Pollo, Ce: Cerdo, Zan: Zanahoria, Ca: Caña de azúcar, Ma: Maíz y Ho: *Aspergillus flavus*.

3.2.1.4 Especificidad *Zea mays* (maíz)

Por último, en la figura 19, en el primer pocillo se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+) correspondiente a *Zea mays* (maíz), posteriormente en pocillos separados las muestras de pavo (Pav), cerdo (Ce), pollo (Po), levadura (Lev), caña, zanahoria (Zan) y trigo (Tri).

Se muestra un gel de electroforesis, realizado al 1% con agarosa y corrido a 90v, para evaluar la especificidad de los primers diseñados para maíz. Este par de primers fue específico, por lo que se puede visualizar sólo un fragmento amplificado de 738pb en el control positivo y no en el carril de alguna otra especie.

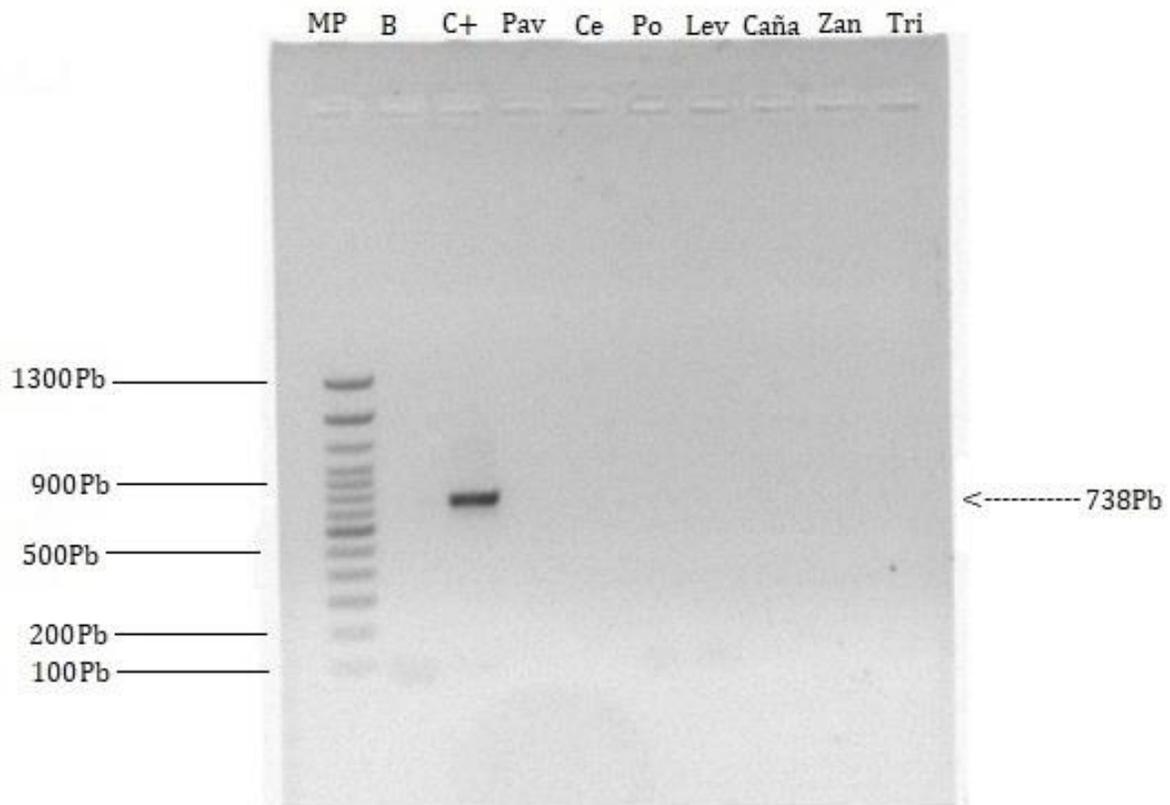


Figura 19. Gel de electroforesis en del de agarosa al 1%, corrido a 90v, con los primers frontal y reverso para maíz de 738Pb, para corroborar la especificidad de los primers. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: blanco, C+: Control positivo, Pav: Pavo, Ce: Cerdo, Po: Pollo, Lev: Levadura, Caña: Caña de azúcar, Zan: Zanahoria y Tri: Trigo.

3.3 Objetivo particular 3

“Aplicar la técnica de PCR en diferentes muestras de miel comercial para detectar posibles adulteraciones mediante primers específicos de las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays*.”

En la tabla 12 se puede observar los valores anteriormente mencionados que se obtuvieron durante la cuantificación de ADN de los diferentes materiales biológicos utilizados.

Se tomó la decisión de no realizar disoluciones debido a la presencia de varios pigmentos y azúcares de la miel, lo cual puede ser la razón por la cual la concentración de las mieles parece ser alta.



Tabla 12. Concentraciones de ADN de diferentes mieles comerciales

Muestra (Marca o procedencia)	Nomenclatura	Relación 260-280	Concentración (ng/μL)
Edo de Méx.	M1	1.83	585.5
Oaxaca	M2	1.69	445.8
Puebla	M3	1.57	1092.3
Michoacán	M4	1.59	1388.4
Yucatán	M5	1.54	342.3
D’Gari	M6	1.59	394.2
Golden Hills	M7	1.96	510.8
Queen Bee Escosa	M8	1.43	337.8
Carlota	M9	1.56	370.2
Great value	M10	1.50	563.3

Además, los valores de la pureza indicaban en la mayoría de los casos presencia de fenoles o proteínas. Debido a que la miel es un producto alimenticio con muy bajo contenido de proteínas, se consideró que las muestras tuvieron presencia de fenoles, resultantes del proceso de extracción de ADN. A pesar de estos resultados, las muestras fueron aptas para la realización del proyecto.

Posteriormente, se realizó la técnica de PCR con las mieles de abeja seleccionadas y con cada una de las especies propuestas (caña de azúcar, maíz y levadura), para identificar la presencia o ausencia de estas.

Finalmente, cabe mencionar que un estudio realizado por la revista del consumidor en el año 2015 da a conocer cuatro marcas de miel que dicen ser miel, pero están adulteradas, esas marcas son: Azahar D’ Allende, Selecto Brand, Queen Bee escosa y Golden Hills, de las cuales sólo pudieron conseguirse las dos últimas.

3.3.1 Detección de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) en la miel

Las figuras siguientes (20 y 21), corresponden a los productos de la PCR con los primers para la detección de levadura en las mieles. Estos geles se llevaron a cabo con agarosa al 1% y fueron corridos a 90v.



En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+) correspondiente a *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), posteriormente en pocillos separados las muestras de miel de la uno a la cinco (Figura 20).

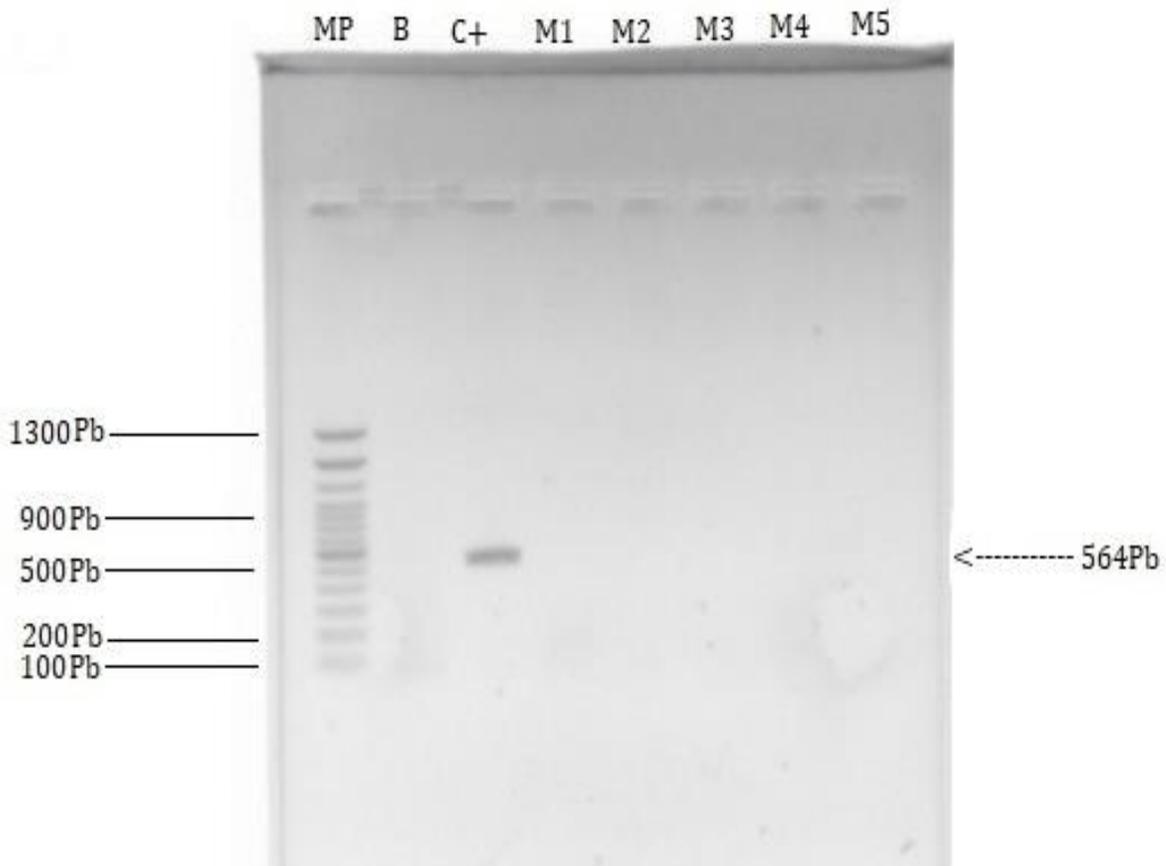


Figura 20. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de levadura en las muestras 1-5 de miel. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: Blanco, C+: Control positivo para levadura, M1: Muestra de miel del estado de México, M2: Muestra de miel del estado de Oaxaca. M3: Muestra de miel del estado de Puebla, M4: Muestra de miel del estado de Michoacán y M5: Muestra de miel del estado de

En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+) correspondiente a *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), posteriormente en pocillos separados las muestras de miel de la seis a la diez (Figura 21).

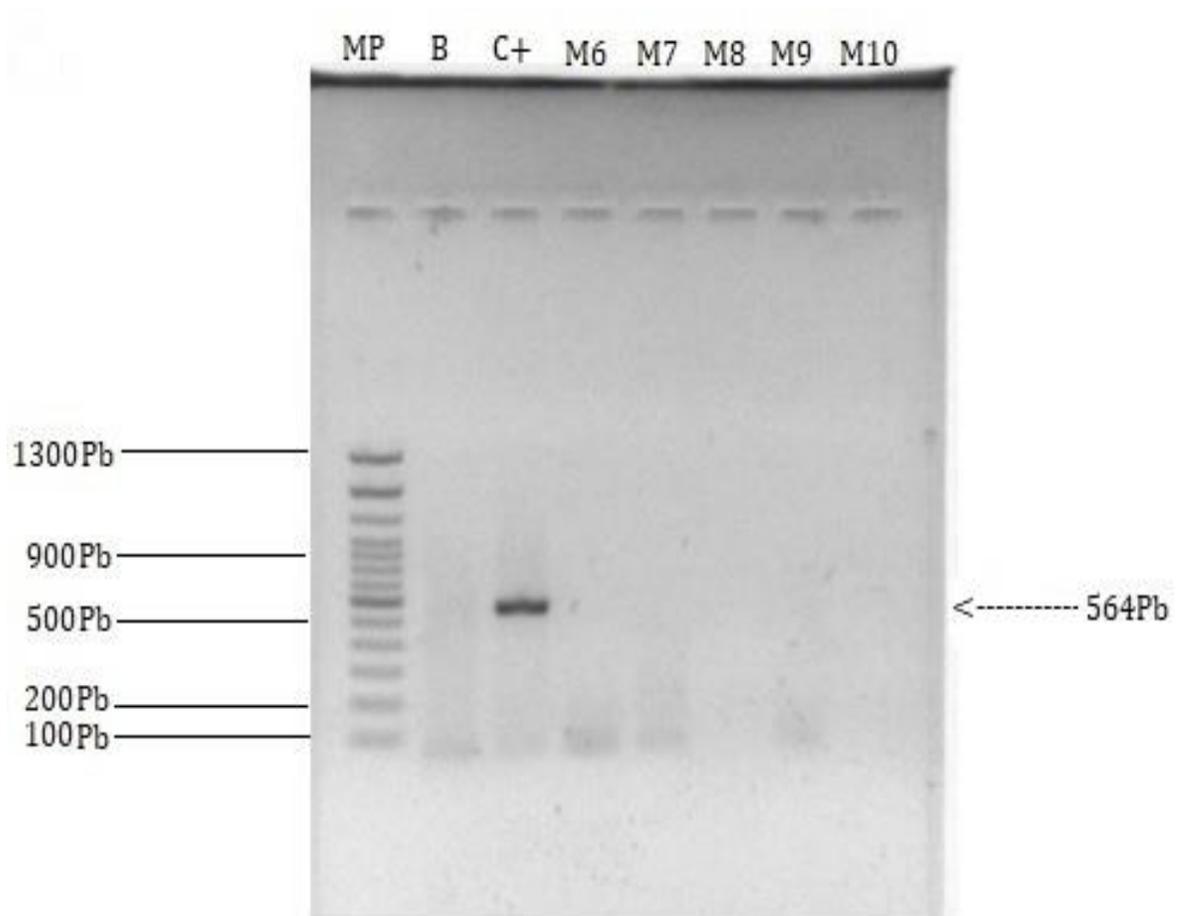


Figura 21. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de levadura en las muestras 6-10 de miel. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: blanco, C+: Control positivo para levadura, M6: Muestra de miel D’Gari, M7: Muestra de miel Golden hills, M8: Muestra de miel Queen Bee escosa, M9: Muestra de miel Carlota y M10: Muestra de miel Great Value.

Como se puede observar en las figuras 20 y 21, en ninguna de las muestras de miel se encuentra la presencia de levadura, ya que no se obtuvo ningún amplificado.

3.3.2 Detección de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) en la miel

Para identificar caña de azúcar en las mieles, se llevó a cabo una PCR. Y se visualizaron los resultados en un gel de agarosa al 1%, corrido a 90v. En las figuras 22 y 23, se pueden observar los productos de la PCR con los primers para caña de azúcar.

En la figura 22, en el primer carril se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+) correspondiente a *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), posteriormente en pocillos separados las muestras de miel de la uno a la cinco.



Se pueden observar dos amplificados en la muestra 2 (Miel de Oaxaca) y 5 (Miel de Yucatán), además del control positivo para caña de azúcar, con amplificados de 760Pb. Lo cual quiere decir que se detectó la presencia de caña de azúcar en las muestras de miel 2 y 5 que corresponden a mieles del estado de Oaxaca y Yucatán, respectivamente (Figura 22).

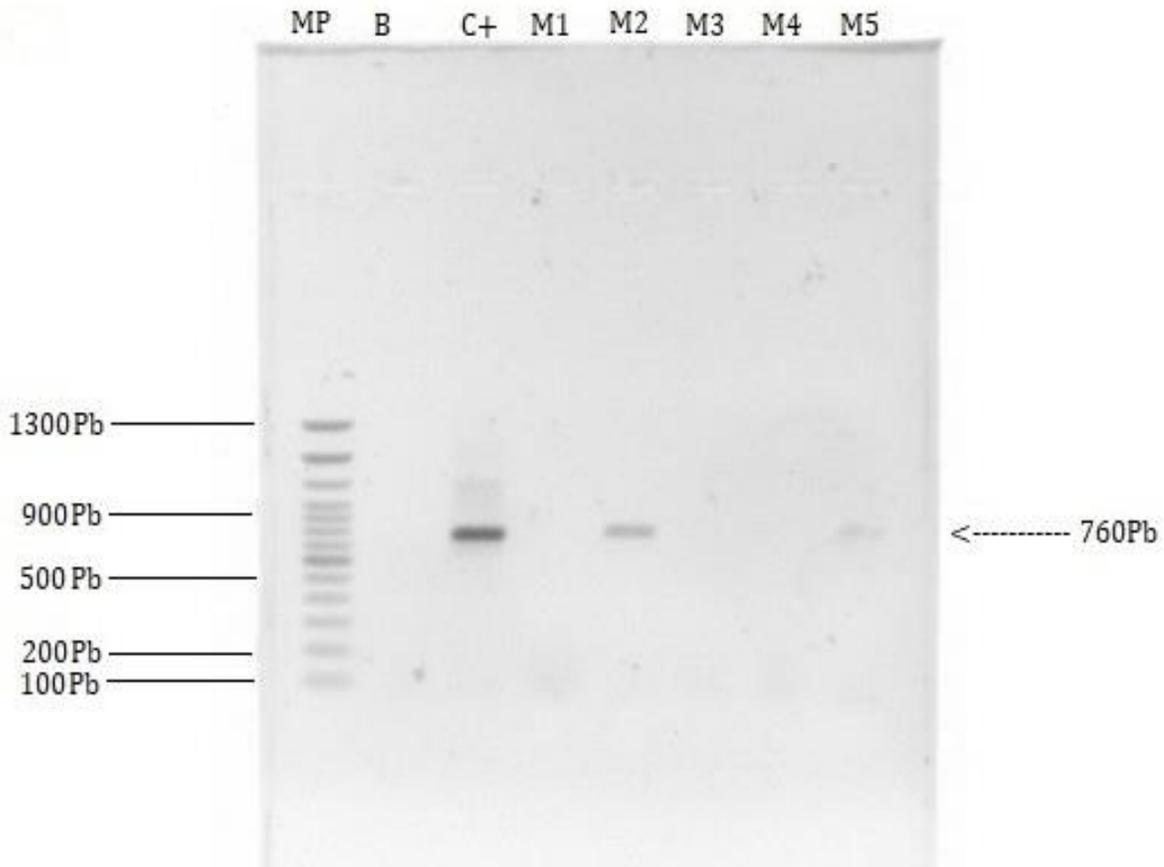


Figura 22. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de caña de azúcar en las muestras 1-5 de miel. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: Blanco, C+: Control positivo para levadura, M1: Muestra de miel del estado de México, M2: Muestra de miel del estado de Oaxaca. M3: Muestra de miel del estado de Puebla, M4: Muestra de miel del estado de Michoacán y M5: Muestra de miel del estado de Yucatán.

Y en la figura 23, en el primer carril se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+) correspondiente a *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), posteriormente en pocillos separados las muestras de miel de la seis a la diez.



Se observa un amplificado más, de 760pb en la muestra 7 (Miel Golden Hills), además del control positivo, lo que indica la presencia de caña de azúcar en esta muestra (Figura 23).

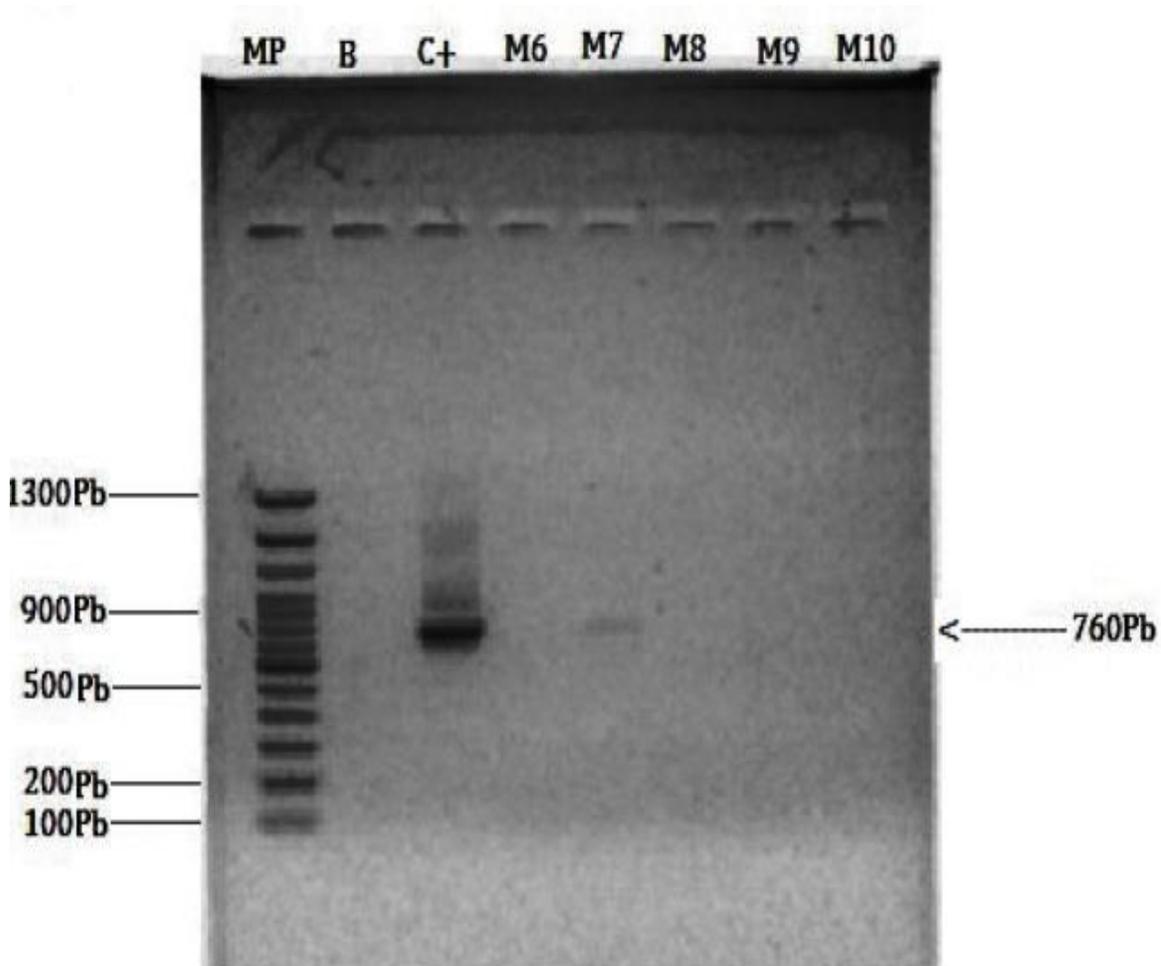


Figura 23. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de levadura en las muestras 6-10 de miel. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: blanco, C+: Control positivo para levadura, M6: Muestra de miel D'Gari, M7: Muestra de miel Golden hills, M8: Muestra de miel Queen Bee escosa, M9: Muestra de miel

3.3.3 Detección de *Zea mays* (maíz) en la miel

Por último, para detectar adulteraciones en las muestras de miel con maíz, se realizó la técnica de PCR con sus primers respectivos. Y posteriormente, se visualizaron los productos en un gel de agarosa al 1% y corrido a 90v.

En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+)



correspondiente a *Zea mays* (maíz), posteriormente en pocillos separados las muestras de miel de la uno a la cinco (Figura 24).

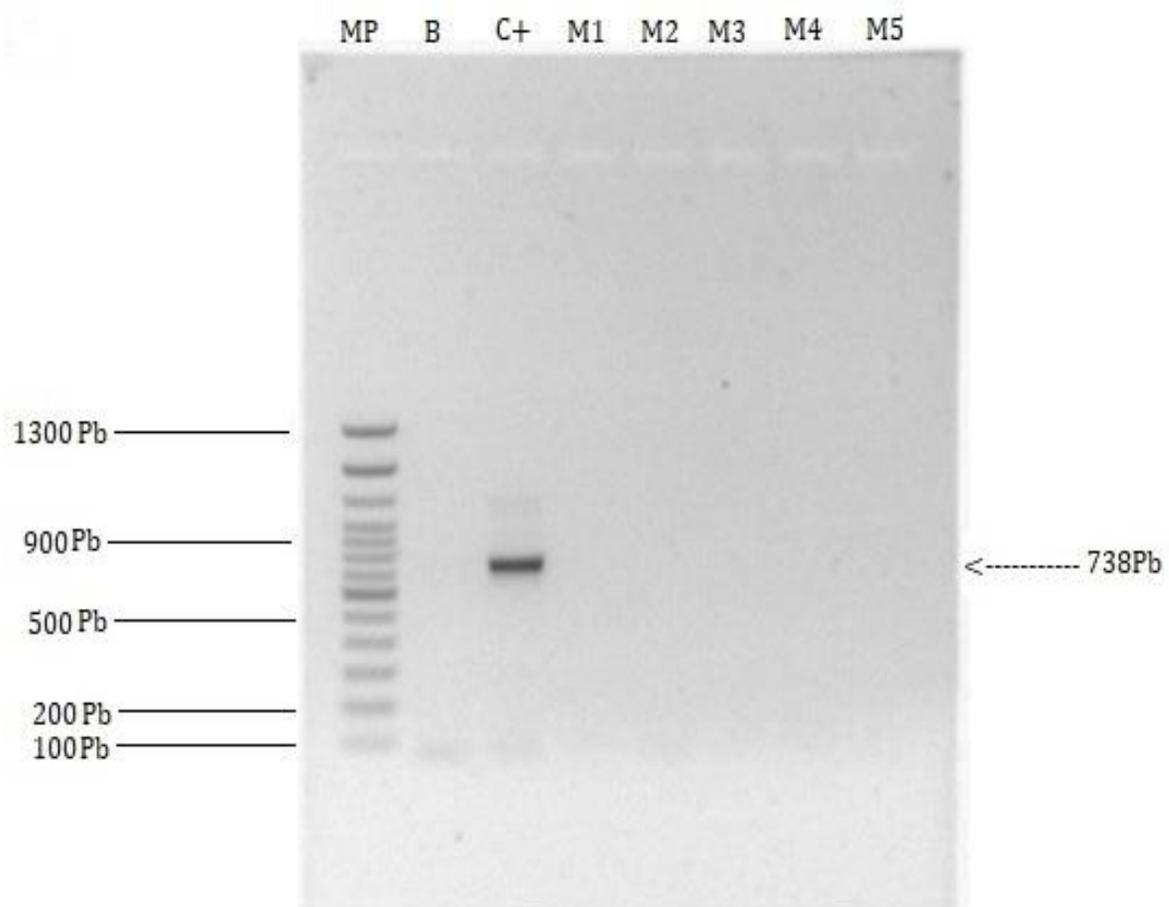


Figura 24. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de maíz en las muestras 1-5 de miel. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: Blanco, C+: Control positivo para levadura, M1: Muestra de miel del estado de México, M2: Muestra de miel del estado de Oaxaca. M3: Muestra de miel del estado de Puebla, M4:

En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular de 100pb (MP), en el segundo el control negativo o blanco (B), en el tercer carril el control positivo (C+) correspondiente a *Zea mays* (maíz), posteriormente en pocillos separados las muestras de miel de la seis a la diez (Figura 25).

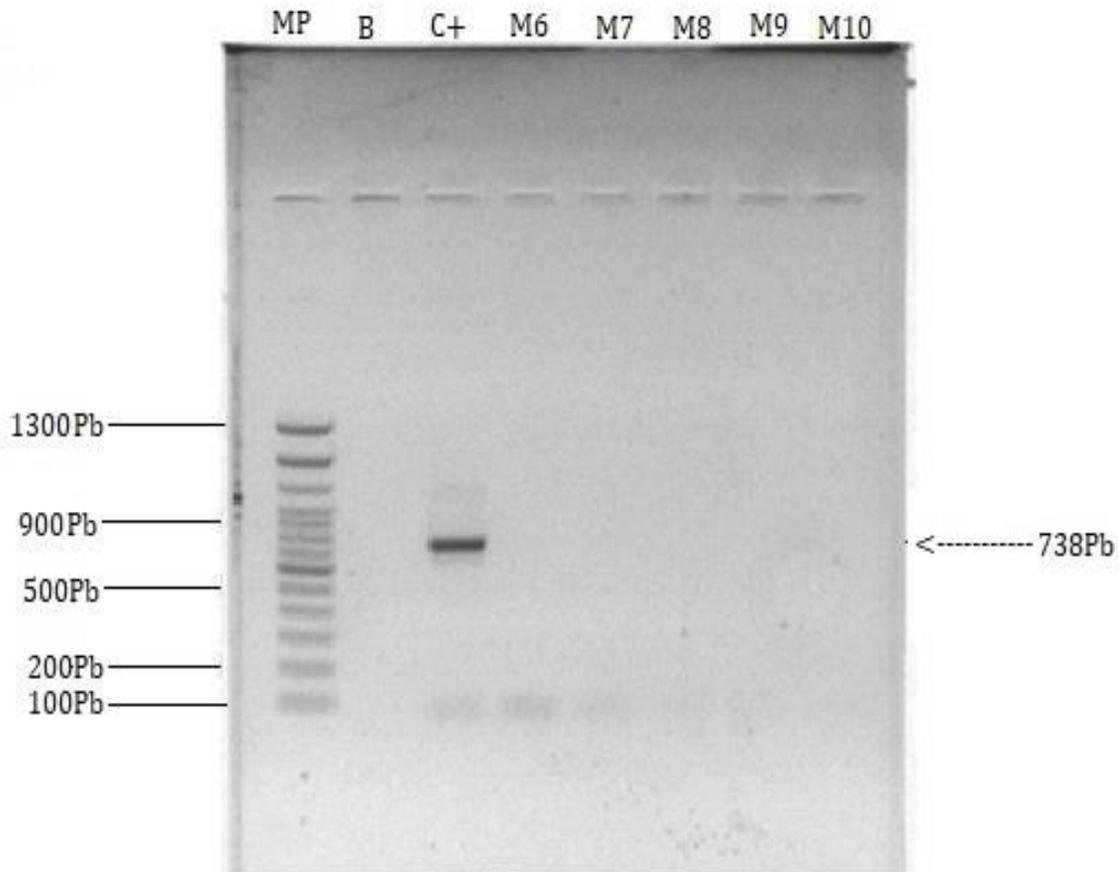


Figura 25. Gel de agarosa al 1% corrido a 90v, de la amplificación de los primers de maíz en las muestras 6-10 de miel. Donde: MP: Marcador de peso molecular, B: blanco, C+: Control positivo para levadura, M6: Muestra de miel D'Gari, M7: Muestra de miel Golden hills, M8: Muestra de miel Queen Bee escosa, M9: Muestra de miel Carlota y M10:

Como puede observarse en las figuras 24 y 25, no se observa ningún otro amplificado además del control positivo para maíz, lo que quiere decir que ninguna muestra de miel tiene presencia de maíz.

A lo largo de la elaboración de esta tesis, se encontraron con algunas limitantes como lo fue la escasez de estudios científicos recientes a cerca de la miel de abeja, es por esta razón que la elaboración de este proyecto es trascendente, ya que puede ser utilizada como una fuente para trabajos futuros que traten de este tópico.



Conclusiones.

Los primers diseñados para detectar adulteraciones con las especies de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) y *Zea mays* (maíz), cumplieron con las especificaciones correctas del diseño de primers obteniendo los amplificadores de 760pb, 564pb y 738pb respectivamente.

Para la especie *Zea mays*, los primers diseñados fueron específicos. Para la especie *Saccharum officinarum* y *Saccharomyces cerevisiae*, los primers diseñados indicaban ser específicos teóricamente, sin embargo, no fueron específicos al compararse con otras especies, pero se utilizaron para llevar a cabo la experimentación de manera exitosa.

Se evaluaron 10 muestras de miel de diferentes marcas y procedencia en las que no se detectó la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* ni de *Zea mays*. Sin embargo, en 3 de ellas se encontró la presencia de *Saccharum officinarum*.

La miel Golden Hills fue la única de las mieles de super mercado que se puede decir, está adulterada, al igual que las muestras de Oaxaca y Yucatán, las cuales fueron mieles sin etiqueta, compradas en recauderías y mercados fijos.

Sin embargo, debido a que los primers diseñados para caña de azúcar no fueron específicos, pudiera ser que fueron detectadas otras especies de plantas de las que las abejas obtienen el polen y no exclusivamente caña de azúcar como adulteración directa.

De acuerdo la Directiva 2001/110/CE del consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel, la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 y la PROY-NOM-004-SAG/GAN-2018, la miel no deberá contener ningún tipo de colorante, saborizante, conservador o inhibidores microbianos, en caso de contener otro ingrediente, no se podrá poner el nombre “miel” en el etiquetado y se deberá introducir la lista completa de ingredientes adicionados. Tampoco son permitidas las adulteraciones con agua, glucosa, fructosa, melazas, almidones, gomas, dextrinas, o cualquier otro tipo de azúcares o jarabes. Así mismo, es de suma importancia que todas las mieles cuenten con un etiquetado veraz.

Se sabe que las adulteraciones en miel son muy comunes, ya que en este producto es muy fácil engañar al consumidor en cuanto a lo que está adquiriendo, por lo que es importante informar a los consumidores sí se le adicionó algún ingrediente a la miel, ya que estos podrían desencadenar una reacción alérgica para algunas personas, dañando su salud.



Referencias

- Andrade, R.D., Torres, R. y Pérez, A.M. (2016). Efecto de la adición de Jarabes de Sacarosa y Fructuosa en el Comportamiento Reológico de Miel de Abejas. En *Información tecnológica*, 27(1), 3-8. doi: 10.467/50718-07642016000100002.
- Andy Vierstraete. (1999). *PCR image*. Principles of PCR. Recuperado de: <https://users.ugent.be/~avierstr/pdf/PCR.pdf>
- Avramenko, S. (2017). *Which Countries Consume the Most Honey?*. Recuperado de: <http://www.indexbox.co.uk/news/which-countries-consume-the-most-honey/>
- BBC Mundo. (2017). *Libro de medicina chino*. BBC News Mundo. Recuperado de: https://ichef.bbci.co.uk/news/624/cpsprodpb/3712/production/97089041_d2ff5466f5e45b4d87fcab83ca95.jpg
- Beltrán, B. (2016). *Prueba para detección de adulterantes o contaminantes*. México: Centro de Control Agroindustrial, S.A.
- Castro, A. (2017). *Adulteración de alimentos*. Recuperado de: <http://www.globalstd.com/certificacion/adulteracion-de-alimentos>
- Cavero, C. (2015). *Aplicación de la voltimetría de pulsos en la detección de la presencia de jarabes en miel de girasol*. (Tesis de maestría). Universitat Politècnica de Valencia, España.
- Consulado General de la República Argentina. (2017). *Chicago. Estudio de mercado MIEL*. Argentina: Ministerio de Relaciones Exteriores y Culto.
- Directiva 2001/110/CE del consejo de 20 de Diciembre de 2001 relativa a la miel. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 12-01-2002.
- El mundo. (2017). *Brusset: "La miel del supermercado es el mayor fraude."*. Recuperado de: <https://www.elmundo.es/vida-sana/estilo-y-gastro/2017/03/12/58c278bcca47414d638b45c4.html>
- Encyclopedia Britannica. (2006). *Honeybee insect*. Recuperado de: <https://www.britannica.com/animal/honeybee>
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L.E. Eguiarte, V. Sousa y X. Aguirre. (1era Ed.), *Ecología molecular* (pp.517-539). México: CONABIO.
- Food and Agriculture Organization. (2001). *Codex alimentarius norma para miel*. México: Autor.
- Food and Drug Administration. (2013). *Aspectos generales de la FDA requisitos clave: Norma definitiva de la Ley de Modernización de la Seguridad en los Alimentos (FSMA), para las estrategias de mitigación para proteger los alimentos contra la adulteración internacional*. EUA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos.



- Food and Drug Administration. (2018). *The Declaration of Added Sugars on Honey, Maple Syrup and certain Cranberry products: Draft guidance for industry availability*. EUA: Autor.
- Gardner, E.J., Simmons, M.J. y Snustad, D.P. (2017). *Principios de genética*. México: Limusa.
- Herman, E. A. (2013). La defensa alimentaria. En Ministerio de Agricultura (Presidencia). *Seminario Sobre El Material Biológico y la Bioseguridad en el Marco de la Convención de Armas Biológicas*. Seminario llevado a cabo en Santiago de Chile, Chile.
- Herrero, F. (2004). *Lo que vd. Debe saber sobre: Las abejas y la miel*. España: Caja España.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2017). *Diccionario de cáncer*. EUA: Autor
- Jain, S.A., Jesús, F.T., Marchioro, G.M. y Araújo, E.D. (2013). Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. En *Food Science and Technology*, 33(4), 753-756. Recuperado de: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v33n4/v33n4a22.pdf>
- Jean-Prost, P. (2007). *Apicultura: Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*. España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Jiménez, C. y Espino, J. (2013). *Genética: Conceptos esenciales*. España: Médica panamericana.
- Klug, W.S. y Cummings, M.R. (1999), *Conceptos de genética*. España: Prentice hall.
- La Vanguardia. (2016). *Más del 75% de la miel que se comercializa está adulterada*. Recuperado de: <https://www.lavanguardia.com/vivo/ecologia/20160915/41311557259/miel-adulterada-nutrientes-polen-ultra-filtracion.html>
- Lavandera, I. (2011). Curación de heridas sépticas con miel de abejas. En *Revista Cubana de Cirugía*, 30, 187-196. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu>
- Ley General de Salud, art. 464. Diario Oficial de la Federación, 2017.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudara, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursk, S.L. y Darnell, J. (2005). *Biología celular y molecular*. Argentina: Médica Panamericana.
- Luque, J. y Herráez, A. (2001). *Texto Ilustrado de biología molecular e Ingeniería genética*. España: Harcourt
- Mares, M. (2017). *Yucatán, Campeche y Jalisco, grandes productores de miel en México*. Recuperado de: <https://marcomares.productores-miel-mexico/>
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2009). *Lehninger Principios de bioquímica*. España: Ediciones Omega.
- Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006. Alimentos-miel-especificaciones y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación, 2007.
- Norma Mexicana NMX-F-416-S-1982. Productos alimenticios para uso humano, miel de abeja, métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación, 1982.



- Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas o alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria. Diario Oficial de la Federación, 2009.
- Paz y Miño, C. y Cortés, A. (2014). *Genética molecular citogenética humana: Fundamentos, aplicaciones e Investigaciones en el Ecuador*. Ecuador: YACHAY EP
- Pedrosa, A. (1999). Reacción en Cadena de la Polimerasa. En *Archivo Médico de Camagüey*, 3(2), 1-10. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011
- Pelayo, M. (2011). *Avances en la detección de adulteraciones alimentarias*. Recuperado de: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2011/05/19/200706.php>
- Pierce, B.A., Morando, A. y López, G. (2016). *Genética: Un enfoque conceptual*. España: Médica Panamericana.
- Pinilla, G., Cubillos, K. y Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En *NOVA*, 104, 65-75. doi: 10.22490/24629448.397.
- Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 20-12-2018.
- Revista del consumidor. (2015). Estudio de Calidad. Miel de Abeja. *Revista del consumidor*. México: Autor.
- Rico, C. y Cáceres, J.O. (2017). *Adulteración de Miel: Estado Actual y nuevas técnicas de Análisis*. España: Facultad de Ciencias Químicas Universidad Complutense de Madrid.
- S.A. (S.F.). *DNA imagen*. Pausa para nerdices. Recuperado de: <http://www.pausaparanerdices.com/wp-content/uploads/2016/07/Microsoft-grava-arquivo-em-DNA3.jpg>
- S.A. (S.F.). *Miel cristalizada*. Wikipedia. Recuperado de: https://es.wikipedia.org/wiki/Miel_cristalizada#/media/File:MielCristalizada.jpg
- S.A. (S.F.). *Sumerios imagen*. Miel Adictos. Recuperado de: <https://mieladictos.com/wp-content/uploads/2013/12/Sumerios-por-Geloso.gif>
- Roca, P., Oliver, J. y Rodríguez, A.M. (2003). *Bioquímica técnicas y métodos*. España: Hélice.
- Sambrook, J.Y. (2001). *Molecular cloning. A laboratory Manual*. EUA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2017). *La miel en México y el mundo*. México: Autor.
- Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2002). *Manual de buenas prácticas de producción de miel*. México: Autor.



- Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2011). *Notiabeja*. México: Autor.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2016). *Apicultura un arte endulzante*. México: Autor.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). *Atlas agroalimentario*. México: Autor.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. En *Tecnología en salud*, 2, 70-78. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- The Honey Regulations: Guidance Notes. (2003). *Food Standards Agency*. Reino Unido: Autor.
- Ulloa, J.A., Mondragón, P.M., Rodríguez, R., Reséndiz, J.A. y Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. En *Revista Fuente*, 2(4), 11-18.
- Voet, D. y Voet, J.G. (2006). *Bioquímica*. Argentina: Médica Panamericana.
- Zamora, L.G. y Arias, M.L. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abeja sin aguijón. En *Revista Biomédica*, 22, 59-66. Recuperado de: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb112223.pdf>
- Zandamela, E.M.F. (2008). *Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique*. (Tesis de doctorado). Universitat Autònoma de Barcelona. España.



ANEXOS

Anexo 1

Para el diseño de primers se hizo uso de la base de datos GENE BANK de la NCBI, en primer lugar, se seleccionó la opción de nucleótidos de la barra que se muestra a continuación:

The screenshot shows the NCBI Nucleotide database interface. At the top, there is a search bar with the text 'Nucleotide' and a 'Search' button. Below the search bar, a dropdown menu is open, listing various database categories. The 'Nucleotide' option is highlighted in blue. The main content area features a dark blue header with the text 'Nucleotide' and a description: 'The Nucleotide database is a collection of sequences from several sources, including GenBank, RefSeq, TPA and PDB. Genome, gene and transcript sequence data provide the foundation for biomedical research and discovery.' Below this, there are three columns of links: 'Using Nucleotide' (Quick Start Guide, FAQ, Help, GenBank FTP, RefSeq FTP), 'Nucleotide Tools' (Submit to GenBank, LinkOut, E-Utilities, BLAST, Batch Entrez), and 'Other Resources' (GenBank Home, RefSeq Home, Gene Home, SRA Home, INSDC). At the bottom, there is a footer with navigation links for 'GETTING STARTED', 'RESOURCES', 'POPULAR', 'FEATURED', and 'NCBI INFORMATION'.



Posterior a esto se escribió la especie de interés y se presionó el botón " Search".

Seguro | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search

Create alert Advanced Help

Species Summary 20 per page Sort by Default order Send to: Filters: Manage Filters

Animals (112)
Plants (3,217)
Fungi (1,191)
Protists (4)
Bacteria (3,190)
Viruses (260)
Customize ...

Molecule types
genomic DNA/RNA (7,430)
mRNA (514)
rRNA (12)
Customize ...

Source databases
INSDC (GenBank) (6,883)
RefSeq (1,090)
Customize ...

Genetic compartments
Chloroplast (215)
Mitochondrion (52)
Plasmid (2)
Plastid (216)

Sequence length
Custom range...

Release date
Custom range...

Items: 141 to 160 of 7974

<< First < Prev Page 8 of 399 Next > Last >>

[Saccharum officinarum clone cRGA6-NCO376 NBS-LRR-like resistance protein mRNA, partial](#)
141 [cds](#)
768 bp linear mRNA
Accession: EF155653.1 GI: 120564800
[Protein](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

[Saccharum officinarum clone cRGA5-NCO376 NBS-LRR-like resistance protein mRNA, partial](#)
142 [cds](#)
502 bp linear mRNA
Accession: EF155652.1 GI: 120564798
[Protein](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

[Saccharum officinarum clone cRGA4-NCO376 NBS-LRR-like resistance protein mRNA, partial](#)
143 [cds](#)
528 bp linear mRNA
Accession: EF155651.1 GI: 120564796
[Protein](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

[Saccharum officinarum clone cRGA3-NCO376 NBS-LRR-like resistance protein mRNA, partial](#)

Find related data
Database: Select
Find items

Search details
"Saccharum officinarum"[Organism] OR
Saccharum officinarum[All Fields]
Search See more...

Recent activity
Turn Off Clear
Q Saccharum officinarum (7974) Nucleotide
Saccharomyces cerevisiae strain CEN.PK113-7D mitochondrion, com Nucleotide
Saccharum officinarum clone LA84F06, complete sequence Nucleotide



Posteriormente se copió el GI de la cadena de ADN de interés y se copió en otro programa bioinformático llamado Primer Quest Tool IDT.

Seguro | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide

Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

[Saccharum officinarum cultivar Vellai 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1](#)

154. [partial sequence](#)
319 bp linear DNA
Accession: KT907420.1 GI: 1008911104
Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

[Saccharum officinarum clone LA84F06, complete sequence](#)

155. 78,139 bp linear DNA
Accession: KU685411.1 GI: **998454557**
Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

[Saccharum officinarum clone LA34B02, complete sequence](#)

156. 28,722 bp linear DNA
Accession: KU685410.1 GI: 998454555
Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

[Saccharum officinarum clone LA34B02, complete sequence](#)

157. 119,182 bp linear DNA
Accession: KU685409.1 GI: 998454555
Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

[Saccharum officinarum clone LA33C13, complete sequence](#)

158. 105,857 bp linear DNA
Accession: KU685408.1 GI: 998454554
Taxonomy
GenBank FASTA Graphics

Integrated DNA Technologies, Inc. [US] | https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index

PrimerQuest Tool

Assay Design / Results

/ Help / About

Sequence Entry

▸ Enter sequence(s) manually

▾ Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

NCBI ID#

Sequence Name

▸ Upload sequences in an Excel file

Hints

- Enter Genbank or Accession ID
- NM_001111 or 301601652
- Comma Separated for Batch
- NM_001234, 301601652
- Sequence length must be greater than 80 bases
- PrimerQuest accepts only nucleic acid bases

Choose Your Design



Después se dio clic en la opción “GET SEQUENCE” para que apareciera la secuencia de ADN seleccionada y posteriormente se dio clic en “PCR 2 primers”.

Integrated DNA Technologies, Inc. [US] | <https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>

Sequence Entry

- Enter sequence(s) manually
- Download sequence(s) using Genbank or Accession ID
 - NCBI ID#
 - ```
>GI# 998454557
TAAAGTGCCTCACCTATTTTCATTTTGATTGTGGGGGTCAACAAGAATTCATTATCAAGAACCTGAGCCAAGGAATCAAAACAGGAAAAATA
CATACTACATTAACAACCTCAAGCAGGAAATTTGCCACAGTAACAAGAAAGCATGTGCATCAATACCCGATGTATGTCACAGGCCCAACA
TTTCGGGTGGCAACTATGGGTAGACCATATGCAGCAGCCTAGAAAGAAAAAGAAAGATCAAATAACCTATGAATCATTAAACACGGGCA
TGAGTAAGCAAGGAAATATCAGAGAAGTAACCACTCAATCAAGGTGAGTCCAAATGGTTCATGAATGCACAATTGATAAAAACTCCCTG
AAAAATAGTTGAAACTCAACATTAGTTGTGAAAGTCAAGAATCAATCAGTAGATTTCTTAAAGTAAACTACAAAGAAAAACTGAATTATACTA
GCAAAACCAAAAGTTTCATCAGATAGCACATAAGATTATCAAAAAGTATCAACACTGGCAAGTTAGACATCCTATCACCTGCACGGCCT
GATAGCGAATTTGATGAAATAATACTCCCTCCATTCTTTCTAAATTGTTTTAGCTTTGTCTAAGTCAAACCTCTCTAGCTTTGACCAAGTTC
```
  - Sequence Name
- Upload sequences in an Excel file

**Hints**

- Enter Genbank or Accession ID
- NM\_001111 or 301601652
- Comma Separated for Batch
- NM\_001234; 301601652
- Sequence length must be greater than 80 bases
- PrimerQuest accepts only nucleic acid bases

### Choose Your Design

PCR  
2 Primers

qPCR  
2 Primers + Probe

qPCR  
2 Primers  
Intercalating Dyes

SHOW CUSTOM DESIGN PARAMETERS

Y por último se seleccionó el set primers de acuerdo con los criterios de selección de primers.



Set de primers para *Saccharum officinarum*

| Set 1 ACC# KU685411                |         |       |       |        |    |     |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|-----|
|                                    |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC% |
| Amplicon Length: 760               | Forward | 47489 | 47511 | 22     | 62 | 50  |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Reverse | 48227 | 48249 | 22     | 62 | 50  |

| Set 2 ACC# KU685411                |         |       |      |        |    |      |
|------------------------------------|---------|-------|------|--------|----|------|
|                                    |         | Start | Stop | Length | Tm | GC%  |
| Amplicon Length: 830               | Forward | 2337  | 2357 | 20     | 62 | 50   |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Reverse | 3146  | 3167 | 21     | 62 | 47.6 |

| Set 3 ACC# KU685411                |         |       |       |        |    |      |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|------|
|                                    |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
| Amplicon Length: 855               | Forward | 71581 | 71602 | 21     | 62 | 47.6 |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Reverse | 72416 | 72436 | 20     | 62 | 50   |

| Set 4 ACC# KU685411                |         |       |       |        |    |     |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|-----|
|                                    |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC% |
| Amplicon Length: 364               | Forward | 45874 | 45896 | 22     | 62 | 50  |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Reverse | 46216 | 46238 | 22     | 62 | 50  |

| Set 5 ACC# KU685411                |         |       |       |        |    |      |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|------|
|                                    |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
| Amplicon Length: 876               | Forward | 9779  | 9803  | 24     | 62 | 45.8 |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Reverse | 10635 | 10655 | 20     | 62 | 50   |

Para esta especie, se eligió el set número 1.



Set de primers para *Saccharomyces cerevisiae*

| Set 1 ACC# U32274.1                        |         |       |       |        |    |      |
|--------------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|------|
|                                            |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
| Amplicon Length: 509<br>View Assay Details | Forward | 41414 | 41434 | 20     | 62 | 50   |
|                                            | Reverse | 41901 | 41923 | 22     | 62 | 40.9 |

| Set 2 ACC# U32274.1                        |         |       |       |        |    |     |
|--------------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|-----|
|                                            |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC% |
| Amplicon Length: 382<br>View Assay Details | Forward | 52188 | 52210 | 22     | 62 | 50  |
|                                            | Reverse | 52548 | 52570 | 22     | 62 | 50  |

| Set 3 ACC# U32274.1                        |         |       |       |        |    |     |
|--------------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|-----|
|                                            |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC% |
| Amplicon Length: 564<br>View Assay Details | Forward | 51667 | 51689 | 22     | 62 | 50  |
|                                            | Reverse | 52209 | 52231 | 22     | 62 | 50  |

| Set 4 ACC# U32274.1                        |         |       |       |        |    |      |
|--------------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|------|
|                                            |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
| Amplicon Length: 795<br>View Assay Details | Forward | 32810 | 32832 | 22     | 62 | 45.5 |
|                                            | Reverse | 33584 | 33605 | 21     | 62 | 47.6 |

| Set 5 ACC# U32274.1                        |         |       |       |        |    |     |
|--------------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|-----|
|                                            |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC% |
| Amplicon Length: 686<br>View Assay Details | Forward | 14299 | 14321 | 22     | 62 | 50  |
|                                            | Reverse | 14965 | 14985 | 20     | 62 | 50  |

Para esta especie, se eligió el set número 3.



Set de primers para *Zea mays*

| Set 1 ACC# AF031569.1              |         |       |       |        |    |      |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|------|
| Amplicon Length: 949               |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Forward | 9845  | 9867  | 22     | 62 | 50   |
|                                    | Reverse | 10772 | 10794 | 22     | 62 | 45.5 |

| Set 2 ACC# AF031569.1              |         |       |       |        |    |     |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|-----|
| Amplicon Length: 738               |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC% |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Forward | 28315 | 28335 | 20     | 62 | 50  |
|                                    | Reverse | 29031 | 29053 | 22     | 62 | 50  |

| Set 3 ACC# AF031569.1              |         |       |       |        |    |      |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|------|
| Amplicon Length: 638               |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Forward | 71249 | 71269 | 20     | 62 | 50   |
|                                    | Reverse | 71865 | 71887 | 22     | 62 | 45.5 |

| Set 4 ACC# AF031569.1              |         |       |       |        |    |      |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|------|
| Amplicon Length: 989               |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Forward | 43402 | 43423 | 21     | 62 | 47.6 |
|                                    | Reverse | 44370 | 44391 | 21     | 62 | 47.6 |

| Set 5 ACC# AF031569.1              |         |       |       |        |    |      |
|------------------------------------|---------|-------|-------|--------|----|------|
| Amplicon Length: 569               |         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
| <a href="#">View Assay Details</a> | Forward | 51644 | 51664 | 20     | 62 | 50   |
|                                    | Reverse | 52191 | 52213 | 22     | 62 | 45.5 |

Para esta especie, se eligió el set número 2.



Los primers frontal y reverso se verificaron con la opción “Hairpin” para que estos no formasen alguna estructura diferente a las temperaturas del programa de PCR y con la opción “Blast” se aseguró que el par de primers tuviesen afinidad solo con la especie que se deseó amplificar.

Integrated DNA Technologies, Inc. [US] | <https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Results>

1 1000 2000 3000 4000 5000 6000 7000 8000 9000 10000 11000 12000 13000 14000 15000 16000 17000 18000 19000 20000 21000 22000 23000 24000 250

**ADD TO ORDER** In order to export results you must Login **CUSTOMIZE ASSAY DESIGN** **SHOW CUSTOM TARGET REGIONS**

Set 1 GI# 998454557

Amplicon Length: 760  
View Assay Details

|         | Start | Stop  | Length | Tm | GC% |
|---------|-------|-------|--------|----|-----|
| Forward | 47489 | 47511 | 22     | 62 | 50  |
| Reverse | 48227 | 48249 | 22     | 62 | 50  |

Set 2 GI# 998454557

Amplicon Length: 830  
View Assay Details

|         | Start | Stop | Length | Tm | GC%  |
|---------|-------|------|--------|----|------|
| Forward | 2337  | 2357 | 20     | 62 | 50   |
| Reverse | 3146  | 3167 | 21     | 62 | 47.6 |

Set 3 GI# 998454557

Amplicon Length: 855  
View Assay Details

|         | Start | Stop  | Length | Tm | GC%  |
|---------|-------|-------|--------|----|------|
| Forward | 71581 | 71602 | 21     | 62 | 47.6 |
| Reverse | 72416 | 72436 | 20     | 62 | 50   |



A continuación, se muestran las capturas de los Blast frontales y reversos de los primers seleccionados para las especies *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays*.

**Blast frontal de *Saccharum officinarum***

| Description                                                                                                                      | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------------------------|
| <a href="#">Saccharum officinarum clone LA84F06, complete sequence</a>                                                           | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij988454557/KU685411.1</a>      |
| <a href="#">Echinostoma caproni genome assembly_E_caproni_Egypt_scaffold_ECPE_scaffold0019577</a>                                | 40.1      | 40.1        | 90%         | 0.28    | 100%  | <a href="#">gij688602433/LL252932.1</a>      |
| <a href="#">PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. tauschii cytochrome P450 76C2-like (LOC109754904), mRNA</a>                      | 38.2      | 38.2        | 86%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gij1149822274/XM_020313795.1</a> |
| <a href="#">Sus scrofa genome assembly_chromosome_X</a>                                                                          | 38.2      | 8786        | 90%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gij1104468766/IL1634571.1</a>    |
| <a href="#">PREDICTED: Manacus vitellinus methyltransferase like 15 (METTL15), mRNA</a>                                          | 38.2      | 38.2        | 86%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gij1062862197/XM_018081852.1</a> |
| <a href="#">Cyprinus carpio genome assembly_common carp genome_scaffold_000001105</a>                                            | 38.2      | 38.2        | 86%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gij685049824/LN598336.1</a>      |
| <a href="#">Cyprinus carpio genome assembly_common carp genome_scaffold_LG2_chromosome: 2</a>                                    | 38.2      | 38.2        | 86%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gij685042187/LN590712.1</a>      |
| <a href="#">Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIA5Hv2043J04</a>                    | 38.2      | 38.2        | 86%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gij326530557/AK366502.1</a>      |
| <a href="#">Pig DNA sequence from clone CH242-224P4 on chromosome X, complete sequence</a>                                       | 38.2      | 98.6        | 86%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gij319402126/FP102488.8</a>      |
| <a href="#">Pig DNA sequence from clone CH242-208N6 on chromosome X, complete sequence</a>                                       | 38.2      | 68.4        | 86%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gij239935077/FP102110.5</a>      |
| <a href="#">PREDICTED: Quercus suber putative pentatricopeptide repeat-containing protein At3g01580 (LOC112012040), mRNA</a>     | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gij1344033955/XM_024044399.1</a> |
| <a href="#">PREDICTED: Hippocampus comes phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 6 (pk3r6), transcript variant X3, mRNA</a> | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gij1130005564/XM_019862410.1</a> |
| <a href="#">PREDICTED: Hippocampus comes phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 6 (pk3r6), transcript variant X2, mRNA</a> | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gij1130005562/XM_019862409.1</a> |
| <a href="#">PREDICTED: Hippocampus comes phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 6 (pk3r6), transcript variant X1, mRNA</a> | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gij1130005561/XM_019862408.1</a> |
| <a href="#">protein 1 (LOC104593933), transcript variant X6, mRNA</a>                                                            | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gij1100005560/XM_019862407.1</a> |

**Blast reverso de *Saccharum officinarum***

| Description                                                                        | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                               |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-----------------------------------------|
| <a href="#">Saccharum spontaneum clone SES23E05, complete sequence</a>             | 44.1      | 80.3        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij988454558/KU685412.1</a> |
| <a href="#">Saccharum officinarum clone LA84F06, complete sequence</a>             | 44.1      | 88.2        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij988454557/KU685411.1</a> |
| <a href="#">Saccharum officinarum clone LA154P24, complete sequence</a>            | 44.1      | 80.3        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij988454552/KU685406.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570_BAC clone Sh128J07</a>                  | 44.1      | 88.2        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij727345922/HG531791.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570_BAC clone Sh113J05</a>                  | 44.1      | 88.2        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij727345914/HG531789.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 254D06, complete sequence</a> | 44.1      | 176         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279531/KF184912.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 268F20, complete sequence</a> | 44.1      | 168         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279520/KF184906.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 021E20, complete sequence</a> | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279499/KF184853.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 004J16, complete sequence</a> | 44.1      | 132         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279411/KF184819.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 102P01, complete sequence</a> | 44.1      | 132         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279372/KF184796.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 015H09, complete sequence</a> | 44.1      | 124         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279309/KF184759.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 170G03, complete sequence</a> | 44.1      | 396         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279256/KF184729.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 098M18, complete sequence</a> | 44.1      | 88.2        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279245/KF184722.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 168M03, complete sequence</a> | 44.1      | 80.3        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279083/KF184904.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 201A23, complete sequence</a> | 44.1      | 158         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279024/KF184884.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 172K24, complete sequence</a> | 44.1      | 132         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530279016/KF184881.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 103C06, complete sequence</a> | 44.1      | 82.3        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530278943/KF184824.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 015N03, complete sequence</a> | 44.1      | 216         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530278819/KF184815.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 154P17, complete sequence</a> | 44.1      | 168         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530278794/KF184812.1</a> |
| <a href="#">Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 258H24, complete sequence</a> | 44.1      | 162         | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gij530278769/KF184809.1</a> |



## Blast frontal de *Saccharomyces cerevisiae*

| Alignments <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a> |           |             |             |         |       |                                          |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------------------------------------|--|
| Description                                                                                                                   | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                                |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain CEN PK113-7D chromosome IV, complete sequence</a>                                 | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1329886529 CP022969.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain UWOPS03-461.4 chromosome IV, complete sequence</a>                                | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163011376 CP020228.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain YPS128 chromosome IV, complete sequence</a>                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163011074 CP020211.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain Y12 chromosome IV, complete sequence</a>                                          | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163002709 CP020194.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain SK1 chromosome IV, complete sequence</a>                                          | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163002325 CP020177.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain DBVPG6765 chromosome IV, complete sequence</a>                                    | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163001983 CP020160.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain DBVPG6044 chromosome IV, complete sequence</a>                                    | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163001656 CP020143.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain S288c chromosome IV, complete sequence</a>                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163001453 CP020126.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1573 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569198 CP004748.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1447 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569196 CP004738.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1402 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569195 CP004728.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1381 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569193 CP004718.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1307 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569189 CP004708.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1199 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569188 CP004698.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM981 chromosome IV sequence</a>                                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569184 CP004688.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM627 chromosome IV sequence</a>                                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569183 CP004678.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM326 chromosome IV sequence</a>                                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569182 CP004668.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1549 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266190 CP004747.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1401 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266189 CP004727.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1356 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266188 CP004717.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1304 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266187 CP004707.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1190 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266185 CP004697.2</a> |  |

Questions/comment

## Blast reverso de *Saccharomyces cerevisiae*

| Alignments <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a> |           |             |             |         |       |                                          |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------------------------------------|--|
| Description                                                                                                                   | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                                |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain CEN PK113-7D chromosome IV, complete sequence</a>                                 | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1329886529 CP022969.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain UWOPS03-461.4 chromosome IV, complete sequence</a>                                | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163011376 CP020228.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain YPS128 chromosome IV, complete sequence</a>                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163011074 CP020211.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain Y12 chromosome IV, complete sequence</a>                                          | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163002709 CP020194.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain DBVPG6765 chromosome IV, complete sequence</a>                                    | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163001983 CP020160.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain S288c chromosome IV, complete sequence</a>                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1163001453 CP020126.1</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1573 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569198 CP004748.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1447 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569196 CP004738.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1402 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569195 CP004728.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1381 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569193 CP004718.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1307 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569189 CP004708.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1199 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569188 CP004698.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM981 chromosome IV sequence</a>                                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569184 CP004688.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM326 chromosome IV sequence</a>                                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1115569182 CP004668.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1549 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266190 CP004747.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1401 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266189 CP004727.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1356 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266188 CP004717.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1304 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266187 CP004707.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1190 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266185 CP004697.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM978 chromosome IV sequence</a>                                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266181 CP004687.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM555 chromosome IV sequence</a>                                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266179 CP004677.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM320 chromosome IV sequence</a>                                                        | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266177 CP004675.2</a> |  |
| <a href="#">Saccharomyces cerevisiae YJM1577 chromosome IV sequence</a>                                                       | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 1067266175 CP004673.2</a> |  |

Questions/comment



**Blast frontal de *Zea mays***

| Description                                                                                                                                                                     | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Zea mays</i> uncharacterized LOC100274608 (LOC100274608), transcript variant X13, mRNA                                                   | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 1315014680 XM_023300477.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Zea mays</i> uncharacterized LOC100274608 (LOC100274608), transcript variant X11, mRNA                                                   | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 1315014677 XM_023300476.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> centromere 10 B73 genomic sequence                                                                                                     | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 963560154 IKT989678.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> clone BAC c0017A20/c00174F14, complete sequence                                                                                        | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 238836899 GQ184457.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> BAC clone CH201-459P15 from chromosome 5, complete sequence                                                                            | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 285694258 AC216070.4</a>      |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> BAC clone CH201-150M20 from chromosome 10, complete sequence                                                                           | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 283764900 AC226721.2</a>      |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> clone 1166454 mRNA sequence                                                                                                            | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 195593245 EU940889.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> 22-kDa alpha zein gene cluster, complete sequence                                                                                      | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 2832242 AF031569.1</a>        |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> clone ZMMBBb-188L18, complete sequence                                                                                                 | 40.1      | 80.3        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 76573932 AC165177.2</a>       |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> rust resistance protein rp3-1 (rp3-1) gene, complete cds, and truncated rust resistance protein rp3-2l (rp3-2) gene, complete sequence | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 45934294 AY574035.1</a>       |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> clone ZMMBBb-177G21, complete sequence                                                                                                 | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 71037447 AC165176.2</a>       |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> 22 kDa alpha zein gene cluster, complete sequence                                                                                      | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 13606087 AF090447.2</a>       |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> cultivar Mo17 locus 9009, complete sequence                                                                                            | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 55741096 AY654419.1</a>       |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> cultivar B73 locus 9009, complete sequence                                                                                             | 40.1      | 40.1        | 100%        | 0.28    | 100%  | <a href="#">gi 55741054 AY644415.1</a>       |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Drosophila fusciphila</i> nipped-B protein-like (LOC108101974), mRNA                                                                     | 36.2      | 36.2        | 90%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1036684231 XM_017260571.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <i>Diphyllobothrium latum</i> genome assembly D. latum, Geneva, scaffold DILT_scaffold0000161                                                          | 36.2      | 36.2        | 90%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 689064176 ILL570142.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> cultivar Mo17 locus bz, complete sequence                                                                                              | 36.2      | 104         | 100%        | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 55741072 AY664416.1</a>       |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Xiphophorus maculatus</i> synaptonemal complex protein 2 like (svcp2), mRNA                                                              | 34.2      | 34.2        | 85%         | 17      | 100%  | <a href="#">gi 1316079513 XM_023326808.1</a> |
| <input type="checkbox"/> <i>Gossypium hirsutum</i> cultivar TM1 chromosome D12                                                                                                  | 34.2      | 34.2        | 85%         | 17      | 100%  | <a href="#">gi 1253338737 CP023742.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Papio anubis</i> uncharacterized LOC103879170 (LOC103879170), transcript variant X3, ncRNA                                               | 34.2      | 34.2        | 85%         | 17      | 100%  | <a href="#">gi 1220186628 XR_002518299.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Papio anubis</i> uncharacterized LOC103879170 (LOC103879170), transcript variant X2, ncRNA                                               | 34.2      | 34.2        | 85%         | 17      | 100%  | <a href="#">gi 122</a>                       |

Questions/commen

**Blast reverso de *Zea mays***

| Description                                                                                                 | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> 22-kDa alpha zein gene cluster, complete sequence                  | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 2832242 AF031569.1</a>    |
| <input type="checkbox"/> <i>Zea mays</i> 22 kDa alpha zein gene cluster, complete sequence                  | 44.1      | 44.1        | 100%        | 0.018   | 100%  | <a href="#">gi 13606087 AF090447.2</a>   |
| <input type="checkbox"/> <i>Pseudomonas azotoformans</i> strain LMG 21611 genome assembly, chromosome 1     | 38.2      | 38.2        | 86%         | 1.1     | 100%  | <a href="#">gi 1085693067 LT629702.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 3 isolate VZVs/SanDimas, CA, USA/17.12/Z_9, complete genome | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1150191157 KY037798.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 3 isolate 278, complete genome                              | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1150191083 KY037797.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 3 isolate 092, complete genome                              | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1150191009 KY037796.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 isolate VZVs/Pasadena, USA/11.13/2VZ, complete genome          | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 810056661 KP702725.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> <i>Pseudomonas rhodesiae</i> strain BS2777 genome assembly, chromosome 1           | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1086072949 LT629801.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 isolate Var/Cli/UK/Ves/2909/2013, partial genome               | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1063059348 X262866.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 isolate Var/Cli/UK/Ves/1310/2013, partial genome               | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1063059274 X262865.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 isolate Var/Cli/UK/Ves/0803/2013, partial genome               | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1063059200 X262864.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone YC03p110, complete genome                                | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323753 KU926322.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone YC03p61, complete genome                                 | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323678 KU926321.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone YC02p110, complete genome                                | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323603 KU926320.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone YC02p61, complete genome                                 | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323528 KU926319.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone YC01p110, complete genome                                | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323455 KU926318.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone YC01p61, complete genome                                 | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323380 KU926317.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone YC01p32, complete genome                                 | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323305 KU926316.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone YC01p14, complete genome                                 | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323230 KU926315.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone Varivax1, complete genome                                | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 1043323155 KU926314.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Human herpesvirus 3 clone Varilix1, complete genome                                | 36.2      | 36.2        | 81%         | 4.4     | 100%  | <a href="#">gi 104</a>                   |

Questions/com



## Anexo 2

Para realizar el cálculo de la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) de manera manual de cada uno de los primers frontal y reverso se hizo uso de la siguiente ecuación:

$$T_m = [(G+C)*4] + [(A+T)*2] - 5$$

Dónde:

- ⇒ G es el número de guaninas.
- ⇒ C es el número de citosinas.
- ⇒ A es el número de adeninas.
- ⇒ T es el número de timinas.
- ⇒ -5 es un factor de corrección.

Por lo que las  $T_m$  de todos los primers utilizados fueron:

### Saccharum officinarum

| Primer         | Secuencia                     | Amplificado |
|----------------|-------------------------------|-------------|
| Primer frontal | CCG CTT CTC TGT CAT GTC TAT C | 760pb       |
| Primer reverso | CCG GAA CTA ACC GTC CTT AAT C |             |

Cálculo de  $T_m$  para primer frontal:

C=8; G=3; A=2; T=9

$$T_m = [(3+8)*4] + [(2+9)*2] - 5 = 61^\circ\text{C}$$

Por lo que la  $T_m$  del primer frontal es de  $61^\circ\text{C}$ .

Cálculo de  $T_m$  para primer reverso:

C=8; G=3; A=6; T=5

$$T_m = [(3+8)*4] + [(6+5)*2] - 5 = 61^\circ\text{C}$$

Por lo que la  $T_m$  del primer frontal es de  $61^\circ\text{C}$  al igual que la  $T_m$  del primer reverso y no hay necesidad de sacar un promedio.

### Saccharomyces cerevisiae

| Primer         | Secuencia                     | Amplificado |
|----------------|-------------------------------|-------------|
| Primer frontal | CTT GAG GCT AGG AGC GTT ATT C | 564pb       |
| Primer reverso | CCT CCA CCT CGT TTC TTA GTT C |             |

Cálculo de  $T_m$  para primer frontal:



C=4; G=7; A=4; T=7

$$T_m = [(7+4)*4] + [(4+7)*2] - 5 = 61^{\circ}\text{C}$$

Cálculo de  $T_m$  para primer reverso:

C=9; G=2; A=2; T=9

$$T_m = [(2+9)*4] + [(2+9)*2] - 5 = 61^{\circ}\text{C}$$

Por lo que la  $T_m$  del primer frontal es de  $61^{\circ}\text{C}$  al igual que la  $T_m$  del primer reverso y no hay necesidad de sacar un promedio.

Zea mays

| Primer         | Secuencia                     | Amplificado |
|----------------|-------------------------------|-------------|
| Primer frontal | CAC GTG TCC TCA CTG CTA AA    | 738pb       |
| Primer reverso | CTA CGA TTG GGT GGT GGA TAA G |             |

Cálculo de  $T_m$  para primer frontal:

C=7; G=3; A=5; T=5

$$T_m = [(3+7)*4] + [(5+5)*2] - 5 = 55^{\circ}\text{C}$$

Cálculo de  $T_m$  para primer reverso:

C=2; G=9; A=5; T=6

$$T_m = [(9+2)*4] + [(5+6)*2] - 5 = 61^{\circ}\text{C}$$

Cálculo de promedio entre  $T_m$  de primers reverso y frontal:

$$T_m \text{ prom} = (T_m \text{ primer frontal} + T_m \text{ primer reverso}) / 2$$

$$T_m \text{ prom} = (55^{\circ}\text{C} + 61^{\circ}\text{C}) / 2 = 58^{\circ}\text{C}$$

Debido a que la  $T_m$  del primer frontal es de  $55^{\circ}\text{C}$  y la  $T_m$  del primer reverso es de  $61^{\circ}\text{C}$  se prosiguió a obtener un promedio entre ambas, resultando una  $T_m$  promedio de  $58^{\circ}\text{C}$ .