



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

“IDENTIFICACIÓN DE ADN DE ESPECIES DE BOVINO, PORCINO,
POLLO Y PESCADO EN GELATINAS COMERCIALES, MEDIANTE LA
TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JESÚS TONATIUH CEDILLO NIETO

Asesores: Dr. José Francisco Montiel Sosa
Dra. Ana Elvia Sánchez Mendoza

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
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 la: **Tesis y Examen Profesional**

Identificación de ADN de especies de bovino, porcino, pollo y pescado en gelatinas comerciales mediante la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

Que presenta el pasante: **Jesus Tonatiuh Cedillo Nieto**
Con número de cuenta: **314040275** para obtener el título de: **Ingeniero en Alimentos**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Octubre de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|-------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dr. José Francisco Montiel Sosa | |
| VOCAL | Dra. Susana Patricia Miranda Castro | |
| SECRETARIO | M. en C. Tais Nopal Guerrero | |
| 1er. SUPLENTE | I.A. Miriam Alvarez Velasco | |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Karla Aguilar Lara | |

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

El autor de la presente agradece de manera especial y sincera al Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME): “Desarrollo de herramientas digitales para fortalecer el proceso de enseñanza-aprendizaje de la asignatura de Bioquímica en la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia” con clave: PE211521 y al proyecto de cátedra: “Marcador mitocondrial y nuclear en diferentes fenotipos de especies de importancia biomédica, alimentaria y biotecnológica” con clave: CI2247 por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios** por esta segunda oportunidad que me dio de vivir, por brindarme su mano, acompañarme y guiarme a lo largo de mi vida y mi carrera, por ser mi fuerza inextinguible, mi luz y mi inteligencia, en este trabajo de tesis y todos mis proyectos, por haberme otorgado una familia extraordinaria y magnífica, quienes han sido un ejemplo de superación personal y apoyo incondicional.

A mis abuelos **Inocencio Nieto** y **Marcela López**, por transmitirme todas sus vivencias, principios e inculcarme los valores de la empatía, respeto, paz, solidaridad, honradez y responsabilidad, muchas gracias por ser las personas que después de mis padres se preocuparon por mantenerme con bien y cuidarme.

A mis padres **Ignacio Cedillo Villagran** y **Marcela Guadalupe Nieto López** por permitirme existir y darme los regalos del amor, la vida, la educación y la humildad, forjándome como el hombre que hoy soy, por enseñarme que todo se logra con esfuerzo y dedicación, ya que muchos de mis logros se los agradezco incluyendo este, porque sin su apoyo no habría podido llegar hasta donde estoy en la actualidad.

A mi hermano **Omar** por brindarme su impulso, apoyo y cariño sin límites, por nunca dejarme solo, por apoyarme en la toma de decisiones, por escucharme y por confiar en mí, sin tu compañía este largo viaje sería impensable.

A mis **profesores** y **profesoras** les doy las gracias por la gran labor que desempeñan día con día, a la hora de impartir sus clases y transmitir sus conocimientos con humildad y honestidad, por enseñarme todo lo que se y brindarme las herramientas necesarias para avanzar con paso firme, soñar tan alto y alcanzar todos mis objetivos y metas, en especial quiero agradecer a la **I.A Maria Guadalupe López Franco** y a la **Dra. Maria del Carmen Valderrama Bravo** quienes desde un inicio depositaron en mí su confianza, me guiaron en mis decisiones profesionales y de quienes he adquirido miles de conocimientos, por sus consejos, por su cariño brindado a nosotros sus alumnos, muchas gracias.

A **Shehin Mora Elena** por tu amistad tan bella y honesta, por tener siempre la palabra perfecta en el momento indicado, por tu complicidad, por nuestras vivencias y porque juntos superamos grandes y pequeños obstáculos, me alegra mucho haber coincidido contigo, con esto reforzamos el valioso e inquebrantable que lazo que nos une, por esto y más, te quiero, estimo y aprecio bastante, infinitas gracias.

A **Castañeda Reyes Yeimi Joselyn** por todas esas veces que trabajamos juntos en clases, en experimentaciones, por brindarme tu calidez, sencillez, amistad y cariño, por recorrer conmigo este camino, donde hubo tropiezos, pero nos levantamos, por eso y más gracias.

A mis amigos y compañeros: **Huesca Garrido Luis Alejandro**, **Ramírez Sánchez Daniela**, **Valdez Flores Daniel Alejandro**, **Torres Ruiz Juan Manuel**, **Vilchis Fonseca Xavier Sebastián**, **Alan braulio**, **Israel Gámez** y **Vázquez Lorena** por los momentos incomparables e inolvidables que hemos compartido, gracias por brindarme todo su apoyo cuando lo necesitaba, por su confianza, compañía y amistad, gracias.

“No importa con cuánta fuerza lo intentas, lo que importa es cuántas veces regresas y lo repites”.

Daniel Habif

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Al **Dr. José Francisco Montiel Sosa** a quien hago llegar mis más sinceros agradecimientos, por el apoyo que a su servidor siempre brindo, por su confianza, su tiempo, sus consejos y la oportunidad de realizar mi tesis con usted, gracias por esa gran labor que realiza al impartir clases e investigar, contribuyendo con herramientas de conocimiento para la sociedad, y sobre todo le agradezco por mostrarme e iniciarme en este mundo extraordinario y sorprendente de la biología molecular.

A la **Dra. Ana Elvia Sánchez Mendoza** por la oportunidad tan grande de poder aprender de usted y con usted, por su confianza, su constante apoyo, sus indicaciones y orientaciones, su tiempo y sus conocimientos que muy amablemente compartió con un servidor a lo largo de mi experimentación y también en mi vida diaria, gracias por transmitirme parte de su sabiduría para avanzar un peldaño más y para ser mejor persona, muchas gracias doctora, estaré siempre agradecido con usted.

A la **M. en C. Josefina Moreno Lara** por su tiempo, su apoyo y sus consejos, también por brindarme ánimos cuando los necesitaba, para poder concluir satisfactoriamente este proyecto y por sus experiencias brindadas, muchas gracias.

A la **Dra. Susana Patricia Miranda Castro** por su apoyo en la revisión y elaboración de esta tesis, por compartir con un servidor sus valiosos conocimientos durante las clases de taller de biotecnología, por su tiempo y su atención siempre brindadas.

A la **M. en C. Tais Nopal Guerrero** por su apoyo, conocimientos, tiempo y valiosas correcciones brindadas durante la revisión y elaboración de esta tesis, gracias por su especial colaboración.

A la **I.A Miriam Álvarez Velasco** por sus conocimientos brindados durante las clases de química de alimentos y fuera de ellas, por su tiempo y su apoyo brindados y le agradezco mucho por sus correcciones realizadas en la revisión de esta tesis, gracias por su colaboración.

A la **I.A Mayra Vaely Coronel Flores** por compartir con un servidor sus valiosos conocimientos durante las clases de taller de biotecnología en compañía de la doctora Paty Miranda, por su apoyo y sobre todo por ayudarme en la elección de este proyecto, siempre será un placer haber sido su alumno.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que me ha dado las herramientas necesarias para contribuir al avance de esta sociedad y que me ha formado como hombre, como profesional y como un ciudadano de bien.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Contenido

| | |
|---|----|
| Índice de figuras | 3 |
| Índice de cuadros | 5 |
| Introducción | 6 |
| Cap.1 Generalidades..... | 7 |
| 1.1. Colágeno..... | 8 |
| 1.1.1. Biosíntesis de colágeno | 9 |
| 1.1.2. Estructura química | 11 |
| 1.1.3. Tipos de colágeno..... | 12 |
| 1.2. Grenetina..... | 15 |
| 1.3. Gelatina..... | 15 |
| 1.3.1. Composición química de la gelatina | 16 |
| 1.3.2. Propiedades y características tecnológicamente importantes de la gelatina ... | 17 |
| 1.4.3.1. Formación, viscosidad y textura del gel | 18 |
| 1.3.3. Grados Bloom | 19 |
| 1.3.4. Tipos de gelatina..... | 21 |
| 1.3.5. Gelatina animal | 22 |
| 1.3.6. Gelatina de cuero y huesos de vaca (<i>Bos taurus</i>) | 22 |
| 1.3.7. Gelatina de piel de cerdo (<i>Sus scrofa domesticus</i>)..... | 23 |
| 1.3.8. Gelatina de cola de pescado (<i>Oreochromis niloticus</i>)..... | 23 |
| 1.3.9. Gelatina de Patas de pollo (<i>Gallus gallus domesticus</i>)..... | 24 |
| 1.3.10. Gelatina vegetal..... | 25 |
| 1.3.11. Producción de grenetina y gelatina en México | 26 |
| 1.3.12. Producción Mundial..... | 28 |
| 1.3.13. Beneficios del consumo de gelatina..... | 33 |
| 1.3.14. Aplicaciones..... | 35 |
| 1.4. Integridad y autenticidad de los alimentos..... | 36 |
| 1.5. Riesgos en la salud por el consumo de gelatina | 37 |
| 1.6. Legislación mexicana establecida para definir y regular las gelatinas..... | 38 |
| 1.7. Técnicas de autenticación de especies | 40 |
| 1.7.1. El ADN..... | 40 |
| 1.7.1.1. Tipos de ADN | 41 |
| 1.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 43 |
| 1.7.2.1. Características de la amplificación in vitro y requerimientos necesarios para la PCR | 43 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 1.7.2.1.1. | ADN polimerasa..... | 44 |
| 1.7.2.1.2. | ADN molde..... | 44 |
| 1.7.2.1.3. | Desoxinucleótidos..... | 45 |
| 1.7.2.1.4. | Amortiguador..... | 45 |
| 1.7.2.1.5. | Cloruro de magnesio | 45 |
| 1.7.2.1.6. | Iniciadores..... | 45 |
| 1.7.2.1.7. | Diseño de iniciadores y su papel en la especificidad de la PCR..... | 46 |
| 1.7.2.2. | Etapas de la PCR..... | 47 |
| 1.7.2.3. | Variantes de la técnica de PCR | 49 |
| 1.7.2.3.1. | PCR punto final..... | 50 |
| 1.7.3. | Electroforesis..... | 50 |
| Cap. 2 | Metodología experimental | 51 |
| 2.1. | Justificación..... | 51 |
| 2.2. | Objetivos | 52 |
| 2.2.1. | Objetivo general | 52 |
| 2.2.3. | Objetivo particular 2 | 52 |
| 2.2.4. | Objetivo particular 3 | 52 |
| 2.3. | Cuadro metodológico..... | 53 |
| 2.4. | Material Biológico..... | 54 |
| 2.5. | Reactivos, materiales y equipos para la extracción de ADN | 58 |
| 2.6. | Extracción de ADN y preparación de las muestras. | 58 |
| 2.7. | Cuantificación de ADN..... | 59 |
| 2.8. | PCR..... | 60 |
| 2.9. | Electroforesis en muestras | 61 |
| 2.9.1. | Visualización de ADN..... | 61 |
| Cap.3 | Resultados y discusión..... | 62 |
| 3.1. | Resultados del objetivo 1..... | 62 |
| 3.2. | Resultados del objetivo 2..... | 67 |
| 3.3. | Resultados del objetivo 3..... | 73 |
| Conclusiones | | 88 |
| Bibliografía | | 89 |
| Anexos | Diseño de primers de <i>Oreochromis Niloticus</i> | 94 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de la maduración y secreción del colágeno (Lozano Teruel, 2005)... | 11 |
| Figura 2. Estructura del colágeno (en la secuencia de la triple hélice se repite constantemente el triplete Gly- X- Y es decir cada tercer aminoácido es una glicina. En las posiciones X e Y suele hallarse el aminoácido prolina (Pro); la posición Y por lo general está ocupada por la 4-hidroxiprolina (4-Hip) aunque a veces se encuentra ahí el aminoácido 3- Hidroxiprolina (3-Hip) o 5 hidroxilisina (5-Hil). En el microscopio electrónico (ME) estas fibrillas exhiben un bandeado típico. Sobre todo, en los extremos, las moléculas de tropocolágeno se unen fuertemente entre si por entrecruzamiento covalente de las cadenas laterales de la lisina (Koolman, 2012)..... | 12 |
| Figura 3. Viscosidad de un sistema gelatina/agua y su dependencia de calidad y concentración (Schrieber & Gareis, 2007)..... | 19 |
| Figura 4. La medición de la fuerza del gel sigue siendo el parámetro más importante para la gelatina. Izquierda: el equipo original en la solicitud de patente de O. Bloom de 1925. Derecha: un moderno instrumento semiautomático (Schrieber & Gareis, 2007). | 20 |
| Figura 5. Producción de gelatina en México en toneladas por meses (INEGI, 2021)..... | 26 |
| Figura 6. Producción de grenetina en México en toneladas por meses (INEGI, 2021). ... | 27 |
| Figura 7. Valor de la producción en México de grenetina (INEGI, 2021). | 27 |
| Figura 8. valor de la producción en México de gelatina (INEGI, 2021). | 28 |
| Figura 9. Segmentación y alcance del mercado de gelatina (Grand View Research, 2020). | 28 |
| Figura 10. Volumen e ingresos del mercado de gelatina, 2016-2027, (miles de toneladas) (Millones de USD) Fuentes: PFMA, FEDIAF, FDA, Pet Food Industry Magazine, Investor Presentations, Primary Interviews Grand View Research..... | 29 |
| Figura 11. Tendencia de exportación de los 3 países principales que tienen los valores de exportación más altos (Tridge, 2021). | 30 |
| Figura 12. Estas son las tendencias de exportación de los 5 principales exportadores de gelatina de 2014 a 2021..... | 30 |
| Figura 13. Los principales flujos de exportación de Jelly en 2020. El principal flujo de exportación en 2020 fue de México a Estados Unidos, con un valor de exportación de USD 761. 83 M (Tridge, 2021). | 31 |
| Figura 14. Tendencia de exportación de los 3 países principales que tienen los valores de importación más altos (Tridge, 2021). | 31 |
| Figura 15. Estas son las tendencias de importación de los 5 principales importadores de gelatina de 2014 a 2021 (Tridge, 2021)..... | 32 |
| Figura 16. Los principales flujos de exportación de Jelly en 2021. El principal flujo de importación en 2021 fue de México a Estados Unidos, con un valor de importación de USD 830.43 M (Tridge, 2021)..... | 32 |
| Figura 17. Valorización de residuos de origen animal en gelatina y su uso en diferentes industrias (Ravindran & Jaiswal, 2016)..... | 33 |
| Figura 18. Una mezcla 50:50 de carne y aspic tiene el mismo valor como el de la carne sola, pero contiene menos grasa (Autor desconocido, licencia CC BY-NC-ND, Fecha de consulta 25/10/2021 | 35 |
| Figura 19. Estructura química del ADN. (Jiménez & Merchant, 2003) | 40 |
| Figura 20. Esquema de la estructura del DNA (Lisker & Zentella, 2013). | 41 |
| Figura 21. El DNA mitocondrial en ovocitos, espermatozoides y cigoto (Lisker & Zentella, 2013)..... | 43 |
| Figura 22. ADN Polimerasa en acción durante la PCR (Renneberg, 2008)..... | 49 |
| Figura 23. Material biológico, gelatinas. | 56 |
| Figura 24. Material biológico, grenetinas | 57 |

| | |
|---|----|
| Figura 25. Programa PCR de Bos taurus para muestra control. | 63 |
| Figura 26. Programa PCR directa de Bos taurus | 63 |
| Figura 27. Programa PCR de la especie Sus scrofa domesticus para muestra control.... | 64 |
| Figura 28. Programa PCR directa de la especie Sus scrofa domesticus. | 64 |
| Figura 29. Programa PCR de la especie Oreochromis niloticus para muestra control. | 65 |
| Figura 30. Programa PCR directa de la especie Oreochromis niloticus..... | 65 |
| Figura 31. Programa PCR de la especie Gallus gallus domesticus para muestras control. | 66 |
| Figura 32. Programa PCR directa de la especie Gallus gallus domesticus..... | 66 |
| Figura 33. Escaleras de ADN de marcadores de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, 2022)..... | 69 |
| Figura 34. Gel de agarosa al 1%, determinación de especificidad de primers Bos taurus vs diferentes especies 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Bos taurus, 4) Gallus gallus domesticus, 5) Oreochromis niloticus, 6) Sus scrofa domesticus, 7) Papa, 8) Chayote, 9) Calabaza..... | 70 |
| Figura 35. Gel de agarosa al 1%, determinación de especificidad de primers Sus scrofa domesticus vs diferentes especies 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Sus scrofa domesticus, 4) Gallus gallus domesticus, 5) Oreochromis niloticus, 6) Bos taurus, 7) Papa, 8) Chayote y 9) Calabaza. | 71 |
| Figura 36. Gel de agarosa al 1%, determinación de especificidad de primers Gallus gallus domesticus vs diferentes especies 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Gallus gallus domesticus, 4) Sus scrofa domesticus, 5) Oreochromis niloticus, 6) Bos taurus, 7) Papa, 8) Chayote, 9) Calabaza..... | 72 |
| Figura 37. Gel de agarosa al 1%, determinación de especificidad de primers Oreochromis niloticus vs diferentes especies 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Oreochromis niloticus, 4) Bos taurus, 5) Sus scrofa domesticus, 6) Gallus gallus domesticus, 7) Papa, 8) Chayote, 9) Calabaza. | 73 |
| Figura 38. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie Bos taurus en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Bos taurus, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1..... | 74 |
| Figura 39. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie Bos taurus en diferentes gelatinas comerciales 11) Marcador de peso Molecular, 12) Blanco, 13) Bos taurus, 14) GPR1, 15) GD1, 16) GMK1, 17) GSP1, 18) GFR1, 19) GG1 y 20) GM1. | 74 |
| Figura 40. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie Bos taurus en diferentes gelatinas comerciales 21) Marcador de peso Molecular, 22) Blanco, 23) Bos taurus, 24) GJa1, 25) GSa1, 26) GCo1, 27) GCH1 y 28) GCay1..... | 75 |
| Figura 41. Gel de agarosa al 1.5%, para identificación de la especie Sus scrofa domesticus en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Sus scrofa domesticus, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1..... | 76 |
| Figura 42. Gel de agarosa al 1.5%, para identificación de la especie Sus scrofa domesticus en diferentes gelatinas comerciales 11) Marcador de peso Molecular, 12) Blanco, 13) Sus scrofa domesticus, 14) GPR1, 15) GD1, 16) GMK1, 17) GSP1, 18) GFR1, 19) GG1 y 20) GM1..... | 76 |
| Figura 43. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie Sus scrofa domesticus en diferentes gelatinas comerciales 21) Marcador de peso Molecular, 22) Blanco, 23) Sus scrofa domesticus, 24) GJa1, 25) GSa1, 26) GCo1, 27) GCH1 y 28) GCay1..... | 77 |
| Figura 44. Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de la especie Gallus gallus domesticus en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Gallus gallus domesticus, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1 y 7) GA1. | 78 |
| Figura 45. Gel de agarosa al 1.5%, para identificación de la especie Gallus gallus domesticus en diferentes gelatinas comerciales 11) Marcador de peso Molecular, 12) | |

| | |
|---|----|
| Blanco, 13) Gallus gallus domesticus, 14) GPR1, 15) GD1, 16) GMK1, 17) GSP1, 18) GFR1, 19) GG1 y 20) GM1. | 78 |
| Figura 46. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie Gallus gallus domesticus en diferentes gelatinas comerciales 21) Marcador de peso Molecular, 22) Blanco, 23) Gallus gallus domesticus, 24) GJa1, 25) GSa1, 26) GCo1, 27) GCH1 y 28) GCay1. | 79 |
| Figura 47. Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de la especie Oreochromis niloticus en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Oreochromis niloticus, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1. | 80 |
| Figura 48. Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de la especie Oreochromis niloticus en diferentes gelatinas comerciales 11) Marcador de peso Molecular, 12) Blanco, 13) Oreochromis niloticus, 14) GPR1, 15) GD1, 16) GMK1, 17) GSP1, 18) GFR1, 19) GG1 y 20) GM1. | 81 |
| Figura 49. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie Oreochromis niloticus en diferentes gelatinas comerciales 21) Marcador de peso Molecular, 22) Blanco, 23) Oreochromis niloticus, 24) GJa1, 25) GSa1, 26) GCo1, 27) GCH1 y 28) GCay1. | 81 |
| Figura 50. Gel de agarosa al 1.5%, para identificación de la especie Sus scrofa domesticus en diferentes grenetinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) Sus scrofa domesticus, 4) GRDG1, 5) GRPD1, 6) GRGE1, 7) GRD1 Y 8) GRK1. | 82 |
| Figura 51. Cantidad de gelatinas en las que fue identificado ADN de las especies de estudio vs las gelatinas no identificadas. | 86 |
| Figura 52. Cantidad de grenetinas en las que fue identificado ADN de las especies de estudio vs las no identificadas. | 86 |
| Figura 53. Frecuencia con la que se encontraron las especies de estudio en gelatinas comerciales. | 87 |

Índice de cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Tipos de colágeno (Lugo, 2006). | 13 |
| Cuadro 2. Postres de gelatina (mezcla en polvo) (Schrieber & Gareis, 2007). | 17 |
| Cuadro 3. Grupo de aminoácidos presentes en las patas de pollo y colágeno de patas de pollo (Liu, Y.K, & M.T, 2001). | 24 |
| Cuadro 4. La multifuncionalidad de la gelatina, por ejemplo, en la producción de alimentos (Schrieber & Gareis, 2007). | 35 |
| Cuadro 5. Referencia de Normas Mexicanas gelatina. | 38 |
| Cuadro 6. Referencia de Normas Mexicanas gelatina. | 39 |
| Cuadro 7. Material Biológico y sus características. | 54 |
| Cuadro 8. Material biológico, grenetinas y sus características. | 57 |
| Cuadro 9. Cantidad correspondiente a cada componente para PCR. | 60 |
| Cuadro 10. Cantidad correspondiente a cada componente para PCR directa. | 61 |
| Cuadro 11. Primer de Bos taurus empleado en la identificación de origen de grenetina. | 63 |
| Cuadro 12. Primer de Sus scrofa domesticus empleado en la identificación de origen de grenetina. | 64 |
| Cuadro 13. Primer de Oreochromis niloticus empleado en la identificación de origen de grenetina. | 65 |
| Cuadro 14. Primer de Gallus gallus domesticus empleado en la identificación de origen de grenetina. | 66 |
| Cuadro 15. Resultados de la extracción y cuantificación de ADN concentrados y diluidos. | 67 |
| Cuadro 16. Especies encontradas mediante la técnica de PCR en muestras de gelatinas comerciales. | 83 |
| Cuadro 17. Especies encontradas mediante la técnica de PCR en muestras de grenetinas comerciales. | 83 |

Introducción

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), denomina alimento al producto natural o elaborado susceptible de ser ingerido y digerido, cuyas características lo hacen apto y agradable al consumo, constituido por una mezcla de nutrientes que cumplen determinadas funciones en el organismo (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2022).

Uno de los productos más importantes proveniente de ganado bovino, porcino y hasta de pollo es la gredina. Esta es un hidrocoloide a base de proteínas con estabilidad estructural, propiedad nutricional y otras características fisicoquímicas únicas (Hassan, Ahmad, & Zain, 2018). Y tiene múltiples usos como por ejemplo dulces, gomitas de frutas, caramelos, yogurt, postre espumado de leche, malvaviscos, carne, salchichas, hasta en la industria farmacéutica se utiliza en la elaboración de pastillas. Pero la aplicación más importante que tiene es en el postre de gelatina (Schrieber & Gareis, 2007).

Además, se utiliza en productos fitness. Aunque la gelatina tiene múltiples usos en varios aspectos de nuestras vidas, se considera uno de los ingredientes más controvertidos en la industria alimentaria moderna Halal y Kosher. Por lo tanto, la detección y cuantificación de las especies de origen de la gelatina son importantes. La autenticación de esta, es crucial desde el punto de vista económico, religioso y médico (Kamal & Sagadevan, 2021).

A pesar de contar con regulaciones sobre el etiquetado de la gelatina a lo largo de las fases de producción, purificación y comercialización, aún es un desafío asegurar su origen o si ha sido adulterada, deliberada o accidentalmente, en cualquier punto de la cadena alimentaria (Demirhan, 2012). Además, los ácidos nucleicos y las proteínas de la gelatina sufren una severa degradación durante la producción bajo el efecto de hidrólisis ácida, alta temperatura, esterilización y secado (NaKang, 2018), lo que hace que estos biomarcadores de detección sean ineficientes. Así, la detección de gelatina, usando técnicas tradicionales, es difícil en productos altamente procesados. Por lo tanto, se necesitan esencialmente técnicas innovadoras y avanzadas para analizar estos productos en cumplimiento de los requisitos Halal y Kosher (KamalUddin, 2021).

Derivado de las necesidades con las que cuenta un grupo mayoritario de la población en todo el mundo, de que sus productos sean kosher o halal, se implementó una investigación a fondo en gelatinas y gredinas comerciales para la identificación de especies de origen en estas, con ayuda de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cap.1 Generalidades

La determinación de especies en subproductos animales se ha logrado principalmente a través de análisis de proteínas y ADN (Cai, 2012). En cada especie, los genes (genoma) predeterminan la composición de aminoácidos de las proteínas expresadas, su cantidad y tasa de síntesis. Dado que el proteoma de un organismo es el resultado de la expresión de su genoma, con frecuencia se ha sugerido el análisis de proteínas con fines de identificación de especies. Como resultado, se han propuesto diferentes metodologías basadas en proteínas, incluidas técnicas electroforéticas, cromatográficas e inmunoquímicas, para estudios de autenticación de carne y productos cárnicos (Amaral, 2016).

La electroforesis es una poderosa técnica basada en el uso de un campo eléctrico para la separación de proteínas en patrones distintivos. Incluye diferentes técnicas de separación electrocinética según el principio utilizado para la separación de proteínas, tales como diferencias en movilidad electroforética, punto isoeléctrico, tamaño molecular o una combinación de estos (Amaral, 2016).

Los ensayos inmunoquímicos se basan en la reacción específica entre anticuerpos y antígenos y se utilizan con frecuencia para la autenticación de especies de carne. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es la técnica inmunoquímica más utilizada (Asencio, 2008).

Como métodos alternativos basados en proteínas, varios estudios sugieren el uso de técnicas cromatográficas, principalmente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) junto con diferentes detectores y cromatografía líquida (LC) combinada con diferentes detectores de MS (Amaral, 2016). (Giaretta, 2013) propuso una cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) de intercambio aniónico junto con detección de matriz de diodos para la separación de mioglobina de muestras de carne cruda de res, pollo, caballo, avestruz, cerdo y búfalo de agua.

Sin embargo, para productos altamente procesados como la gelatina y las cápsulas de gelatina, los análisis basados en proteínas pueden verse obstaculizados por la desnaturalización progresiva de los marcadores proteicos causados por tratamientos extremos de temperatura y pH durante la fabricación, lo que resulta en la pérdida de heterogeneidad y antigenicidad (Cai, 2012). Debido a la mayor estabilidad del ADN, los análisis basados en ADN, como la PCR, pueden ofrecer una alternativa. Hasta la fecha, el análisis de PCR con cebadores específicos de especies se ha utilizado para la detección sensible y específica de varias especies animales a partir de productos altamente procesados (Dalmaso, 2004; Fumière, 2006).

La gelatina alimenticia tiene una larga y exitosa historia. En tiempos antiguos se utilizó como "adhesivo biológico", y con el paso del tiempo fue progresando a la fabricación industrial y diversas aplicaciones. Hace unos 8000 años, los habitantes

de lo que ahora es el Medio Oriente pudieron producir pegamento a partir de tejidos animales. Unos 3000 años después, los antiguos egipcios eran muy conscientes de su funcionalidad y utilizaron un tipo de pegamento para madera producido a partir de colágeno como adhesivo para pegar sus muebles. Y, en la corte de Enrique VIII de Inglaterra (1491-1547), en platos de escabeche con "gelatina de patas de ternera reluciente" que estaban en el menú en cada banquete. Sin embargo, fue en la era napoleónica cuando la gelatina experimentó su primer auge real: se utilizó como fuente de proteínas para alimentar a los franceses cuando la carne empezó a escasear durante el bloqueo de sus puertos por parte de la armada británica (Schrieber & Gareis, 2007).

El uso de gelatina con fines sanitarios se ha documentado desde la edad Media. Por ejemplo, Hildegard von Bingen, abadesa benedictina y erudita universal, recomendó en su "Physica" alrededor de 1150 que "frecuentes y adecuadas" porciones de un caldo hecho con patas de ternero era bueno para el dolor en las articulaciones. Hoy, la ciencia ha demostrado que tenía razón (Schrieber & Gareis, 2007).

Todo comenzó con pegamento, sin embargo, los arqueólogos han establecido que ciertas formas de gelatina cruda eran utilizadas mucho antes. Los análisis químicos y microbiológicos realizados en el Instituto Weizmann en Israel sobre muestras tomadas de una cueva cerca del Mar Muerto muestran claramente que sus habitantes en la Edad de Piedra sabían mucho sobre la fuerza adhesiva del pegamento de colágeno y lo usaban para numerosos propósitos. Descubrimientos tanto en Deir el Bahari (en el templo funerario de la reina Hatshepsut) como en Tebas (el actual Luxor) también demuestra sin ambigüedades que se utilizó pegamento animal en Egipto en ese momento. Esta forma de pegamento, llamado pegamento glutin, todavía es producido a partir del colágeno de pieles de animales. Además, en algunas pirámides los textos indican que los egipcios también utilizaron huesos en la preparación de varios caldos y sopas (Schrieber & Gareis, 2007).

Así, se puede establecer claramente el uso de gelatina para la preparación de alimentos durante los primeros siglos d.C. Durante este período, el hueso y la piel de los animales se hervían para obtener pegamento. Sin embargo, también se obtuvo un tipo diferente de producto: un extracto crudo que, cuando se enfría, se solidifica para producir lo que de hecho era la "Forma original" de gelatina comestible (Schrieber & Gareis, 2007).

1.1. Colágeno

El colágeno es la principal fracción del tejido conjuntivo. Este componente es muy importante debido a que contribuye de manera significativa a la dureza del músculo de mamífero. Además, la gelatina, producto de su hidrólisis, es un ingrediente útil en muchos productos alimenticios pues actúa como componente funcional de los geles dependientes de la temperatura en la elaboración de postres. El colágeno

abunda en los tendones, piel, hueso, sistema vascular de los animales y en las vainas de tejido conjuntivo que envuelven al músculo. El colágeno alcanza un tercio o más del total de las proteínas de los mamíferos. Alrededor del 10% de la proteína del músculo de mamífero es colágeno; esta cantidad es, generalmente, mucho menor en los pescados. Parte del colágeno es soluble en disoluciones salinas neutras, otra parte es soluble en ácido y una tercera es insoluble (Fennema & Damodaran, 2008).

1.1.1. Biosíntesis de colágeno

Después de su traducción ribosomal en los fibroblastos, las cadenas polipeptídicas formadas en el fibroblasto siguen un proceso de maduración, hasta convertirse en la unidad definitiva de tropocolágeno, que forma las fibras o la malla de la lámina basal. Este proceso consiste en diferentes etapas secuenciales que se presentan a continuación (Lozano Teruel, 2005):

- Eliminación del péptido guía, que dirige las cadenas de unos 1450 aminoácidos al retículo endoplásmico y les introduce una primera glicosilación ramificada y rica en manosa, cerca del extremo C-terminal.
- Hidroxilación, más o menos extensiva, de cadenas laterales de prolina (en posiciones 3 y 4) y lisina (en posición 5), por la acción de prolil y lisil hidroxilasas específicas que pertenecen a la familia de las dioxigenasas y dependen de distintos factores, entre ellos, el catión Fe(II), el α -cetoglutarato y el ascorbato (vitamina C). La 4-hidroxiprolina se produce sólo en motivos G-X-P, mientras que la 3-hidroxiprolina y la 5-hidroxiprolina no parecen tener especificidad de motivos secuenciales.

La vitamina C (ácido L-ascórbico o ascorbato) es un nutriente esencial para los seres humanos e íntimamente relacionado con el mantenimiento de los tejidos conectivos intercelulares, el osteoide, la dentina y el colágeno. La vitamina C juega un papel importante como cofactor, complemento enzimático, cosustrato, agente reductor y antioxidante en varias reacciones bioquímicas. Es esencial para la formación y estabilización de la triple hélice del colágeno, la conversión de ácido fólico en ácido folínico, la síntesis de dopamina, noradrenalina, adrenalina y carnitina y el metabolismo de los nucleótidos cíclicos y las prostaglandinas en los seres humanos (Anil, 2015).

- Nueva glicosilación, ahora por incorporación covalente de monómeros de galactosa o disacáridos galactosa-glucosa, unidos entre sí por enlaces $\beta(1\rightarrow2)$ a los hidroxilos de la lisina. El colágeno y la elastina son las dos únicas proteínas conocidas que contienen hidroxilisina y se glicosilan en estos hidroxilos.
- Ensamblaje de tres cadenas para dar lugar al procolágeno, que contiene un gran centro fibroso y unos extremos globulares, llamados propéptidos. Los propéptidos en el extremo C-terminal forman varios puentes disulfuro que

parece que dirigir el enrollamiento de las 3 cadenas, en el sentido del extremo C al N-terminal. Además, los propéptidos mantienen una buena solubilidad de estas estructuras en el interior del fibroblasto intracelular, impidiendo su agregación temprana.

- Liberación vesicular y proteólisis del procolágeno por la acción de endopeptidasas extracelulares específicas, que liberan esos propéptidos de los extremos, para dar lugar a la unidad trimérica y muy insoluble de tropocolágeno, que forma las fibras. La liberación de los propéptidos se produce mayoritariamente, pero no en todos los tipos de colágeno ni por igual. En el tipo mayoritario, el propéptido N-terminal contiene unos 150 aminoácidos, y el C-terminal, unos 250, quedando las cadenas con unos 1050, una longitud de unos 300 nm y un grosor de la tritrenza de 1.5 nm. Pero, además del tropocolágeno mayoritario, otras endopeptidasas pueden procesar de forma diferente, y producir otras especies más flexibles que no se asocian de forma tan eficaz y sirven para funciones más especializadas que agregarse en fibras.
- Entrecruzamiento covalente entre unidades de tropocolágeno, por la acción de una lisil oxidasa, que precisa cobre y vitamina B6 para su actividad. Esta oxidasa produce la desaminación oxidativa para dar lugar a un derivado de la lisina con un grupo aldehído en la cadena lateral, llamada lisinal o al-lisina. La reacción se produce, tanto sobre lisinas como sobre hidroxilisinas, aunque, parece que estas últimas son un sustrato mejor. Posterior y lentamente, quizá, ya sin la intervención de ninguna enzima conocida, estos residuos dan lugar al entrecruzamiento, tanto entre cadenas de una misma unidad, como entre unidades diferentes. Un lisinal y una lisina forman una base de Schiff (aldimina), que gana estabilidad por hidrogenación posterior, quedando un puente de lisinonorleucina.

En el caso de dos residuos de lisinal, la unión se produce mediante una condensación aldólica, que se deshidrata para su estabilización. Las hidroxilisinas favorecen la condensación aldólica. Incluso se pueden formar otros entrecruzamientos minoritarios con la intervención de otros restos, hidroxilisinas, histidinas y unidades glucídicas. Los entrecruzamientos aumentan la rigidez y la insolubilidad de la fibra y son más numerosas en zonas expuestas a gran tensión, como el tendón de Aquiles. Se forman lentamente y aumentan en número con el tiempo, una de las razones que explican que el colágeno envejecido sea más rígido que el joven, y dé lugar a las arrugas y patas de gallo de la piel, típicas de la edad (Lozano Teruel, 2005).

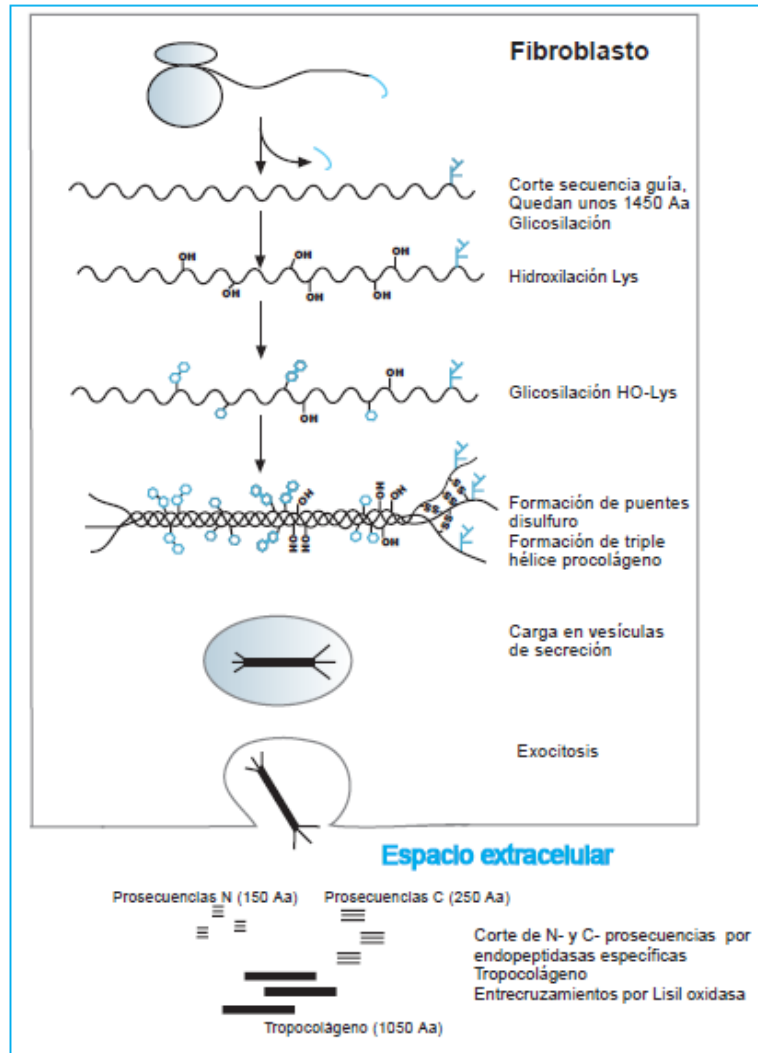


Figura 1. Esquema de la maduración y secreción del colágeno (Lozano Teruel, 2005).

1.1.2. Estructura química

La unidad básica de la fibra de colágeno es la molécula de tropocolágeno (actualmente se tiende a sustituir este término por el de monómero de colágeno). El monómero de colágeno tiene la forma de una varilla, de unos 300 nm de longitud y solamente 1.5 nm de diámetro. Esta molécula está compuesta por tres hélices polipeptídicas levógiras (denominadas cadenas α), cada una de ellas con aproximadamente mil residuos, enrolladas entre si formando una Superhélice dextrógira figura 1. Como las hélices polipeptídicas y Superhélice de tropocolágeno están enrolladas en sentidos opuestos, la Superhélice se encarga de evitar el desenrollamiento de las tres cadenas polipeptídicas. Este mismo principio se emplea en la construcción de cables de acero que se utilizan en los puentes colgantes y en otras estructuras que requieren fibras fuertes y ligeras.

En la figura 2 podemos observar la hélice del colágeno la cual posee una estructura secundaria especial que solo se encuentra en esta proteína. La pauta helicoidal de su triple cadena es completamente distinta a la de la hélice α . Faltan los puentes de hidrogeno de la cadena. En cambio, cada una de las tres hélices del colágeno se estabiliza por repulsión estérica de los anillos de pirrolidina pertenecientes a los residuos de hidroxiprolina. Los anillos de pirrolidina se separan unos de otros cuando la cadena polipeptídica adopta la forma helicoidal, lo cual la hace mucho más abierta que la hélice α fuertemente enroscada (Lugo, 2006).

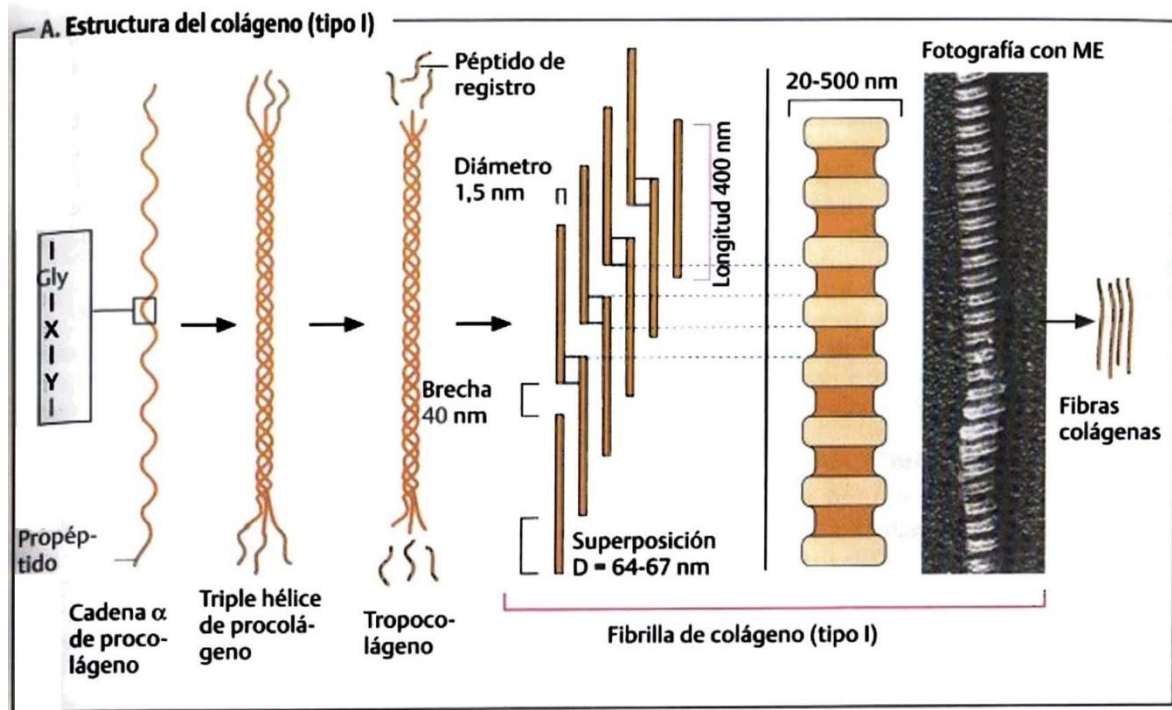


Figura 2. Estructura del colágeno (en la secuencia de la triple hélice se repite constantemente el triplete Gly- X- Y es decir cada tercer aminoácido es una glicina. En las posiciones X e Y suele hallarse el aminoácido prolina (Pro); la posición Y por lo general está ocupada por la 4-hidroxiprolina (4-Hip) aunque a veces se encuentra ahí el aminoácido 3- Hidroxiprolina (3-Hip) o 5 hidroxilisina (5-Hil). En el microscopio electrónico (ME) estas fibrillas exhiben un bandeado típico. Sobre todo, en los extremos, las moléculas de tropocolágeno se unen fuertemente entre si por entrecruzamiento covalente de las cadenas laterales de la lisina (Koolman, 2012).

1.1.3. Tipos de colágeno

El colágeno no es una sustancia uniforme, sino más bien una familia de proteínas. Hasta la fecha, se han identificado unos 27 tipos diferentes de colágeno. El colágeno tipo I ocurre ampliamente, principalmente en tejido conectivo como piel, huesos y tendones. El colágeno tipo II se encuentra prácticamente exclusivamente en el tejido del cartílago. El colágeno tipo III es fuertemente dependiente de la edad: la piel muy joven puede contener hasta un 50%, pero en el con el transcurso del tiempo esto se reduce al 5 al 10%. Los otros tipos de colágeno están presentes solo en

cantidades muy bajas y en su mayoría son específicas de órganos (Schrieber & Gareis, 2007).

Los tipos de colágeno antes mencionados se presentan en el cuadro 1, donde se muestran los principales tipos de colágeno, su composición molecular, los genes que los codifican y su distribución tisular. Las moléculas de colágeno están formadas por tres cadenas α , las diferentes cadenas en una molécula se distinguen por números arábigos, mientras que los diferentes tipos de colágeno se distinguen mediante números romanos en paréntesis. La familia más abundante y extendida de colágenos, que llega a suponer alrededor del 90% del colágeno total, está representada por colágenos formadores de fibrillas. Los colágenos tipo I y V contribuyen a formar la matriz estructural del hueso y el colágeno II contribuye a formar la matriz fibrilar del cartílago articular. El colágeno tipo IV que posee una triple hélice más flexible, se asocia formando redes restringidas a las membranas basales (Lugo, 2006).

Cuadro 1. Tipos de colágeno (Lugo, 2006).

| Diferentes tipos de colágeno | | | |
|---|--|--|---|
| Colágenos formadores de fibras | | | |
| Tipo | Composición molecular. | Genes (localización genómica). | Distribución tisular. |
| I | $[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2(I)$ | COL1A1 (17q21.31-q22) COL1A2 (7q22.1) | La mayoría de los tejidos conectivos: hueso, tendón, ligamentos, piel, pulmón, córnea y sistema vascular. |
| II | $[\alpha_1(II)]_3$ | COL2A1 (12q13.11-q13.2) | Cartílago, humor vítreo, córnea embrionaria y núcleo pulposos. |
| III | $[\alpha_1(III)]_3$ | COL3A1 (2q31) | Piel, pared vascular, fibras reticulares de la mayoría de tejidos (pulmón, hígado, bazo, etc.) |
| V | $\alpha_1(V), \alpha_2(V), \alpha_3(V)$ | COL5A1 (9q34.2 – q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (1p13.2) | Pulmón, córnea, hueso, membranas fetales; siempre junto al colágeno tipo I |
| XI | $\alpha_1(XI), \alpha_2(XI), \alpha_3(XI)$ | COL11A1 (1P21) COL11A2 (6P21.3) COL11A3 = COL2A1 | Cartílago, humor vítreo. |
| Colágeno formador de membranas basales | | | |
| IV | $[\alpha_1(IV)]_2 \alpha_2(IV); \alpha_1 - \alpha_6$ | COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36-q37) COL4A4 (2q36-q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xq22.3) | Membranas basales |
| Colágenos microfibrilares | | | |

| | | | |
|--|--|---|--|
| VI | $\alpha_1(VI), \alpha_2(VI), \alpha_3(VI)$ | COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37) | Dermis, cartílago, placenta, pulmones, paredes vasculares, discos intervertebrales |
| Fibras de anclaje | | | |
| VII | $[\alpha_1(VII)]_3$ | COL7A1 (3p21.3) | Piel uniones dermis-epidermis, mucosa oral, cervix. |
| Colágenos formadores de redes hexagonales | | | |
| VIII | $[\alpha_1(VIII)]_2 \alpha_2(VIII)$ | COL8A1 (3q12-13.1) COL8A2 (1p34.3- p32.3) | Producidas por células endoteliales y varias líneas celulares tumorales. |
| X | $[\alpha_3(X)]_3$ | COL10A1 (6q21- q22.3) | Zona hipertrófica cartílago |
| Colágenos FACIT | | | |
| IX | $\alpha_1(IX), \alpha_2(IX), \alpha_3(IX)$ | COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33- P32.2) | Cartílago, humor vítreo, córnea |
| XII | $[\alpha_1(XII)]_3$ | COL12A1 (6q12 -q13) | Pericondrio, ligamentos, tendones |
| XIV | $[\alpha_1(XIV)]_3$ | COL14A1 (8q23) | Dermis, tendones, pared vascular, placenta, pulmones, hígado |
| XIX | $[\alpha_1(XIX)]_3$ | COL19A1 (6q12-q14) | Rabdomiosarcoma humano |
| XX | $[\alpha_1(XX)]_3$ | | Epitelio corneal, piel embrionaria, cartílago esternal, tendones |
| XXI | $[\alpha_1(XXI)]_3$ | COL21A1 (6p12.3 -11.2) | Pared de los vasos sanguíneos |
| Colágenos transmembrana | | | |
| XIII | $[\alpha_1(XIII)]_3$ | COL13A1 (10q22) | Epidermis, folículos pilosos, endomisio, intestino, condrocitos, pulmones, hígado |
| XVII | $[\alpha_1(XVII)]_3$ | COL17A1 (10q24.3) | Uniones dermis-epidermis |
| Multiplexinas | | | |
| XV | $[\alpha_1(XV)]_3$ | COL15A1 (9q21-q22) | Fibroblastos, células musculares lisas, riñón, páncreas |
| XVI | $[\alpha_1(XVI)]_3$ | COL16A1 (1p34) | Fibroblastos, queratinocitos, Amnión |

| | | | |
|--------------|------------------------|-------------------|------------------|
| XVIII | $[\alpha_1 (XVIII)]_3$ | COL18A1 (21q22.3) | Pulmones, hígado |
|--------------|------------------------|-------------------|------------------|

1.2. Grenetina

Se entiende por Grenetina Pura Comestible, al producto industrial alimenticio, obtenido por hidrólisis ácida o alcalina de material colágeno (huesos, pieles y cartílagos) (NMX-F-043-1970).

La grenetina o gelatina, compuesta principalmente por un 50,5 % de carbono, seguido de un 6,8 % de hidrógeno, un 17 % de nitrógeno y un 25,2 % de oxígeno, es un tipo de proteína insoluble producida por hidrólisis del colágeno extraído de una variedad de fuentes animales como la piel, huesos y tejidos conectivos. Estas fuentes normalmente se generan como un subproducto después del sacrificio de animales por parte de la industria de procesamiento de alimentos musculares (carne, aves y mariscos) (Nur Hanani, 2016).

1.3. Gelatina

La norma NMX-F-041-1983 establece la siguiente definición: Se entiende por postre de gelatina de sabores, al producto elaborado por mezcla de azúcar refinada, grenetina de grado comestible, adicionado de aditivos permitidos. Que preparado de acuerdo con las indicaciones del envase se obtiene un postre listo para su consumo (Secretaría de comercio y Fomento industrial, 1983).

La gelatina es una proteína derivada de la hidrólisis selectiva del colágeno, que es el componente orgánico más abundante en huesos y piel de mamíferos, que tiene aplicaciones en alimentos, farmacia y adhesivos, para lo que se requieren diferentes grados de calidad y pureza. Se puede elaborar a partir de restos de pollo, o de ganado bovino o porcino, y en los últimos tiempos se han hecho esfuerzos para diferenciarlos, por el riesgo de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), a partir del análisis de la composición de péptidos y aminoácidos (Badui Dergal, 2006).

Hay dos procesos de producción: el ácido y el básico. En el primero se tratan huesos y piel en una solución ácida diluida por un período predeterminado; se lava con agua fría y se genera un producto con un punto isoeléctrico de 6-9. En el proceso alcalino, los huesos desmineralizados se suspenden en una solución de sosa por un período de 60 días, en tanto las pieles se remojan por períodos menores. Periódicamente se cambia la solución de remojo y al final se lava exhaustivamente para eliminar toda la sosa residual. El punto isoeléctrico del producto está entre 4.8 y 5.2. Tras cualquiera de estos dos procesos, se extrae la proteína con agua, a temperatura controlada, menor a 80°C en esta etapa ocurre una alteración de la triple hélice en la que se rompen enlaces intermoleculares e intramoleculares y se producen cadenas menos estructuradas, que corresponden propiamente a la gelatina (Badui Dergal, 2006).

Cuando el colágeno se calienta en exceso, más allá de la temperatura óptima, se obtiene un producto amorfo, sin ninguna ordenación, que se usa como pegamento y que comúnmente se llama cola. Tras estos procesos se obtiene una solución proteínica diluida (4.7%), que se filtra, desmineraliza y se concentra en evaporadores al vacío de efectos múltiples, hasta alcanzar niveles de 25-30% (Badui Dergal, 2006).

Se esteriliza con procedimiento UHT, se enfría, se extruye y se seca. La vigilancia de la calidad microbiológica durante el proceso es crucial para la del producto final, pues frecuentemente se encuentran microorganismos con actividad proteolítica que la deterioran. Las condiciones de procesamiento influyen decididamente en las características de la gelatina y deben cuidarse desde la inspección veterinaria de los animales, lo cual es más crítico desde los brotes de Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE). En general, se busca obtener cadenas de alto peso molecular que faciliten la gelificación. La formación de sus geles termorreversibles se afecta con el pH, la fuerza iónica, la concentración, el punto isoeléctrico de la gelatina, etcétera. Por su naturaleza química, esta proteína está sujeta a reacciones de deterioro, como la hidrólisis, por acción de ácido, enzimas y microorganismos, que pueden destruir la estructura tridimensional que conforma el gel. La carne que se somete a un tratamiento térmico en el hogar sufre una transformación de colágeno en gelatina, misma que se observa fácilmente cuando el producto se enfría (Badui Dergal, 2006).

Es necesario recalcar que la diferencia entre gnetina y gelatina la podemos deducir al leer las normas respectivas, definiendo que la gnetina es la proteína pura y gelatina es la mezcla de azúcar, gnetina y algunos aditivos alimentarios permitidos.

1.3.1. Composición química de la gelatina

La gelatina tiene muchas y diversas aplicaciones en la producción moderna de alimentos. La gelatina se utiliza siempre cuando se necesita un ingrediente natural con propiedades multifuncionales para mantener productos en una determinada forma (Gelatine Manufactures of Europe, 2022).

Este postre clásico de gelatina se compone de gelatina en polvo y otros ingredientes secos, incluidos azúcar, sabores de frutas, colorantes y acidulantes (Cuadro 2).

Para preparar el postre, el polvo se disuelve en unas seis veces su cantidad de agua caliente, jugo de frutas o leche. Se enfría en el refrigerador hasta que esté lo suficientemente firme como para servir. Si se usa gelatina instantánea, se pueden producir productos solubles en agua fría (Schrieber & Gareis, 2007).

Los colores populares son rojos, verdes y amarillos intensos junto con sabores como frambuesa, limón, cereza, fresa o naranja. Productos que se asemejan a los budines y flanes con sabores de chocolate y caramelo también están disponibles. Estos

postres pueden también prepararse con leche y son muy populares en México (Schrieber & Gareis, 2007).

En Japón se encuentra un tipo de gelatina muy excepcional. Aquí, se agrega gelatina al té o café. Debido a los componentes de estas bebidas, acondicionadas alcalinas (Schrieber & Gareis, 2007).

Cuadro 2. Postres de gelatina (mezcla en polvo) (Schrieber & Gareis, 2007).

| Ingredientes | Proporción como % de masa seca |
|--|--|
| gelatina de: | |
| 280 Bloom | Aproximadamente 9.3 |
| 260 Bloom | Aproximadamente 9.8 |
| 240 Bloom | Aproximadamente 10.2 |
| 220 Bloom | Aproximadamente 10.8 |
| 200 Bloom | Aproximadamente 11.3 |
| 180 Bloom | Aproximadamente 11.9 |
| Ácido de frutas | Aproximadamente 1.5 |
| Tampón de sal de citrato de sodio | Aproximadamente 1.4 |
| Sal neutra de cloruro de sodio | Aproximadamente 0.5 |
| Sabor y colorante | Según sea necesario para la intensidad deseada de sabor y color. |
| Azúcar | Hasta el 100% |

1.3.2. Propiedades y características tecnológicamente importantes de la gelatina

La gelatina forma soluciones coloidales con agua; en química física, de hecho, estas se consideran "soluciones coloidales ideales". Tecnológicamente, la gelatina es, por tanto, un hidrocoloide. Aparte de gelatina, pectina, carragenina, goma arábiga, xantana, guar, goma de mascar y goma de algarrobo, por nombrar sólo algunos de los más importantes, también son miembros de esta clase de productos. Los hidrocoloides son utilizados en la industria alimentaria, no tanto por su valor nutricional sino más bien por su multifuncionalidad. Sin embargo, un solo hidrocoloide es incapaz de cumplir todas las funciones deseadas o conocidas. La gelatina no es una excepción; pero, en comparación con otros hidrocoloides, es mucho más multifuncional. Esto significa que el usuario a menudo puede utilizar muchas otras funciones auxiliares además de su función principal (Schrieber & Gareis, 2007).

La formación de geles termorreversibles en agua es una de las características de la gelatina. Cuando una solución acuosa de gelatina con una concentración superior a un punto crítico se enfría, puede formar un gel. La concentración y la temperatura

críticas de gelificación dependen principalmente de la composición de aminoácidos y la distribución del peso molecular de la gelatina (Regenstein & Zhou, 2007).

La fuerza de gel es la principal propiedad física de los geles de gelatina, y el valor comercial de las gelatinas se basa principalmente en su fuerza de gel. Además de la influencia de la composición de aminoácidos y la distribución del peso molecular de la propia gelatina, la fuerza de un gel de gelatina también varía con la concentración de gelatina, la historia térmica (temperatura y tiempo de maduración del gel), el pH y la presencia de cualquier aditivo. (Choi & Regenstein, 2000).

La viscosidad de las soluciones de gelatina aumenta con la disminución de la concentración y la temperatura de la gelatina. La viscosidad es más baja en el punto isoiónico. La influencia de la distribución del peso molecular sobre la viscosidad parece ser más relevante que el efecto sobre la fuerza del gel. Las gelatinas de mayor fuerza de gel pueden tener viscosidades más bajas que las gelatinas de menor fuerza de gel (Umoren, 2022).

Propiedades asociadas con la gelificación:

- Formación de gel
- Texturizar
- Espesamiento
- Enlace de agua
- Efectos de superficie
- Formación y estabilización de emulsión
- Función coloide protectora
- Formación y estabilización de espuma
- Formación de películas
- Adhesión / cohesión

Según lo revisado por (Stainsby, 1987; Johnston-Banks, 1990), las propiedades físicas de la gelatina dependen no solo de la composición de aminoácidos, sino también del contenido relativo de cadenas α , componentes β o γ y agregados de mayor peso molecular. Así como en la presencia de fragmentos proteicos de menor peso molecular. Por tanto, además de la fuente o la especie, las propiedades de la gelatina también dependerán en gran medida de la conservación de la materia prima.

1.4.3.1. Formación, viscosidad y textura del gel

Como gel termorreversible, un gel de gelatina comenzará a derretirse cuando la temperatura aumente por encima de cierto punto. Este punto se denomina punto de fusión y suele ser inferior a la temperatura del cuerpo humano. Esta propiedad de fusión en la boca se ha convertido en una de las características más importantes de los geles de gelatina y se aplica ampliamente en las industrias alimentaria y farmacéutica. Ningún otro biopolímero tiene esta propiedad única, aunque se han

realizado muchos esfuerzos para encontrar un sustituto de la gelatina. El punto de fusión de la gelatina de vaca y cerdo oscila entre 30 y 33 °C, pero las gelatinas de pescado muestran temperaturas de fusión más bajas que las de los mamíferos, debido a su menor contenido de aminoácidos. El punto de fusión de la gelatina de pescado de agua caliente suele oscilar entre 23 y 29 °C, mientras que la gelatina de pescado de agua fría puede fundirse alrededor de los 10 °C (Regenstein & Zhou, 2007).

La viscosidad es la segunda propiedad de mayor importancia en la industria de la gelatina. Las gelatinas comerciales poseen viscosidades en un intervalo de 1 y 75 mPa·s, a un intervalo de concentración de 0 a 22% como se puede apreciar en la figura 3. Los valores más altos son empleados en la industria de alimentos (como estabilizante), farmacéutica y fotográfica, mientras que los valores bajos son utilizados en la industria de confitería (Gelatin Manufacturers Institute of America, Inc., 2022; Schrieber & Gareis, 2007).

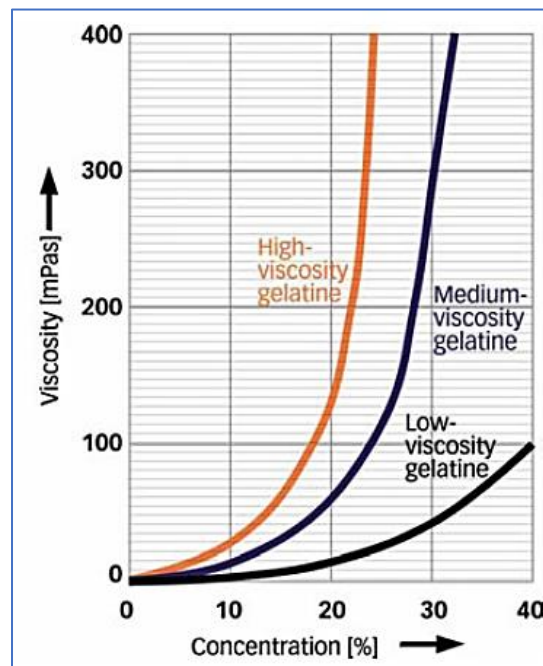


Figura 3. Viscosidad de un sistema gelatina/agua y su dependencia de calidad y concentración (Schrieber & Gareis, 2007)..

1.3.3. Grados Bloom

La medida analítica del poder gelificante es el valor de Bloom. El proceso para medir el parámetro lleva el nombre del científico estadounidense Oscar T. Bloom, quien desarrolló una "máquina para probar la fuerza gelatinosa de colas, gelatinas y similares" (Figura 4), que fue patentado el 9 de junio de 1925 (Patente de EE. UU. No.1 540 979).



Figura 4. La medición de la fuerza del gel sigue siendo el parámetro más importante para la gelatina. Izquierda: el equipo original en la solicitud de patente de O. Bloom de 1925. Derecha: un moderno instrumento semiautomático (Schrieber & Gareis, 2007).

El valor de Bloom es el peso en gramos que requiere un émbolo para presionar la superficie de un gel termostatzado estándar a una profundidad definida en condiciones estándar (Schrieber & Gareis, 2007).

Los valores de Bloom de los tipos de gelatina comerciales están dentro del rango de 50 a 300 Bloom. La gelatina de altos valores Bloom tiene una fusión y gelificación característicamente más altas puntos y tiempos de gelificación más cortos en el producto final, y es de color más claro y más neutro en olor y sabor. El poder gelificante más fuerte también significa que se requieren cantidades más pequeñas de gelatina para lograr la firmeza deseada del gel en el producto terminado (Schrieber & Gareis, 2007).

Esto se puede ilustrar matemáticamente y muestra un buen grado de correlación. El cálculo se basa en el hecho de que, en una solución acuosa pura, el producto de los tiempos de concentración de gelatina y la raíz cuadrada del valor de Bloom es constante para la gelatina producida por cualquier método:

$$C_1 \times B_1^{1/2} = C_2 \times B_2^{1/2} \dots\dots\dots (1)$$

$$C_2 = C_1 (B_1/B_2)^{1/2} \dots\dots\dots (2)$$

Donde:

C_1 = Concentración de gelatina inicial

$B_1^{1/2}$ = La raíz cuadrada del valor de Bloom 1

C_2 = Concentración de gelatina final

$B_2^{1/2}$ = La raíz cuadrada del valor de Bloom 2

Según esta fórmula, un fabricante de productos que contienen gelatina, por cambiando, por ejemplo, de 250 a 280 Bloom, puede reducir la concentración específica de gelatina de 8 a 7,7%. Sin embargo, sigue obteniendo el mismo grado de firmeza de gel (Schrieber & Gareis, 2007).

Estos valores calculados le proporcionan sólo una indicación aproximada inicial. También son necesarias pruebas sensoriales y analíticas, ya que todos los demás componentes de la formulación pueden influir en el comportamiento de la gelatina y, por tanto, en el grado de la dependencia de la firmeza del gel de la concentración. Alternativamente, usando una concentración constante de gelatina Bloom más alta en la formulación, se puede producir una textura más dura, menos similar a la goma. La industria alimentaria se refiere a estos productos como si tuvieran "un bocado corto" (Schrieber & Gareis, 2007).

1.3.4. Tipos de gelatina

La gelatina es colágeno desnaturalizado y típicamente se aísla de piel o hueso bovino o porcino mediante extracción con ácido o base (Asghar & Henrickson, 1982). Independientemente del proceso utilizado, las preparaciones de gelatina consisten en una distribución de fragmentos polipeptídicos de diferentes tamaños, diferentes puntos isoeléctricos (p I) y diferentes propiedades gelificantes, y a menudo exhiben variabilidad de lote a lote (Asghar & Henrickson, 1982; Farrugia, Farrugia, & Groves, 1998; Saddler & Horsey, 1987). Además, las propiedades fisicoquímicas de la gelatina varían según el método de extracción, la cantidad de desnaturalización térmica empleada (Tribunales, 1954) y el contenido de electrolitos del material resultante.

- Gelatina tipo A: se prepara a partir de precursores tratados con ácido. (Gennaro, 2003).
- Gelatina tipo B: se prepara a partir de precursores tratados con álcalis (Gennaro, 2003).

En el proceso convencional de producción de gelatina comestible tipo A y B, la extracción del colágeno a partir de materiales en crudo como pieles de cerdo, cuero de vaca, huesos, entre otros se hace con ácidos o con álcalis respectivamente, y los extractos acuosos ricos en colágeno son clarificados y desmineralizados a través de intercambio iónico y posteriormente concentrados en evaporadores al vacío hasta valores entre 25- 35 % en peso de gelatina. Se reporta que la Ultrafiltración posee ventajas frente al método tradicional de concentración de gelatina por evaporación, como la disminución del consumo de energía, menor degradación térmica de las moléculas de gelatina y aumento del nivel de pureza del producto (Wasswa, Tang, & Gu, 2007)

La gelatina tipo A y tipo B se producen a través de la hidrólisis parcial del colágeno por ácido o álcali, respectivamente. Generalmente, la gelatina tipo A se obtiene de cerdos, aves y pescado, mientras que la gelatina tipo B se obtiene de fuentes bovinas. La gelatina de tipo B contiene aproximadamente un 65 % más de residuos

de ácido aspártico y ácido glutámico que la gelatina de tipo A debido a la desamidación de la asparagina y la glutamina en condiciones alcalinas, lo que da como resultado un mayor número de cargas negativas (Tuna & Aarstad, 2022).

En el caso de la gelatina de tipo B (básica) con acondicionamiento alcalino, tanto la asparagina como la glutamina se convierten casi por completo en aspártico y ácidos glutámicos respectivamente. La composición de aminoácidos del colágeno y la gelatina de tipo A (ácida) acondicionada con ácido apenas se diferencia. Esto explica los diferentes puntos isoeléctricos (IEP) típicos de gelatina de tipos A y B. El IEP es el pH en cuya carga es neutra una molécula de gelatina. Para la gelatina de tipo A, esto corresponde al colágeno a un pH aproximado de 8 a 9 y para el tipo B a un pH de 4,8 a 5,5 (Schrieber & Gareis, 2007).

La distribución del peso molecular está determinada por el tipo y la intensidad del procedimiento de hidrólisis utilizado. En el caso de acondicionamiento alcalino la gelatina de Alto Bloom (tipo B), la mayor parte de las fracciones de peso molecular está en la región de $100\ 000\ \text{g mol}^{-1}$; esto corresponde a la cadena alfa. La gelatina acondicionada con ácido (Tipo A), por otro lado, no tiene un pico tan pronunciado, sino más bien una distribución más amplia (Schrieber & Gareis, 2007).

Es necesario mencionar que otra manera de clasificar a las gelatinas es de acuerdo a su origen, ya sea origen animal o vegetal, a continuación, se presenta con más detalle esta clasificación.

1.3.5. Gelatina animal

La gelatina es una proteína derivada del colágeno, el componente principal del tejido conectivo animal. La fuente y el tipo de colágeno influirán en las propiedades de las gelatinas resultantes. El contenido y la secuencia de aminoácidos varía de una fuente a otra, pero siempre consta de grandes cantidades de prolina, hidroxiprolina y glicina. Dado que la mayoría de las gelatinas comerciales se obtienen de piel de cerdo o de vaca, ha habido un interés considerable en utilizar sustitutos alternativos (Gilsenan & Ross, 2000).

La temperatura de fusión y gelificación de la gelatina se correlaciona con la proporción de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina (ambos con un anillo de pirrolidina de 5 miembros) en el colágeno original. Esto suele ser ~24% para los mamíferos y 16-18% para la mayoría de las especies de peces. Los pescados de agua fría, por ejemplo, el bacalao, tienen un contenido muy bajo de hidroxiprolina y, junto con esto, una temperatura de fusión y gelificación muy baja (Gilsenan & Ross, 2000).

1.3.6. Gelatina de cuero y huesos de vaca (*Bos taurus*)

Los cueros y pieles bovinos son fuentes sustanciales de materia prima para la gelatina tipo B y se suministran en forma de piezas partidas, recortes de cuero depilado, piezas de cuero sin curtir o piezas de cuero salado. Al igual que las pieles de cerdo, las pieles se cortan en trozos más pequeños antes de ser procesadas. A

veces, el término gelatina de piel de becerro se usa para describir la gelatina de piel. El encalado de las pieles suele tardar un poco más que el encalado de la oseína del hueso. En los últimos tiempos, el paso de encalado se ha sustituido por un breve tratamiento con hidróxido de sodio (Matyjaszewski, 2012).

Durante el proceso de encalado, se produce cierta desaminación del colágeno con desprendimiento de amoníaco. Este es el proceso principal que da como resultado rangos isoiónicos bajos para la gelatina tipo B (Matyjaszewski, 2012).

1.3.7. Gelatina de piel de cerdo (*Sus scrofa domesticus*)

La mayoría de la gelatina tipo A está hecha de pieles de cerdo, lo que produce grasa como subproducto comercializable. El proceso incluye la maceración de las pieles, el lavado para eliminar la materia extraña y el hinchamiento durante 10 a 30 h en ácido clorhídrico, fosfórico o sulfúrico al 1 al 5%. Luego se realizan de cuatro a cinco extracciones a temperaturas que aumentan de 55 a 65 °C para el primer extracto a 95 a 100 °C para el último extracto. Cada extracción dura alrededor de 4-8 h. Luego se elimina la grasa, la solución de gelatina se filtra y, para la mayoría de las aplicaciones, se desioniza. La concentración al 20-40% de sólidos se lleva a cabo en varias etapas mediante evaporación continua al vacío. La solución viscosa se enfría, se extruye en fideos finos y se seca a 30–60 °C en una cinta continua de malla de alambre. El secado se completa pasando los fideos a través de zonas de sucesivos cambios de temperatura en las que sopla aire acondicionado a través de la superficie ya través de la masa de fideos (Matyjaszewski, 2012).

1.3.8. Gelatina de cola de pescado (*Oreochromis niloticus*)

La fuente actual más abundante de gelatina son los mamíferos, especialmente los bovinos y porcinos. Así, teniendo en cuenta los problemas sanitarios recientes por el uso de estas especies, la gelatina marina se ofrece como alternativa a las gelatinas de mamíferos terrestres. El principal inconveniente de las gelatinas de pescado es que los geles basados en ellas tienden a ser menos estables y a tener peores propiedades reológicas que las gelatinas de mamíferos terrestres, lo que limita seriamente su campo de aplicación (Leuenberger, 1991). Esto se ha relacionado en gran medida con el número considerablemente menor de regiones ricas en Pro de la molécula de colágeno o gelatina en los peces de agua fría que en los animales de sangre caliente (Ledward, 1986; Norland, 1990).

La gelatina de pescado es un método ideal para brindarle valor a los desechos de mariscos, ya que la piel y las escamas de pescado contienen un alto nivel de colágeno. Esta aplicación de valorización también es un enfoque prometedor para satisfacer la creciente demanda de gelatina a nivel mundial. La gelatina de pescado se acepta como una fuente alternativa de gelatina con ventajas biotecnológicas y económicas (Du, 2016)

Las pieles de especies de peces tropicales, como la tilapia, se han descrito como una materia prima óptima para la producción de gelatina (Estados Unidos Patente nº US5093474A, 1992, Estados Unidos Patente nº 5.484.888., 1996).

Por tanto, el uso de piel de pescado para la producción de gelatina debe tener en cuenta al menos dos aspectos diferentes. Primero, la amplia diversidad entre las especies de peces, que presentan diferencias intrínsecas en las moléculas de colágeno presentes en su piel. En segundo lugar, la mayor susceptibilidad del material colágeno de la piel de pescado a la degradación debido al menor contenido de entrecruzamiento intracadena e intercadena no reducible (Norland, 1990; Montero, Borderías, Turnay, & Lizarbe, 1990; Montero, Álvarez, Martí, & Borderías, 1995) en contraste con el colágeno más estable de mamíferos (Asghar & Henrickson, 1982; Hickman, 2000).

La calidad de una preparación de gelatina depende de sus propiedades fisicoquímicas, que están muy influenciadas no solo por la especie o tejido del que se extrae, sino también por la severidad del método de fabricación (Johnston-Banks, 1990). Una optimización de los procedimientos de extracción de tejidos y un mejor conocimiento de las propiedades de la gelatina de piel de pescado podrían resultar útiles para racionalizar el uso de residuos de pescado.

1.3.9. Gelatina de Patas de pollo (*Gallus gallus domesticus*)

La composición de la gelatina de patas de pollo consta fundamentalmente de cinco aminoácidos Glicina, Alanina, Prolina, Ácido glutámico y Ácido Aspártico, los cuales se encuentran presentes en mayor cantidad. La siguiente tabla muestra la composición de todos los aminoácidos presentes en el colágeno de patas de pollo (Liu, Y.K, & M.T, 2001).

Cuadro 3. Grupo de aminoácidos presentes en las patas de pollo y colágeno de patas de pollo (Liu, Y.K, & M.T, 2001).

| Abreviatura | Aminoácidos | % en Patas de pollo | % en colágeno de patas de pollo, obtención con ácido clorhídrico |
|-------------|-----------------|---------------------|--|
| ASP | Acido aspártico | 8.65 | 16.22 |
| THR | Treonina | 3.27 | 6.74 |
| SER | Serina | 3.09 | 6.51 |
| GLU | Acido glutámico | 10.04 | 19.09 |
| PRO | Prolina | 11.72 | 10.79 |
| GLY | Glicina | 30.17 | 23.79 |
| ALA | Alanina | 12.67 | 15.61 |
| CYS | Cisteína | 0.29 | 0.44 |
| VAL | Valina | 4.95 | 10.18 |
| MET | Metionina | 1.15 | 2.29 |
| ILE | Isoleucina | 2.65 | 7.09 |
| LEU | Leucina | 5.17 | 13.25 |
| TYR | Tirosina | 0.90 | 2.25 |
| PHE | Fenilalanina | 1.84 | 5.04 |
| HIS | Histidina | 1.35 | 3.11 |
| LYS | Lisina | 4.70 | 8.93 |
| ARG | Arginina | 8.14 | 9.99 |

1.3.10. Gelatina vegetal

Científicamente, no existe una planta natural fuente de gelatina ya que las plantas no tienen colágenos. Sin embargo, se han realizado estudios de investigación hecho durante un largo período para desarrollar alternativas que posean la mayoría o todas las características únicas propiedades funcionales de la gelatina de mamíferos (Hassan & Osman, 2019).

La “gelatina vegetal” o los sustitutos de la gelatina a base de plantas normalmente se desarrollan a partir de plantas hidrocoides (Hassan & Osman, 2019). Éstos incluyen:

- Agar: también llamado agar-agar, gelosa, cola de pescado china, cola de pescado japonesa, bengala la cola de pescado o la cola de pescado de Ceilán, es polvo, tiras o escamas de un vegetal marino
- Carragenina: polisacárido extraído de algas rojas
- Pectina: sustancia polisacárida presente en las paredes celulares de todas las plantas
- Goma xantana: goma producida por bacterias. El medio bacteriano debe ser halal para el producto para ser halal
- Almidón de maíz modificado
- Goma de celulosa.

La carragenina proviene de algas o algas marinas, y se puede utilizar como agente espesante en lugar de gelatina. Generalmente se deriva de alga roja, a veces llamada musgo irlandés. La carragenina es un ingrediente común en muchos alimentos, incluyendo productos lácteos como yogur o leche chocolatada. El agar es una sustancia gelatinosa derivada de algas, el gelificante es un agente polisacárido no ramificado obtenido de las paredes celulares de algunas especies de algas rojas, principalmente de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*, o algas marinas (*Sphaerococcus euchema*). Comercialmente se deriva principalmente de *Gelidium amansii*. El agar (agar agar) se puede utilizar como laxante, un sustituto de la gelatina vegetariana, un espesante para sopas, en jaleas, helados y postres japoneses como anmitsu, como agente clarificante en la elaboración de cerveza, y para telas de encolado de papel (Jaswir, 2016).

Para aplicaciones alimentarias, se formulan con frecuencia sistemas de gel multicomponente que incorporan agar para lograr las propiedades reológicas deseadas en tales sistemas puede describirse mejor como un arte. La incorporación de azúcar (sacarosa) en el sistema puede aumentar la fuerza del gel. El azúcar compite con el agar por el agua en el sistema, aumentando de hecho la concentración del agar (Stephen, 2006).

El cambio a temperaturas más altas se explica por el aumento en el entrecruzamiento creado por enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo en azúcares y agarosa. Se encontró una relación lineal entre el cambio de temperatura y el número de hidratación dinámica o número de ecuatorial grupos hidroxilo. La incorporación de otras gomas en un sistema de gel de agar generalmente no altera sus propiedades gelificantes de ninguna manera útil. Los geles de agar son típicamente frágiles; la incorporación de goma de algarroba produce un gel más resistente y más dócil, similar a un gel de gelatina (Stephen, 2006).

1.3.11. Producción de grenetina y gelatina en México

La pandemia de SARS-CoV-2 incrementó en México y en el mundo la demanda de grenetina utilizada en suplementos alimenticios y vitaminas con los cuales las personas elevan sus defensas para protegerse del coronavirus (Sánchez, 2021).

En mayo del 2021 se produjeron 4 mil 136 toneladas de gelatina, un año atrás se obtuvieron 567 toneladas menos, lo que nos presenta un aumento del 13.70% según cifras de Instituto Nacional de Estadística y Geografía, como se muestra en la figura 5 (INEGI, 2021).

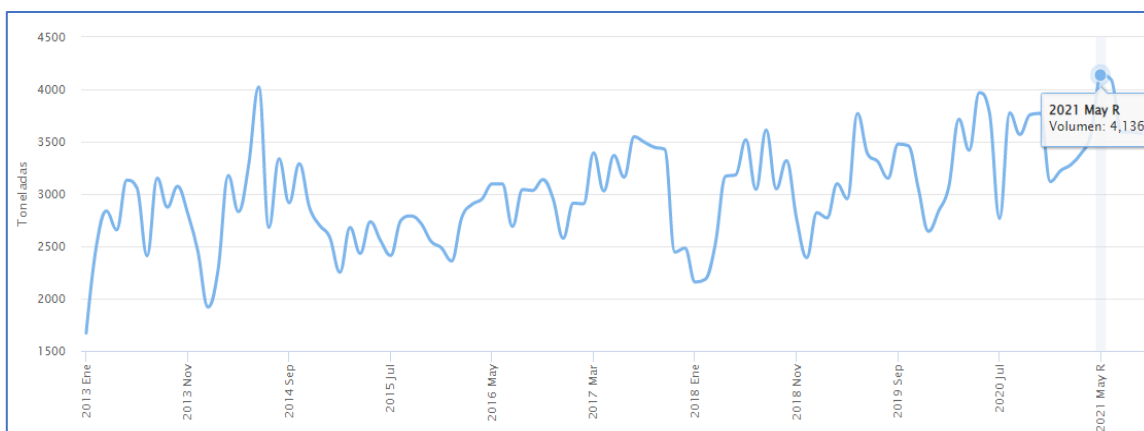


Figura 5. Producción de gelatina en México en toneladas por meses (INEGI, 2021).

La grenetina para septiembre del 2021 registro una producción de 2 mil 012 toneladas, si las comparamos con cifras del 2019, que se produjeron 1 mil 496 toneladas, se puede ver un aumento de casi 46.79% en su producción como se observa en la figura 6 (INEGI, 2021).

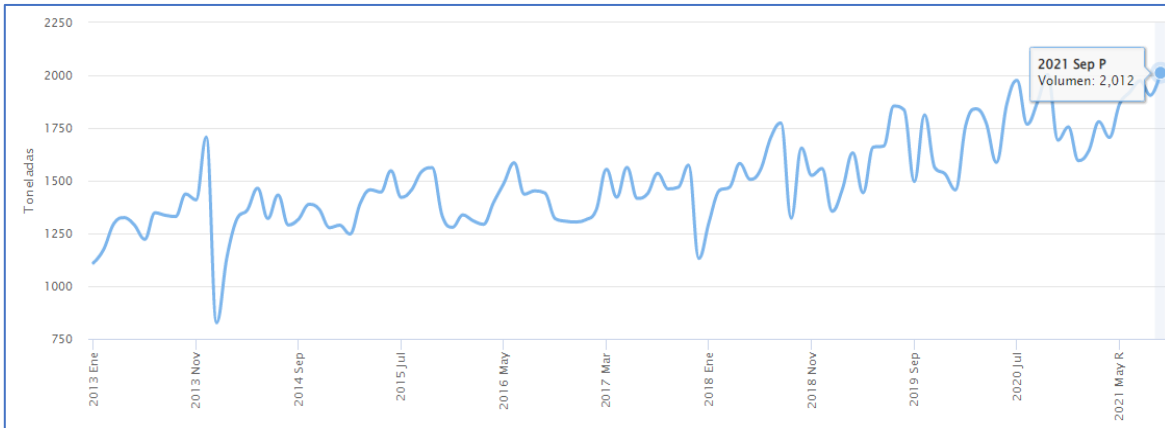


Figura 6. Producción de gretina en México en toneladas por meses (INEGI, 2021).

En México, existen alrededor de 10 empresas que producen gretina, entre los que destacan Gelita, Coloidales Duche, Helm, Progel mexicana y Gretina Regia. Ana De Nadai, directora de ventas y marketing de México y Centroamérica de Gelita, relató que el 2020 fue un año complicado, porque el consumo de gretina bajó en el sector alimenticio, pero a partir de septiembre la alta demanda del sector farmacéutico revirtió las tendencias (Sánchez, 2021).

"Los consumos de gretina bajaron en el segmento de alimentos, pero hubo un incremento muy importante en el sector farmacéutico, hablando de cápsulas blandas porque las personas estuvieron más preocupadas con su salud", contó. También detalló que a mediados del año pasado invirtieron para incrementar su producción en 20 por ciento, pues además de atender el mercado interno también elevaron las exportaciones de gretina.

Coloidales Duche es también uno de los fabricantes más importantes en México de gretina de res, cerdo y pescado, su planta tiene cuenta con una capacidad de producción de 3,600 toneladas anuales (Coloidales duche , 2021).

El valor de la producción en México de gretina alcanzó un valor de 260 mil 074 pesos, 68.90% más a lo registrado en 2019, el mayor incremento y valor desde que tiene registró el INEGI, esto se puede apreciar en la figura 7 (INEGI, 2021).

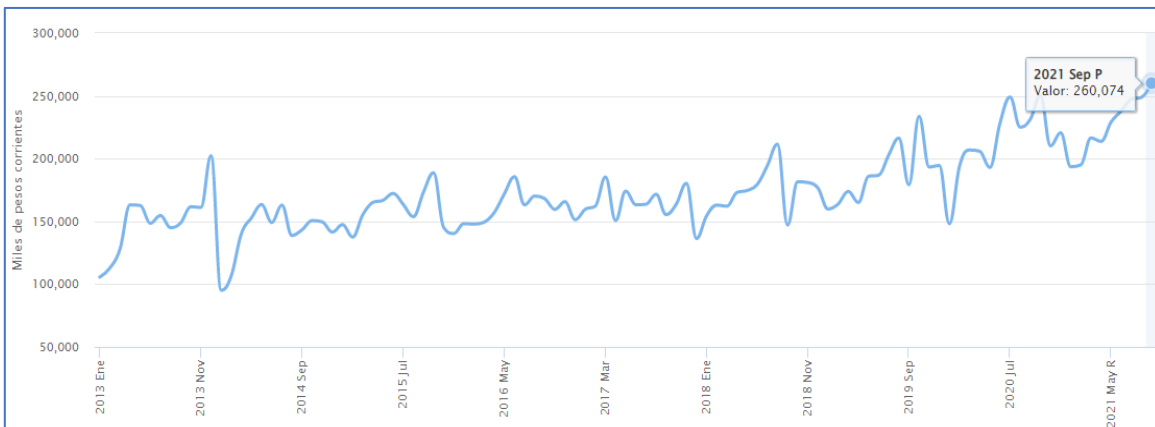


Figura 7. Valor de la producción en México de gretina (INEGI, 2021).

El valor de la producción en México de gelatina para septiembre del 2021 fue de 263 mil 945 pesos, una cifra que no tiene diferencias significativas en comparación a la de 2019 pero es mayor 1.11%, como se presenta en la figura 8 (INEGI, 2021).

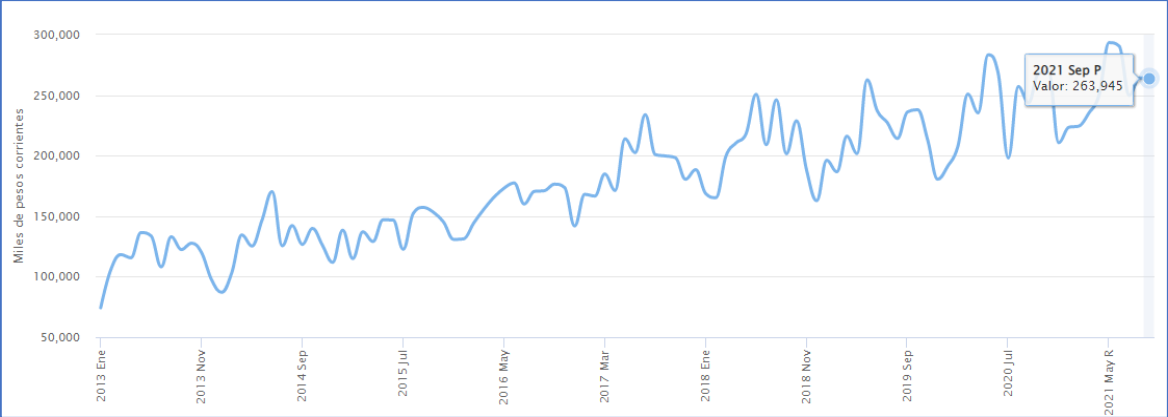


Figura 8. valor de la producción en México de gelatina (INEGI, 2021).

A pesar de que el país es deficitario en grenetina, sólo se importaron 7 mil 203 toneladas de este insumo entre enero y noviembre del año pasado, 16.1 por ciento inferior a lo registrado en igual lapso de 2019. Mientras que se exportaron 2 mil 232 toneladas, 53.6 por ciento superior a lo reportado en los primeros once meses de un año previo (Sánchez, 2021).

1.3.12. Producción Mundial

Se prevé que el mercado mundial de la gelatina estará impulsado por demanda creciente de productos nutracéuticos y farmacéuticos. La demanda de gelatina se estimó en 625.5 mil toneladas en 2019 y se espera que alcance las 915.9 mil toneladas para 2027, ascendiendo a una tasa compuesta anual de 5,6% de 2020 a 2027 (Grand View Research, 2020).

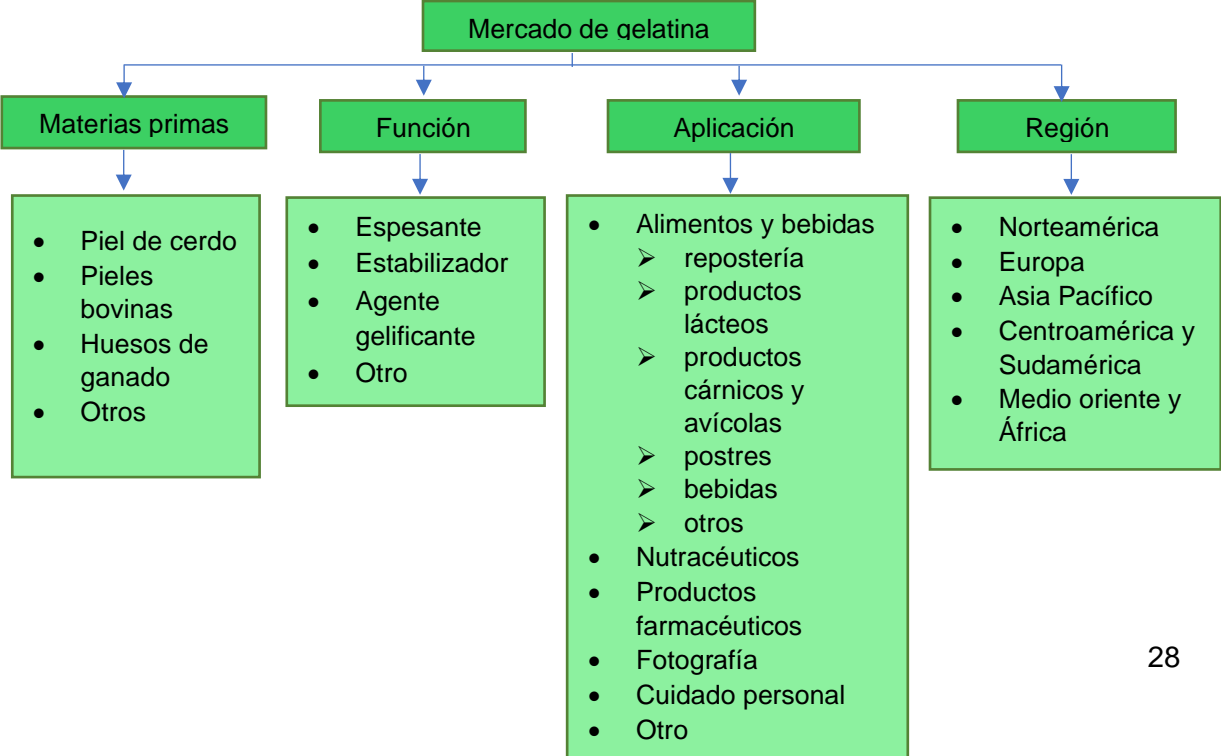


Figura 9. Segmentación y alcance del mercado de gelatina (Grand View Research, 2020).

La piel de cerdo emergió como el segmento de materia prima dominante en el mercado y representó una participación de volumen de más del 39% en 2019. Se proyecta que el segmento ascienda a una tasa compuesta anual del 5,5% sobre el pronóstico en ese período. El crecimiento en este segmento se puede atribuir a abundante disponibilidad de inventario porcino y también a su mayor contenido de colágeno en peso junto con el aminoácido contenido (Grand View Research, 2020).

En la siguiente figura se pueden apreciar el volumen e ingresos del mercado de gelatina donde hasta el año 2017 fueron 551.7 mil toneladas y los años posteriores solo se han estimado, el año que con más certeza se ha declarado es el 2019 con 625.5 mil toneladas.

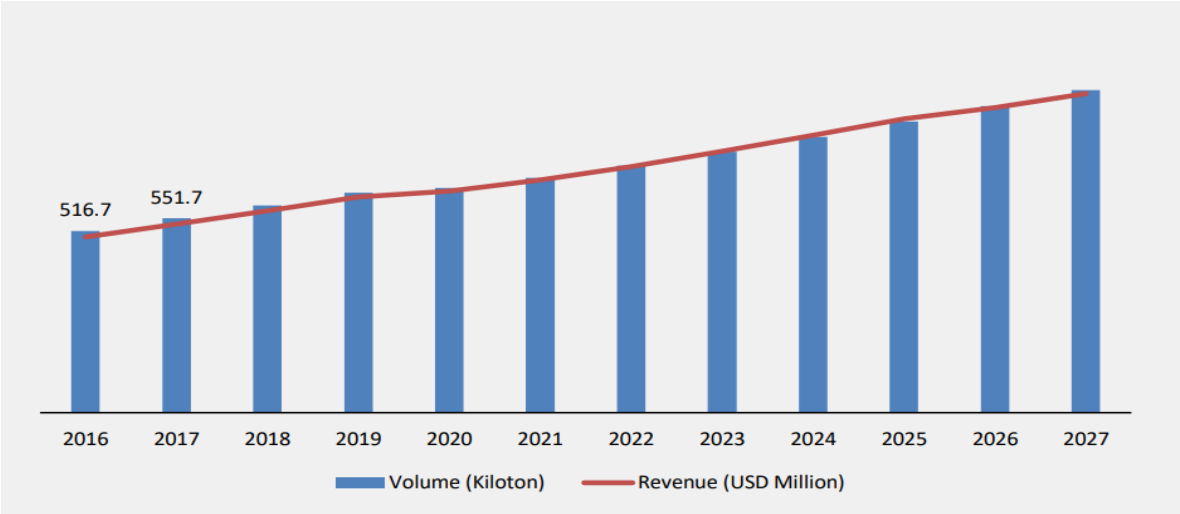


Figura 10. Volumen e ingresos del mercado de gelatina, 2016-2027, (miles de toneladas) (Millones de USD) Fuentes: PFMA, FEDIAF, FDA, Pet Food Industry Magazine, Investor Presentations, Primary Interviews Grand View Research

En 2019, Europa emergió como el mayor mercado de gelatina. El crecimiento en esta región se puede atribuir a una mayor conciencia entre los consumidores, nutracéuticos e industria farmacéutica, y el creciente consumo de productos de confitería (Grand View Research, 2020).

El principal exportador en 2021 fue Alemania con un valor de exportación de USD 1.6 billones (Tridge, 2021). En el siguiente figura se hace una comparativa de las exportaciones de Alemania, China y México los tres primeros exportadores de gelatina en el mundo.

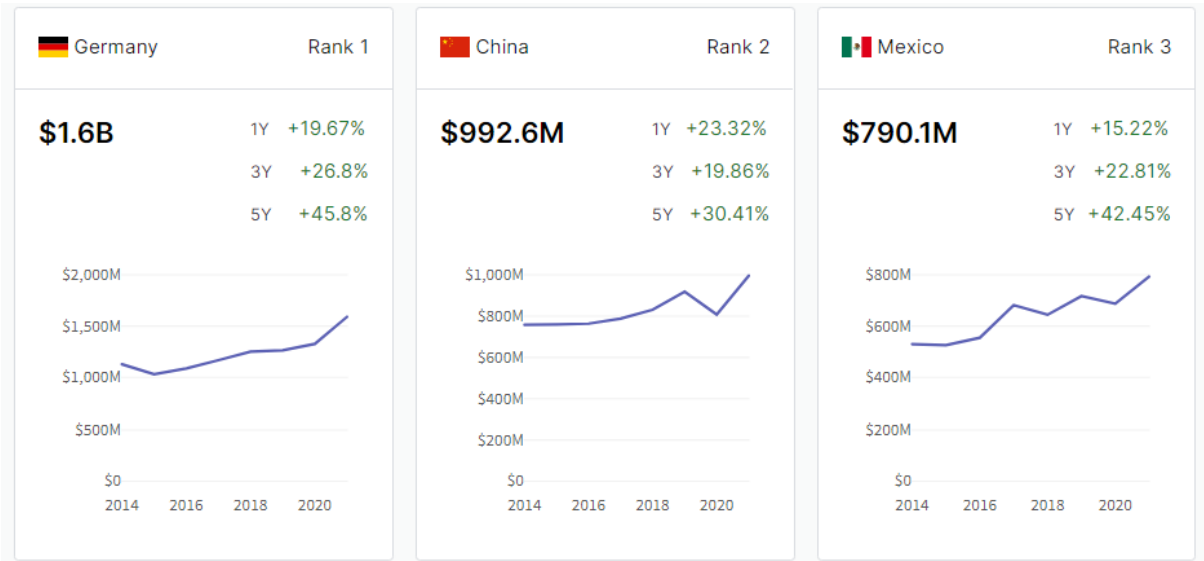


Figura 11. Tendencia de exportación de los 3 países principales que tienen los valores de exportación más altos (Tridge, 2021).

En la siguiente figura 12, podemos encontrar un gráfico con las tendencias de los 5 principales exportadores del mundo.

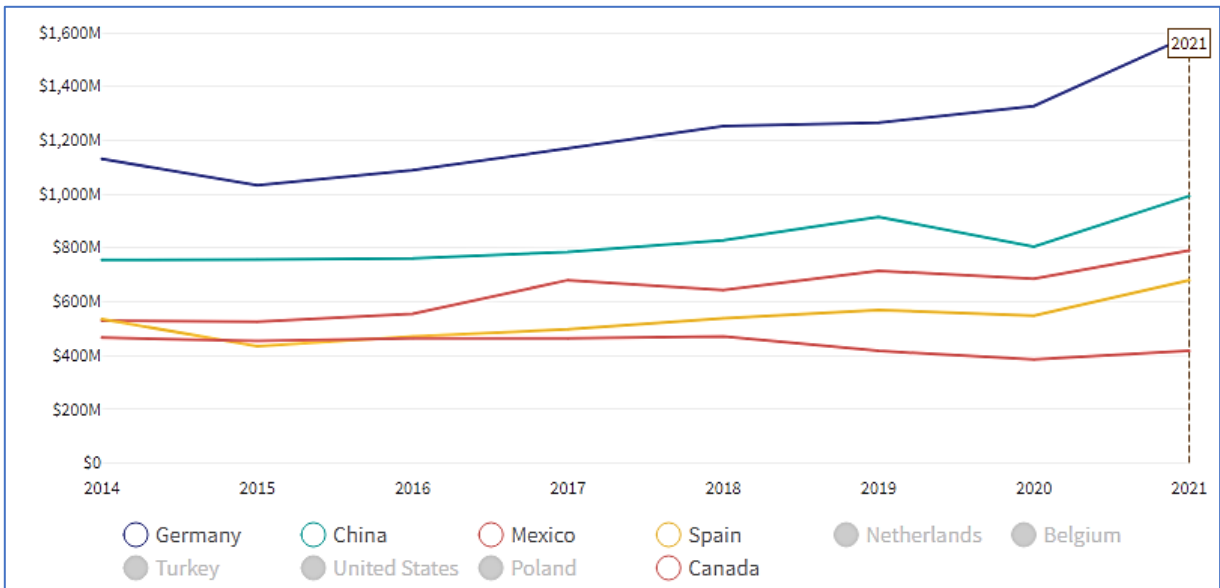


Figura 12. Estas son las tendencias de exportación de los 5 principales exportadores de gelatina de 2014 a 2021.

También en la siguiente figura 13 se pueden apreciar los principales flujos de exportación donde el flujo de México a estados unidos lidera el Rankin con un valor de exportación de USD 761.83 M.

| Trade Flow | Export Value 2021, USD | 1-Year Growth in Export Value 2020-2021 | 3-Year Growth in Export Value 2018-2021 | 5-Year Growth in Export Value 2016-2021 |
|---------------------------|---------------------------|---|---|---|
| Mexico to United States | \$761.83M | +20.79% | +35.4% | +56.81% |
| Canada to United States | \$410.55M | +9.05% | -9.66% | -7.85% |
| United States to Canada | \$294.20M | +18.14% | -5.92% | +3.78% |
| Germany to United States | \$271.67M | +22.69% | +70.52% | +170.61% |
| China to United States | \$204.96M | +23.57% | +32.78% | +56.54% |
| Germany to Netherlands | \$187.99M | +38.31% | +71.02% | +87.19% |
| Spain to United States | \$152.22M | +15.59% | +76.53% | +219.19% |
| Netherlands to Germany | \$149.18M | +18.46% | +15.97% | +3.93% |
| Turkey to United States | \$131.22M | +31.61% | +61.19% | +70.69% |
| Germany to United Kingdom | \$124.88M | +10.56% | +13.8% | +7.91% |

Figura 13. Los principales flujos de exportación de Jelly en 2020. El principal flujo de exportación en 2020 fue de México a Estados Unidos, con un valor de exportación de USD 761. 83 M (Tridge, 2021).

El principal importador en 2020 fue Estados Unidos con un valor de importación de USD 2.3 billones.

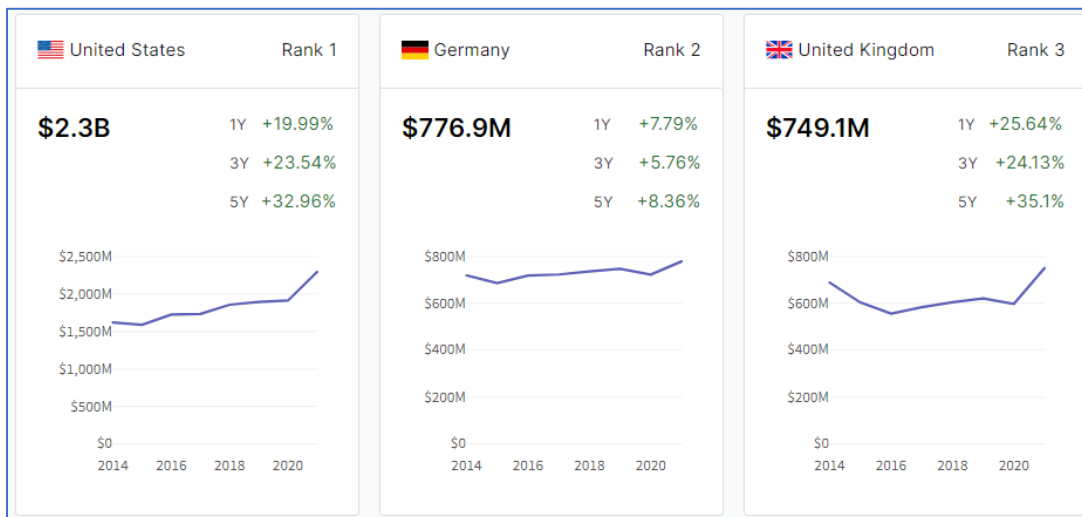


Figura 14. Tendencia de exportación de los 3 países principales que tienen los valores de importación más altos (Tridge, 2021).

En la siguiente figura 15 se pueden apreciar las tendencias de importación de los 5 principales importadores del mundo.

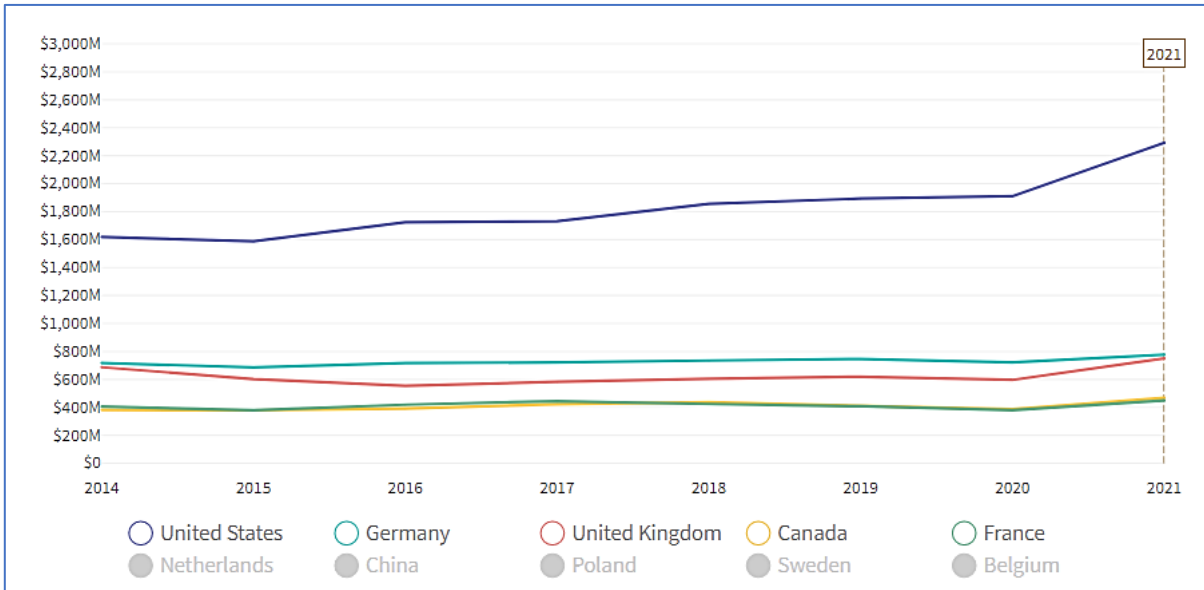


Figura 15. Estas son las tendencias de importación de los 5 principales importadores de gelatina de 2014 a 2021 (Tridge, 2021).

Por último, en figura 16 se puede observar los principales flujos de importación donde el flujo de México a estados unidos sigue siendo el que lidera el Rankin con un valor de importación de USD 830.43 M.

| Trade Flow | Import Value 2021, USD | 1-Year Growth in Import Value 2020-2021 | 3-Year Growth in Import Value 2018-2021 | 5-Year Growth in Import Value 2016-2021 |
|---------------------------|---------------------------|---|---|---|
| Mexico to United States | \$830.43M | +23.78% | +37.6% | +47.03% |
| Canada to United States | \$405.46M | +7.89% | -7.83% | -8.7% |
| United States to Canada | \$262.19M | +15.58% | -3.48% | +1.93% |
| Germany to United States | \$220.43M | +26.37% | +59.59% | +99.05% |
| Turkey to United States | \$136.61M | +32.66% | +55.77% | +66.56% |
| Germany to United Kingdom | \$131.33M | +62.23% | +43.13% | +45.52% |
| Spain to United States | \$127.42M | +5.17% | +43.1% | +141.59% |
| Belgium to Netherlands | \$124.16M | +14.72% | -1.3% | +16.66% |
| Belgium to Germany | \$123.73M | -0.79% | +12.33% | +0.44% |
| Belgium to United Kingdom | \$120.97M | +62.57% | +55.49% | +85.02% |

Figura 16. Los principales flujos de exportación de Jelly en 2021. El principal flujo de importación en 2021 fue de México a Estados Unidos, con un valor de importación de USD 830.43 M (Tridge, 2021).

Dado el creciente mercado de la gelatina, la demanda de materias primas también ha aumentado a nivel mundial. Los desechos agroalimentarios derivados de animales, como huesos, pieles y tejidos conectivos de ganado vacuno, aves de corral y animales marinos, son las fuentes principales (Ravindran & Jaiswal, 2016). cómo se puede apreciar en la figura 17.

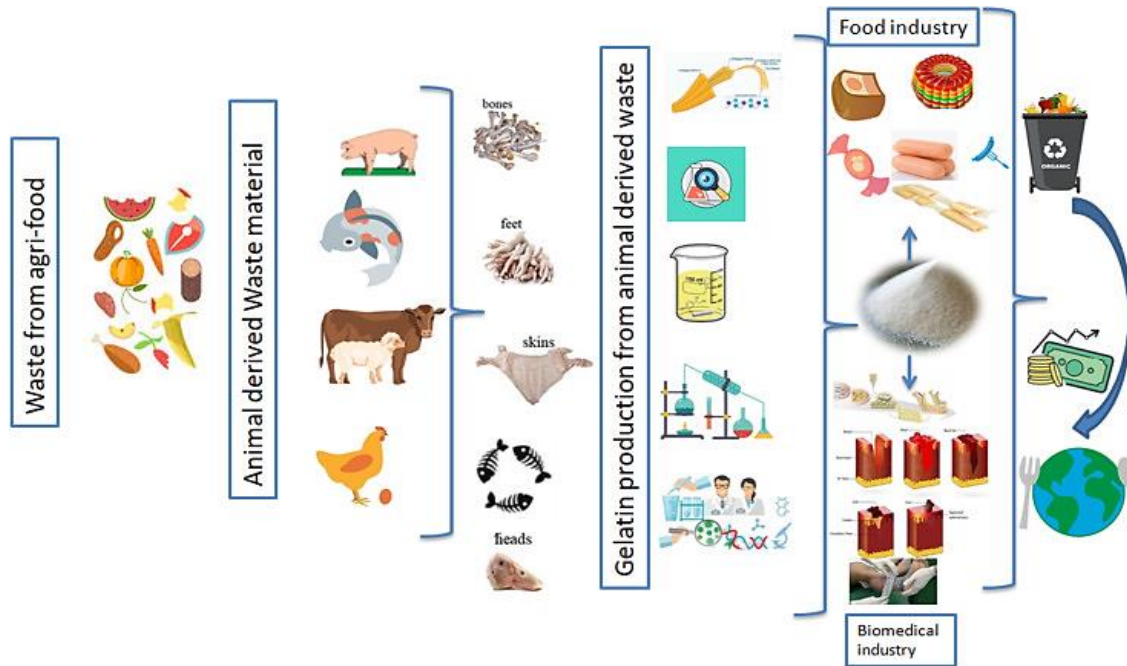


Figura 17. Valorización de residuos de origen animal en gelatina y su uso en diferentes industrias (Ravindran & Jaiswal, 2016).

1.3.13. Beneficios del consumo de gelatina

La gelatina ha sido durante muchas décadas un ingrediente en dietas blandas. Adecuado para su uso en enfermedades que afectan al estómago y al intestino: uno de los principales beneficios de la gelatina en esta aplicación es que se comporta como un "líquido sólido". El paciente tiene una alternativa masticable a los alimentos dietéticos pastosos. Esta característica disponible, por sí sola, provoca un aumento del apetito y, además, a medida que la gelatina se derrite a la temperatura corporal, es reabsorbida y digerida por el cuerpo simplemente como un líquido. La gelatina como ingrediente en productos alimenticios también proporciona una muy fina distribución de los nutrientes en los alimentos. Esto reduce la cantidad de trabajo degradante que debe ser realizado por los órganos digestivos y evita la secreción innecesaria de jugo gástrico. Es interesante notar que hace cientos de años, la gelatina, en forma de frutas en gelatina, a menudo se servía después de suntuosas comidas. Entonces reconoció que la gelatina podía aliviar el estrés digestivo después de tal evento (Schrieber & Gareis, 2007).

La gelatina también es un ingrediente valioso en otros tipos de dietas. Alimentos que no contienen carbohidratos, barras sin azúcar, tabletas de vitaminas y solubles

en agua fría, los téis instantáneos son solo algunos ejemplos de lo que se puede hacer por los diabéticos usando gelatina, un hidrocólido libre de carbohidratos. Con gelatina, se pueden elaborar platos de crema sin tener que ligar y aclarar con huevos y nata; luego se vuelven más digeribles para personas con problemas de vesícula biliar. Para los que sufren ciertos tipos de enfermedad renal, el contenido total de proteínas, incluida la gelatina, debe estar restringido (Schrieber & Gareis, 2007).

También podemos decir que la gelatina es una fuente de proteínas de alta calidad y fácil digestión, libre de colesterol y azúcar, y prácticamente no contiene grasas. Sin embargo, no es un suplemento proteico general óptimo, ya que no es una proteína completa: carece por completo del aminoácido esencial triptófano y tiene niveles relativamente bajos de algunos otros aminoácidos esenciales como la metionina, la histidina y la isoleucina. La gelatina se aplica en productos alimenticios para enriquecer el contenido de proteínas, reducir la cantidad de carbohidratos, la concentración de sal y la cantidad de grasa en productos bajos en grasa y como portador de vitaminas. Algunos estudios internacionales sugieren que la gelatina puede tener un efecto preventivo y regenerador sobre el esqueleto y el sistema locomotor, especialmente los huesos, cartílagos, tendones y ligamentos. También se sugiere que la gelatina puede ayudar a fortalecer el cabello si se toma regularmente y fortalecer el tejido conectivo, asegurando así una piel firme, cabello brillante y uñas fuertes. Por estas razones, la gelatina (generalmente gelatina hidrolizada) es un ingrediente común en suplementos nutracéuticos y alimentos funcionales (Phillips, 2021).

El método clásico de reducir la grasa usando gelatina es mediante el uso de productos aspic. Los productos aspic se preparan incorporando alimentos listos para comer en una gelatina picante, la solución aspic en sí, una vez que se ha fraguado, es transparente y se puede cortar. Carne, pescado, otros mariscos, verduras y las frutas son los alimentos que se suelen utilizar para este fin (Fig. 18).

Aquí, la carne, y por lo tanto la grasa, se reemplaza por carne en gelatina. caldo y verduras. A pesar de esto, debido a la composición de aminoácidos de la gelatina, el valor biológico de la proteína total de tal producto aspic es muy alto; Incluso una mezcla 50:50 de carne y áspic tiene el mismo valor biológico que la de la carne sola (Schrieber & Gareis, 2007).



Figura 18. Una mezcla 50:50 de carne y aspic tiene el mismo valor como el de la carne sola, pero contiene menos grasa (Autor desconocido, licencia CC BY-NC-ND, Fecha de consulta 25/10/2021)

1.3.14. Aplicaciones

En el siguiente cuadro número 4, se puede observar la multifuncionalidad de la gelatina, que va desde postres, gomitas de frutas y malvaviscos, hasta pastillas y caldos de productos cárnicos, en la primera columna se encuentra la aplicación, en la segunda el tipo de gelatina de acuerdo a sus grados Bloom, en la tercera columna podemos apreciar la concentración en la que la gelatina se encuentra en la aplicación que se requiere. En la cuarta columna esta la función principal de la gelatina en esa aplicación y en la quinta y última columna podemos notar su función secundaria.

Cuadro 4. La multifuncionalidad de la gelatina, por ejemplo, en la producción de alimentos (Schrieber & Gareis, 2007).

| Aplicación | Tipo de gelatina | Concentración | Función principal | Función secundaria |
|-------------------|------------------|---------------|---------------------------------------|---|
| Postres | 200–260 Bloom | 1.5–3.0% | Formación de gel | Textura, transparencia, brillo. |
| Gomitas de frutas | 200–280 Bloom | 6.0–10.0% | Formación de gel | Textura, elasticidad, transparencia, brillo. |
| Malvaviscos | 160–260 Bloom | 1.0–3.0% | Formación de espuma | Estabilizador de espuma, formación de gel. |
| Turrón | 180–220 Bloom | 1.5–3.0% | Formación de espuma | Estabilizador de espuma, formación de gel. |
| Pastillas | 160–220 Bloom | 1.0–2.0% | Agente de unión | Textura, mejora de propiedades de fusión en la boca, previene desintegración. |
| Caramelos | 140–200 Bloom | 0.5–2.5% | Emulsionante, estabilizador de espuma | Masticabilidad |
| Yogurt | 220–260 Bloom | 0.2–1.0% | Estabilizador de sinéresis | Textura, cremosidad |

| | | | | |
|---|---------------|----------|---------------------------|------------------------------|
| Postre espumado de leche | 180–240 Bloom | 0.3–3.0% | Formación de espuma | Textura, estabilización |
| Postre gelatina de leche | 180–240 Bloom | 1.0–2.0% | Formación de gel | Textura, cremosidad |
| Para untar en sándwich (sin carne) | 240–280 Bloom | 0.3–1.5% | Estabilizador de emulsión | Textura, cremosidad |
| Carne y salchichas | 220–260 Bloom | 0.5–2.0% | Estabilizador de emulsión | Aglutinante de agua |
| Caldos y carnes enlatadas | 220–260 Bloom | 0.5–2.0% | Agente de unión | Textura, capacidad de corte. |

1.4. Integridad y autenticidad de los alimentos

Durante la 22.^a reunión del Comité del Codex sobre Sistemas de Inspección y Certificación de Importaciones y Exportaciones de Alimentos (CCFICS 22) en 2016. La delegación de la República Islámica de Irán describió la dificultad que tienen los consumidores para determinar la autenticidad de los alimentos y la necesidad de nuevas metodologías y directrices del Codex para asistir a las autoridades a afrontar el considerable incremento del fraude alimentario (FAO/OMS, 2018).

Durante esta reunión se decidió elaborar un documento de debate sobre la posibilidad de abordar hechos de esta índole, aquí fue cuando la república islámica con el apoyo de varias delegaciones, lo llevaron a cabo, ya que habían experimentado diversas formas de fraude alimentario, al faltar o no estar ampliamente difundidos los métodos analíticos para que las autoridades alimentarias pudieran detectarlo.

Al año posterior se discutió el documento de debate sobre la integridad y la autenticidad de los alimentos. Se propuso emprender un examen de los textos existentes del Codex con miras a obtener una visión clara de las omisiones en esta esfera, así como también en qué medida los textos del Codex abordan la integridad y la autenticidad de los alimentos, haciendo hincapié especialmente en los textos de CCFICS. Dado el amplio respaldo del Comité sobre la necesidad de emprender un trabajo preliminar en esta esfera, el Comité convino en establecer un grupo de trabajo por medios electrónicos (GTe), presidido por la República Islámica de Irán y copresidido por Canadá y la Unión Europea, con inglés únicamente como idioma de trabajo (FAO/OMS, 2018).

El GTe estuvo compuesto por representantes de Alemania, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Ecuador, EE.UU, Egipto, Francia, Grecia, Guatemala, India, Indonesia, Irán, Irlanda, Jamaica, Japón, Kazajstán, México, Nueva Zelandia, Noruega, Países Bajos, Perú, República de Corea, República Dominicana, Reino Unido, Singapur, Tailandia, Unión Europea, y las siguientes instituciones:

COFEPRIS, FAO, FIVS, FDE, FIA, GOED, ICGA, ICBA, ICGM, IDF, IFVJA, IGMA, MSU, SGAE, SSAFE y USP.

El comité del Codex con ayuda de su grupo de trabajo por medios electrónicos (GTe) definió la integridad de los alimentos y a la autenticidad de alimentos como se detalla a continuación:

- Integridad de los alimentos

Es la condición de un producto alimenticio que es auténtico y cuyas características previstas, incluidas la inocuidad, la calidad y la nutrición, no han sido alteradas o modificadas (Codex , 2021).

- Autenticidad de alimentos

Se entiende como autenticidad de alimentos a la calidad genuina de un alimento, de naturaleza, origen, identidad y declaraciones indiscutibles y que satisface las propiedades previstas (Codex , 2021).

1.5. Riesgos en la salud por el consumo de gelatina

Este tipo de alimento posee una gran popularidad entre las personas convalecientes ya que se piensa popularmente que es un alimento bastante completo, sin embargo, las proteínas de la colágena prácticamente no poseen aminoácidos esenciales, se puede considerar como un alimento de fácil digestión, con cierto poder calórico (Valle & Lucas, 2000).

Los macronutrientes como los lípidos, los carbohidratos y las proteínas, se requieren diariamente en cierta cantidad para equilibrar la dieta y mantener un buen estado nutricional. Sin embargo, de acuerdo a su composición, uso y a su excesivo consumo, pueden generar algunos riesgos para la salud (Bejarano & Suárez, 2015).

En nuestro caso las gelatinas como componente principal contienen carbohidratos, por ello es importante detallar que:

- Carbohidratos

Los carbohidratos son polihidroxialdehidos y polihidroxiacetonas compuestos de carbono, hidrogeno y oxígeno. Se clasifican en tres grandes grupos: azúcares o carbohidratos simples, oligosacáridos y carbohidratos complejos o polisacáridos (Velásquez, 2006; European Food Information Council, 2021).

La mínima cantidad de carbohidratos de la dieta compatible con la vida probablemente es cero, siempre y cuando se consuman las cantidades adecuadas de proteínas y grasas. La cantidad de carbohidratos de la dieta que proporciona una salud óptima es desconocida (Institute Of Medicine of The Nationals Academies, 2005). Las únicas células dependientes de glucosa como combustible oxidable son las del sistema nervioso central (el cerebro) y aquellas que dependen de la glucólisis anaerobia (glóbulos rojos, blancos y médula renal). La cantidad mínima de glucosa que necesita el cerebro de un adulto está

entre 110g/d y 140g/d (Institute Of Medicine of The Nationals Academies, 2005), y esta cantidad puede ser cubierta con el consumo de carbohidratos complejos tipo almidón.

Actualmente, se evidencia la relación que existe entre el consumo de alimentos altos en azúcares y bebidas azucaradas y el impacto negativo en la salud en todo el mundo (Cabezas & Hernández, 2016).

- **Proteínas**

Participan en gran variedad de funciones metabólicas, ayudan al crecimiento y mantenimiento de tejidos, a los procesos inmunitarios y a la mayoría de los procesos biológicos de los seres vivos, el mantenimiento de los niveles apropiados de lípidos en el sistema vascular, entre otros (Velásquez, 2006). Las de origen animal, que son las más utilizadas en los productos de venta en vía pública, se encuentran en pinchos de carne de res y pollo, hamburguesas, quesos como ingrediente de las arepas y en derivados cárnicos como los chorizos y las salchichas para los perros calientes. Al llevar una dieta alta en proteínas se pueden tener consecuencias metabólicas en diversos sistemas y órganos, incluyendo alteraciones en el metabolismo hidroelectrolítico y ácido base, en el metabolismo óseo, en la función renal y en la función endocrina. De particular significación son las alteraciones del crecimiento en la edad pediátrica, y el riesgo aumentado de urolitiasis, osteoporosis y obesidad en etapas posteriores de la vida (López, 2009; Bejarano & Suárez, 2015)

1.6. Legislación mexicana establecida para definir y regular las gelatinas

NORMA MEXICANA: NMX-F-041-1983: ALIMENTOS - POSTRE DE GELATINA DE SABORES.

La Norma mexicana establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado " Postre de gelatina de sabores ". El producto objeto de la norma se clasifica en un sólo tipo de acuerdo con los ingredientes utilizados en su preparación, con un sólo grado de calidad, designándose como postre de gelatina de sabores. También detalla el grado de calidad debe cumplir con ciertas especificaciones, como color, sabor, olor y aspecto.

La norma hace referencia a las siguientes normas mexicanas presentadas en el cuadro 5.

Cuadro 5. Referencia de Normas Mexicanas gelatina.

| Norma: | Establecimiento: |
|--------------------|--|
| NMX-F-066-S | Determinación de cenizas en alimentos. |
| NMX-F-068-S | Alimentación. Determinación de proteínas. |
| NMX-F-083 | Determinación de humedad en productos alimenticios |

| | |
|--------------------|--|
| NMX-F-164-S | Alimentos para humanos. Especies molidas y similares. |
| NMX-F-205 | Determinación de la acidez en polvo, expresada como ácido cítrico. |
| NMX-F-253 | Cuenta de bacterias mesofílicas aerobias. |
| NMX-F-304 | Método general de investigación de Salmonella en alimentos. |
| NMX-F-310 | Determinación de cuenta de Estafilococos áureo. |
| NMX-Z-012 | Muestreo para la inspección de atributos |

NORMA MEXICANA: NMX-F-043- 1970. ALIMENTOS PARA HUMANOS. CALIDAD PARA GRENETINA PURA COMESTIBLE.

Esta Norma establece las características y especificaciones que debe presentar el producto normalizado. La norma detalla que la Grenetina Pura Comestible, tendrá dos tipos con un solo grado de calidad, cada uno: Tipo I y Tipo II. La única diferencia que se encuentra o establece dentro de esta clasificación son sus grados Bloom, para Tipo I tiene un rango de 180 o mayor y para Tipo II es 179 o menor.

La norma hace referencia a las siguientes normas mexicanas presentadas en el cuadro 6.

Cuadro 6. Referencia de Normas Mexicanas gelatina.

| Normas: | Establecimiento: |
|-------------------|--|
| NMX-F-188. | Método de Prueba para la Determinación de Dióxido de Azufre, en Grenetina. |
| NMX-F-190. | Método de Prueba para la Determinación de Arsénico, en Grenetina. |
| NMX-F-189. | Método de Prueba para la Determinación de Hierro, en Grenetina. |
| NMX-F-191. | Método de Prueba para la Determinación de Cobre, en Grenetina. |
| NMX-F-192. | Método de Prueba para la Determinación de Zinc, en Grenetina. |
| NMX-F-193. | Método de Prueba para la Determinación de Plomo, en Grenetina. |
| NMX-F-106. | Método de Prueba para la Determinación de Cenizas en Grenetina. |
| NMX-F-105. | Método de Prueba para la Determinación de Humedad en Grenetina. |
| NMX-F-194. | Método de Prueba para la Determinación de pH, en Grenetina. |
| NMX-F-195. | Método de Prueba para la Determinación de Viscosidad, en Grenetina. |
| NMX-F-196. | Método de Prueba para la Determinación de Grasa en Grenetina. |
| NMX-F-197. | Método de Prueba para la Determinación de la Conservación de las cualidades Originales en Grenetina. |
| NMX-F-198. | Método de Prueba para la Determinación del número de colonias en Grenetina. |
| NMX-F-199. | Método de Prueba para la Determinación de la Presencia de Escherichia coli en Grenetina. |
| NMX-F-200. | Método de Prueba para la Determinación de la Presencia de Bacterias, licuefacientes en Grenetina. |
| NMX-F-201 | Método de Prueba para la Determinación de la presencia de Bacterias Anaerobias en Grenetina. |

1.7. Técnicas de autenticación de especies

1.7.1. El ADN

Las células contienen varias macromoléculas, como son los polisacáridos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas macromoléculas pueden clasificarse como polímeros; es decir, moléculas que tienen una unidad estructural que se repite muchas veces. Los polisacáridos se forman por la unión de monosacáridos, las proteínas por la de aminoácidos y los ácidos nucleicos por la de nucleótidos. Los ácidos nucleicos son de dos clases: a) ácido desoxirribonucleico o ADN, que tiene como unidad estructural al desoxirribonucleótido o desoxinucleótido, y b) el ácido ribonucleico o RNA, que tiene al ribonucleótido (Jiménez & Merchant, 2003).

La molécula de ADN es un polímero que se forma por enlace covalente de miles de desoxinucleótidos. El desoxinucleótido, o unidad estructural del ADN, contiene un ácido fosfórico, un azúcar de 5 átomos de carbono o pentosa y una base nitrogenada. El ADN contiene 4 bases nitrogenadas: adenina (A) y guanina (G), que derivan de la purina, y citosina (C) y timina (T), que derivan de la pirimidina (Figura 18). El enlace de la pentosa (que en el caso del ADN es una desoxirribosa) y una base nitrogenada forma una molécula denominada deoxinucleósido. La unión de un ácido fosfórico a esta molécula forma el desoxinucleótido (figura 19) (Jiménez & Merchant, 2003).

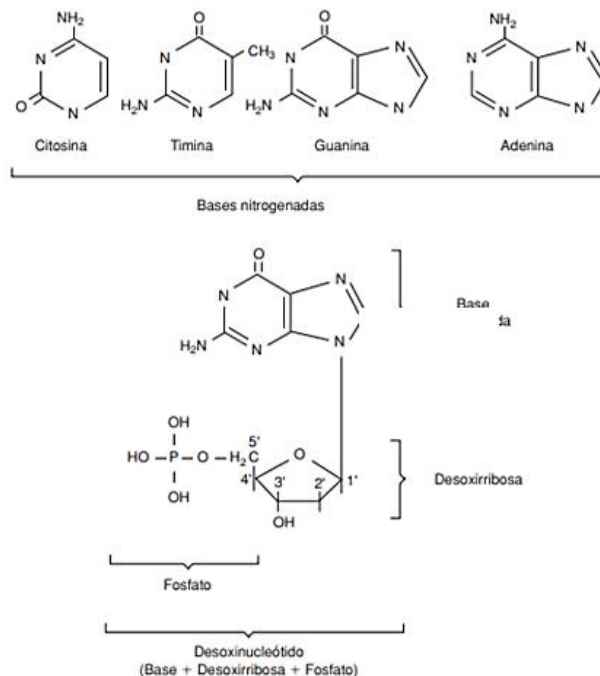


Figura 19. Estructura química del ADN. (Jiménez & Merchant, 2003)

1.7.1.1. Tipos de ADN

- **ADN genómico o cromosomal**

El ADN está constituido de cuatro diferentes nucleótidos, cada uno formado por tres componentes químicos: un fosfato (PO₄); un azúcar (la 2'-desoxirribosa); y una base nitrogenada que puede ser una purina, ya sea una adenina (A) o guanina (G), o bien una pirimidina, una timina (T) o una citosina (C). Cada 2'-desoxirribosa presenta un extremo 5' y un extremo 3', por lo que estos extremos se emplean para describir la dirección en que se ordenan los nucleótidos. Las bases nitrogenadas pueden formar puentes de hidrógeno en un código de apareamiento que define que una G sólo puede unirse a una C, mientras que una A sólo puede unirse a T. A este tipo de apareamientos entre bases nitrogenadas G/C y A/T se denomina "Watson y Crick", y resulta de la forma en que se pueden formar los puentes de hidrógeno entre las parejas G/C y A/T. La especificidad de los apareamientos tipo Watson y Crick está determinada por los grupos funcionales que sirven como donadores o aceptores de protones en la formación de los puentes de hidrógeno (Lisker & Zentella, 2013).

Los nucleótidos que constituyen al ADN están ordenados uno tras otro formando dos cadenas de fosfatos y 2'-desoxirribosas unidos en forma alternada. Las cuatro bases nitrogenadas (G, A, T y C) están orientadas entre las dos cadenas de fosfato y 2'-desoxirribosa. En el genoma humano, cada cadena tiene cientos de miles de nucleótidos. Por convención, las secuencias de ácidos nucleicos siempre se escriben en dirección 5' -> 3'. Cuando se escriben las dos cadenas de ADN, se entiende que la cadena superior corresponde a la cadena sentido, por leerse de izquierda a derecha (5' -> 3') (figura 19) (Lisker & Zentella, 2013).

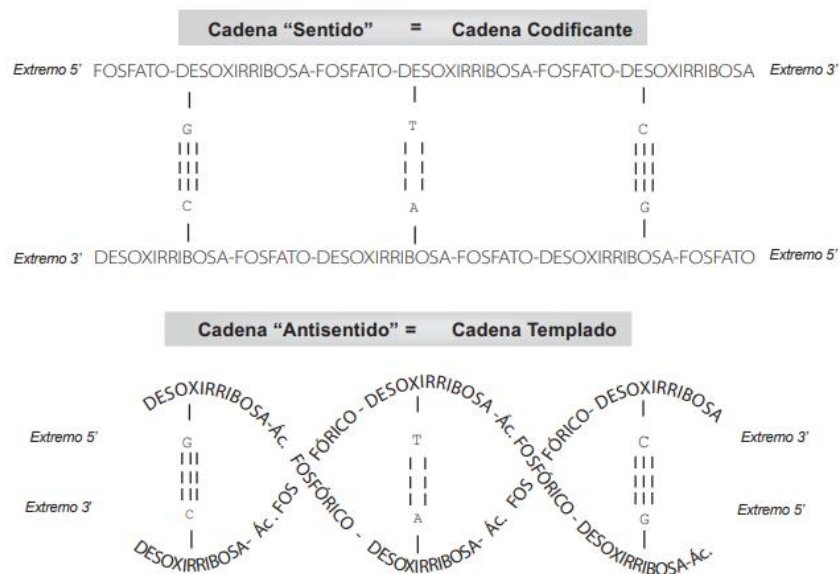


Figura 20. Esquema de la estructura del DNA (Lisker & Zentella, 2013).

Ambas cadenas se mantienen unidas por los puentes de hidrógeno entre las bases, formando apareamientos Watson y Crick. Gracias a esta unión entre los nucleótidos de las dos cadenas complementarias, la longitud de un tramo de DNA se da en pares de bases (pb). Además de que las dos cadenas de nucleótidos están dispuestas en forma antiparalela, se encuentran trenzadas formando una alfa hélice derecha que tiene casi diez pares de bases por vuelta (figura 20). Las bases nitrogenadas son estructuras planas apiladas en el centro de esta alfa hélice. Los puentes de hidrógeno entre ellas le dan cohesión y estabilidad a la estructura helicoidal. Además, por la disposición espacial del enlace entre las bases nitrogenadas y las 2'-desoxirribosas al formarse la hélice, se generan dos surcos que corren a lo largo de la hélice. Uno de los surcos es más ancho que el otro, por tanto, se designan como surcos mayor y menor. Todas estas son las características de la estructura propuesta para el DNA por James D. Watson y Francis Crick en 1953 (Lisker & Zentella, 2013).

- **ADN mitocondrial**

Las mitocondrias poseen su propio material genético y la maquinaria para fabricar sus propios RNA y proteínas (Iwasa & Marshall, 2018).

El DNA mitocondrial es un pequeño DNA circular que se encuentra en las mitocondrias y que es responsable de las proteínas únicas de la mitocondria. Las mutaciones que tengan lugar en este DNA pasan de la madre a su descendencia, ya que el óvulo es la fuente primordial de mitocondrias (Thieman, 2010).

Este ácido nucleico se encuentra en el interior de la matriz mitocondrial y al igual que el DNA genómico, contiene genes dispuestos a lo largo del DNA mitocondrial (DNAm_t), que son esenciales para el funcionamiento de la mitocondria y por tanto de las células. Una diferencia fundamental con los cromosomas nucleares es que el DNAm_t no es lineal, sino que forma un círculo de DNA de doble hélice con 16,596 pb. En su forma y estructura, el DNAm_t es reminiscente al DNA bacteriano, además de compartir un código genético que tiene pequeñas diferencias con respecto al de eucariontes (Lisker & Zentella, 2013). Como está representado en la figura 21.

Este ADN no cromosómico es importante porque codifica una pequeña cantidad de polipéptidos mitocondriales (13 en humanos) que están estrechamente integrados en el interior de la membrana mitocondrial junto con polipéptidos codificados por genes que residen dentro del núcleo. El ADN mitocondrial humano también codifica a 2 RNA ribosomales y a 22 tRNA que se utilizan en la síntesis de proteínas dentro del organelo. El ADN mitocondrial (mtDNA, mitochondrial DNA) es una reliquia de la historia antigua. Se cree que es el legado de una bacteria aeróbica simple que tomó residencia en el citoplasma de una célula primitiva que finalmente se convirtió en la antepasada de todas las células eucariotas. La mayoría de los genes de este antiguo simbiote se perdieron o se transfirieron en el transcurso de la evolución al núcleo de la célula huésped, dejando solo un puñado de genes para codificar

algunas de las proteínas más hidrofóbicas de la membrana mitocondrial interna (Iwasa & Marshall, 2018).

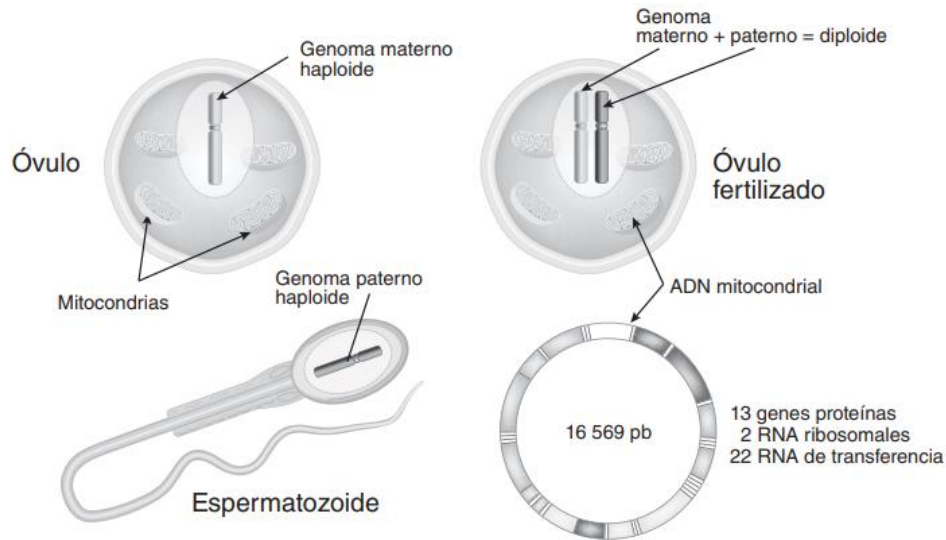


Figura 21. El DNA mitocondrial en ovocitos, espermatozoides y cigoto (Lisker & Zentella, 2013).

El ADN mitocondrial, por otra parte, es un excelente material para el análisis de muestras forenses por varias razones: 1) hay más de 5.000 copias por célula, lo que constituye en sí mismo una amplificación; 2) no se suele encontrar degradado al estar protegido por la mitocondria, y 3) algunas secuencias, dentro de la región del lazo-D no codificante (implicadas en la inacción de la replicación), son muy hipervariables (Kamal & Sagadevan, 2021).

1.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en una replicación exponencial in vitro de una molécula de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc), mediante ciclos repetitivos, que constan de tres temperaturas. En cada uno de los ciclos las moléculas se duplican hasta que los reactivos se agotan. La longitud del producto amplificado la delimitan los iniciadores, también llamados primers u oligonucleótidos, de cuyo diseño adecuado depende el éxito de la PCR. Los iniciadores deben ser específicos, no formar estructuras secundarias entre ellos ni hibridaciones inespecíficas entre ellos u otra parte de la cadena (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.1. Características de la amplificación in vitro y requerimientos necesarios para la PCR

La amplificación in vitro de la PCR se apega a las mismas reglas de la replicación; esto es, se basa en una secuencia que le sirve de molde y, por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. También, la síntesis de la cadena sigue la dirección 5'-3', ya que requiere de un nucleótido con el extremo 3' libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, con lo que se forma el enlace

fosfodiéster. Para que se lleve a cabo la PCR se requiere una cadena de ADNg o ADNc que sirva de molde, una enzima ADN polimerasa, cofactores necesarios para la actividad correcta de la ADN polimerasa, desoxinucleótidos (dNTP) para la síntesis del producto de PCR y oligonucleótidos o primers. La función de cada uno de estos elementos en la reacción se describe a continuación, la amplificación in vitro de la PCR se apega a las mismas reglas de la replicación; esto es, se basa en una secuencia que le sirve de molde y, por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. También, la síntesis de la cadena sigue la dirección 5'-3', ya que requiere de un nucleótido con el extremo 3' libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, con lo que se forma el enlace fosfodiéster (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.1.1. ADN polimerasa

En la actualidad, la Taq ADN polimerasa es la enzima más empleada para la PCR; tiene como función polimerizar una nueva cadena de ADN tomando como molde otra ya existente. Debido a que en cada ciclo de la PCR se lleva la mezcla de reacción a temperaturas de 95°C, se requiere de una ADN polimerasa capaz de soportar dichas temperaturas. Anteriormente, esta necesidad se suplía con la adición de *E. coli* en cada ciclo de la ADN polimerasa, que se inactivaba con la temperatura de 95°C, por lo que debía suplementarse de nuevo después de cada paso de desnaturalización (95°C). Sin embargo, el descubrimiento de bacterias habitantes de los géiseres, que viven a temperaturas alrededor del punto de ebullición del agua, permitió el aislamiento de la Taq polimerasa de la bacteria *Thermophilus aquaticus*. Con ello, la técnica pudo hacerse más eficiente, pues dicha enzima soporta los 95°C, y la cantidad inicial de enzima añadida a la reacción es suficiente como para suplementar los 25 a 40 ciclos de amplificación. La concentración de Taq polimerasa que se recomienda es de 1 a 2.5 U/reacción de PCR, y su tasa de error en la incorporación de bases es de 4×10^{-4} . Esta enzima es capaz de polimerizar un promedio de 1000 nt/minuto (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.1.2. ADN molde

Para la PCR teóricamente se requiere de una sola molécula, cuya secuencia sirva de molde para la amplificación, ya sea de ADN o de ADNg. El ADN se puede obtener de cualquier muestra biológica, y la mayoría de las técnicas de extracción de ácidos nucleicos proveen de moléculas de calidad adecuada para realizar la PCR. Si se quiere amplificar ARN, antes de la PCR se requiere realizar una reacción previa: la retrotranscripción, que permite convertir el ARN en ADNc, menos lábil que una cadena de ARN (cabe recordar que la inestabilidad molecular del ARN es elevada por la presencia del grupo OH en el carbono 2' de la ribosa). El ADNc puede manejarse, entonces, con mayor facilidad. Las técnicas actuales empleadas en la PCR permiten realizar la amplificación a partir de 300 ng de ADN genómico, o bien desde 25 a 100 ng en el caso de ADNc o ADN proveniente de genes clonados en

vectores. Es importante aclarar que en el caso de la amplificación de ADNc obtenido por retrotranscripción a partir de ARN, durante los primeros ciclos de la PCR se realiza la síntesis de la cadena complementaria del ADNc, lo que permitirá la amplificación de la secuencia como ADN de doble cadena (ADNs) en los ciclos posteriores de la PCR (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.1.3. Desoxinucleótidos

Para que la polimerasa lleve a cabo su función necesita que existan desoxinucleótidos (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de reacción para poder sintetizar la nueva hebra del ADN. Los desoxinucleótidos libres, cuando no forman cadenas de ácidos nucleicos, se encuentran en su forma trifosfatada, estructura molecular necesaria para su estabilidad y para proporcionar el grupo fosfato con el que se formará el enlace fosfodiéster en la unión nucleótido nucleótido. Los desoxinucleótidos trifosfatados deben adicionarse en una concentración óptima de entre 50 y 200 μM , cantidad suficiente para sintetizar de 6.5 a 25 μg de ADN. Cantidades mayores de 200 μM pueden producir incorporaciones erróneas, mientras que concentraciones menores de 50 μM se consideran insuficientes para una síntesis adecuada (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.1.4. Amortiguador

La solución amortiguadora proporciona el pH y concentraciones de sales adecuadas para la correcta función de la ADN polimerasa. Este buffer maneja un pH de 8.4 y está compuesto por Tris-HCl y KCl (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.1.5. Cloruro de magnesio

El magnesio actúa como cofactor de la ADN polimerasa y se suplementa a una concentración de entre 1.0 y 2.5 mM. Esta concentración debe optimizarse de manera experimental para cada PCR, ya que un exceso de magnesio produce una amplificación inespecífica de productos de PCR, mientras que una baja concentración disminuye la producción del amplificado (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.1.6. Iniciadores

El diseño adecuado de los iniciadores es la clave del éxito de una PCR. Estos oligonucleótidos, con secuencia específica, se utilizan para reconocer por complementariedad secuencias blanco en el ADN molde. En la PCR convencional, se usa un par de iniciadores para delimitar los extremos del producto que se desea amplificar. Su función radica en proporcionar un extremo 3' libre al que se han de añadir los nucleótidos consecutivos mediante enlace fosfodiéster, ya que la ADN polimerasa requiere iniciar la síntesis partiendo de un 3'OH preexistente. A partir de ellos, la ADN polimerasa inicia la polimerización en dirección 5'-3'. Los iniciadores reciben el nombre de sentido y antisentido, según la secuencia a la que dan origen.

El iniciador sentido es complementario y antiparalelo a la cadena 3'-5' del ADN molde, por lo que la polimerasa, al adicionar nucleótidos en él, origina una cadena con sentido (5'-3'). En cambio, el PRIMER antisentido es complementario y antiparalelo a la cadena 5'-3', por lo que su polimerización originará la cadena 3'-5'.

En la PCR la concentración óptima de los iniciadores es de 0.3 a 1 μM /reacción, ya que un exceso favorecería la formación de dímeros entre dos primers parcialmente complementarios, o bien de estructuras secundarias por complementariedad parcial de un primer con el mismo (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.1.7. Diseño de iniciadores y su papel en la especificidad de la PCR

Los iniciadores definen el tamaño del fragmento que se ha de amplificar. El tamaño de los productos a amplificar se encuentra entre 100 y 1000 pb, aunque se recomienda que sea entre 200 y 500 pb. En caso de que se desee analizar la expresión de un ARN mensajero (ARNm) convertido a ADNc, los primers se diseñan de tal forma que uno de éstos hibride en una secuencia exónica y el otro oligonucleótido lo haga en otra secuencia exónica; de esta manera, la amplificación del producto del tamaño esperado asegura que sólo los ARNm se han amplificado. En caso de que se haya amplificado también una secuencia de ADNg, (proveniente de contaminación de la muestra de ARN con ADN durante el proceso de extracción), el producto será de un tamaño diferente, ya que tiene secuencias intrónicas de por medio. La secuencia de los iniciadores debe ser altamente específica para el gen de interés, y procurar un contenido de nucleótidos G-C de 40 a 60% y una longitud óptima entre los 18 y los 30 nt. También debe evitarse un diseño que permita la complementariedad o la formación de estructuras secundarias inter e intra-primers, sobre todo cuando estas estructuras secuestran el extremo 3', indispensable para la adición de nucleótidos como se ejemplificó en la figura 16-3. La secuencia y la longitud de los iniciadores es determinante para su temperatura de fusión (T_m), la cual se define como aquella a la que el 50% de los iniciadores se encuentra en estructura de cadena lineal (Salazar Montes, 2013).

Se procura un diseño tal que la T_m de ambos primers sea muy similar y no presente más de 5°C de diferencia con la T_m del producto que se va a amplificar, lo cual garantiza temperaturas de alineamiento similares para ambos primers y una eficiencia de amplificación adecuada. La T_m aumenta según la longitud del iniciador, por lo que un iniciador por debajo de las 18 nt hibridaría de forma inespecífica en la cadena molde y originaría productos inespecíficos. Por otro lado, iniciadores muy largos requieren de T_m superiores a 65°C; por esto, la longitud óptima está entre los 20 y 30 nucleótidos para que se obtenga una T_m entre 55 y 65°C, compatible con la amplificación de la generalidad de los fragmentos.

Existen muchos métodos para calcular la T_m de los iniciadores, pero todos toman en consideración el contenido de nucleótidos, sobre todo G y C, la longitud del

primer y la concentración de Na⁺ en el tubo de la PCR. En la actualidad, muchos programas computacionales permiten el diseño semiautomatizado de los primers, tomando en cuenta los parámetros mencionados. Algunos de los programas utilizados son Oligo 6.0, Primer Express®, Primer Desing®, etc. Una vez diseñados, los oligonucleótidos deben verificarse contra alineaciones inespecíficas en la misma secuencia blanco o bien en otras secuencias, empleando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este software coteja una posible hibridación, total o parcial, con alguna secuencia reportada en el Gene Bank que pudiera interferir con la especificidad de los primers y su empleo correcto. En caso de hibridación con otras secuencias (ARNm o génicas) reportadas en el banco de genes su diseño debe replantearse (Salazar Montes, 2013).

1.7.2.2. Etapas de la PCR

Un ciclo de amplificación consta de tres etapas: separación de las hebras de ADN (desnaturalización), unión de los iniciadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento) y la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión) (Cornejo & Serrato, 2014).

- **Desnaturalización:** En esta etapa es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94 °C durante 30 segundos a 1 minuto. Si el ADN tiene un alto contenido de guaninas y citosinas, se recomienda aumentar el tiempo o la temperatura. La actividad de la enzima decrece muy rápido a partir de los 95 °C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación (Cornejo & Serrato, 2014).
- **Alineamiento:** Al disminuir la temperatura de incubación los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. Ambos iniciadores se unen de manera específica al ADN flanqueando el fragmento que se quiere amplificar. En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los iniciadores: la concentración, el número de bases y el porcentaje de guaninas-citosinas. En la práctica, la temperatura de alineamiento oscila entre 45 y 65 °C durante un tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad porque disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde (Cornejo & Serrato, 2014).
- **Extensión:** Esta etapa, también conocida como elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del iniciador por acción de la ADN polimerasa, empleando como sustrato los cuatro dNTPs. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72 °C porque es la temperatura a la cual la Taq polimerasa (enzima más utilizada) alcanza su mayor actividad. El tiempo de

extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar, la Taq polimerasa añade de 500 a 1000 nucleótidos por minuto (Cornejo & Serrato, 2014).

Estas tres fases se repiten entre 20 y 35 ciclos normalmente, para lograr la amplificación exponencial del fragmento diana de ADN. Antes del primer ciclo se realiza una desnaturalización (hot start) de aproximadamente tres minutos de duración, para reducir la unión de los cebadores a sitios inespecíficos y la formación de dímeros del cebador. Adicionalmente, al terminar los ciclos se usa un paso de extensión final para asegurar que las nuevas cadenas queden completamente sintetizadas (Grupo de Investigación Ciencias Forenses y Salud, 2018).

- **Desnaturalización inicial:** Habitualmente la PCR utiliza un ciclo de desnaturalización (separación de la doble hélice porque los puentes de hidrógeno se rompen), la temperatura y el tiempo se determinan de acuerdo a las características del ADN y de la ADN polimerasa utilizada, por lo general es entre 94 y 96 °C durante 5-10 minutos (Cornejo & Serrato, 2014).
- **Extensión final:** Generalmente, al terminar los ciclos, se realiza una última extensión de aproximadamente 5 minutos a 72 °C para permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos (Cornejo & Serrato, 2014).

En la figura 22. Podemos apreciar el mecanismo de acción de la ADN polimerasa durante la PCR, en conjunto de las diferentes etapas.

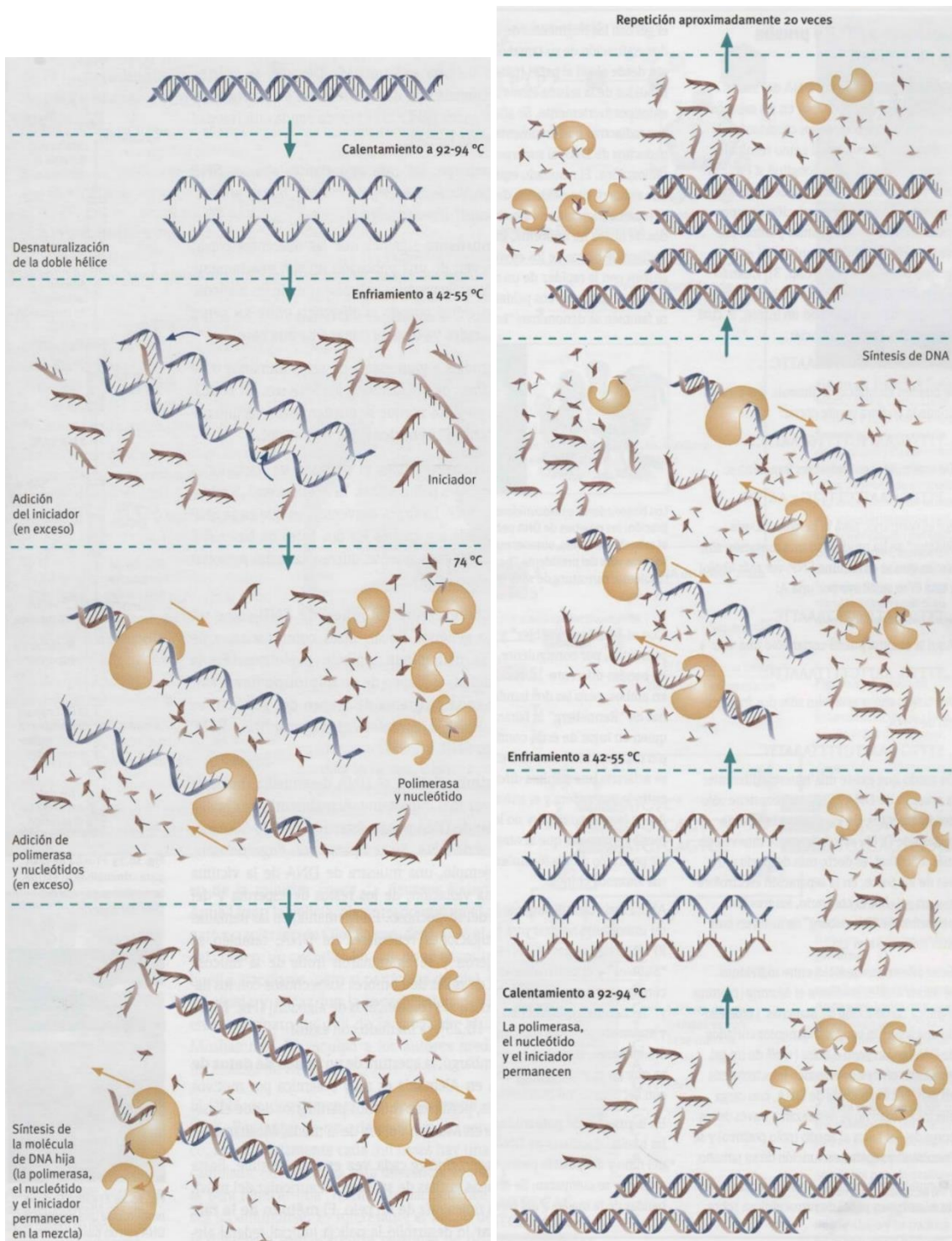


Figura 22. ADN Polimerasa en acción durante la PCR (Renneberg, 2008)

1.7.2.3. Variantes de la técnica de PCR

Esta técnica ha evolucionado desde su invención. En la actualidad, gracias a los múltiples sistemas de detección, a variantes en los iniciadores y a la cantidad de

pares de primers empleada se dispone de diversas variantes de la técnica, que se enlistan a continuación:

1.7.2.3.1. PCR punto final

Se basa en la detección del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. El producto amplificado se visualiza mediante una banda (Electroforesis). La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular comercial de longitudes conocidas. El análisis de imagen de la banda del producto de PCR permite medir su intensidad mediante software y realizar una medición semicuantitativa de las bandas de los productos de PCR obtenidos en diversas muestras (Salazar Montes, 2013).

1.7.3. Electroforesis

El movimiento de las moléculas de proteína eléctricamente cargadas en un campo eléctrico se denomina electroforesis. Es un método importante para separar proteínas y otras moléculas como ADN y RNA. Las separaciones electroforéticas casi siempre se realizan en geles (o en soportes sólidos como papel). En la electroforesis, las moléculas que son más pequeñas que el poro del gel migran más rápido que las moléculas más grandes que el poro, y las moléculas de tamaño intermedio migran a través del gel con diverso grado de movilidad (Beas, Ortuño, & Armendáriz, 2009).

Electroforesis en gel de agarosa. La creación de la electroforesis como un método de separación de ADN bicatenario de cadenas simples se remonta al año 1962, elaborado por Matsubara y Takagi, donde se utilizaba al almidón como gel de corrimiento. La necesidad de analizar moléculas de ADN de longitudes variables propició el estudio de otros compuestos que pudieran utilizarse como gel de corrimiento en las pruebas de electroforesis, surgiendo la agarosa en 1969 como un candidato adecuado debido a las características que posee. La agarosa es un polisacárido obtenido del aislado de agar de algas rojas marinas, el cual está constituido por unidades repetidas de agarobiosa, sustituida de manera extensa en grupo ester de sulfato, ácido pirúvico cetálico y ésteres metílicos. Dicho polímero es de interés en el análisis del ADN debido a las características que posee al ser gelificado, consiste en una bobina aleatoria estructurada por una doble hélice en etapas iniciales de la gelificación y a medida que avanza la gelificación se forman las dobles hélices finales. La configuración mencionada forma una red fibrosa que puede ser utilizada como filtro para la clasificación de diferentes moléculas, donde la concentración de agarosa es inversamente proporcional al tamaño del poro. Ha sido reportado un límite de tamaño máximo de fragmentos de ADN que pueden ser analizados con gel de agarosa, siendo entre 100 a 2000 pb a una concentración de 2-3% del polisacárido (Montalvo & Lugo, 2019). Por otro lado la longitud mínima del

fragmento se establece a valores superiores a 50 kb, donde la concentración recomendada es de 0.25% de agarosa (Upcroft & Upcroft, 1993)

Principio: El principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz porosa, según su peso molecular o tamaño; movimiento generado por el campo eléctrico (Salazar Montes, 2013)

Cap. 2 Metodología experimental

2.1. Justificación

La gelatina es un ingrediente y complemento alimenticio importante, que se utiliza en una variedad de alimentos y productos farmacéuticos en cápsulas (duras y blandas), así como cosméticos (Sudjadi, 2016). Químicamente, la gelatina es una mezcla de polipéptidos compuesto por hidrólisis parcial de colágeno de las pieles y cueros de especies bovina y porcina (Karim & Bhat, 2018). Sin embargo, dado que se han registrado brotes de infecciones como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) en la década de 1980, se han impuesto restricciones al uso de subproductos bovinos para gelatina en Europa (Legislation, 2001) lo que significa aproximadamente el 90% de las materias primas para la gelatina comestible son de origen porcino (Sudjadi, 2016). La gelatina porcina es menos costosa y de mejor calidad que la gelatina bovina (la gelatina bovina requiere de 60 a 80 en contraste a 30 días para su producción de la gelatina porcina) (Karim & Bhat, 2018). Otro brote que es causa desconfianza en el consumidor de subproductos de origen aviar son las infecciones en seres humanos por el nuevo virus de la influenza aviar, como el virus H5N1 de origen asiático, debido al potencial pandémico que este tiene (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Vacunación y Enfermedades Respiratorias (NCIRD), 2018). Debido a esto las gelatinas de ave también suelen causar desconfianza en el consumidor. Por lo tanto, las gelatinas de pescado se han vuelto atractivas para una variedad de aplicaciones, por ser opciones más saludables.

Y Aunque la gelatina es un ingrediente comúnmente utilizado en muchas aplicaciones, la principal preocupación proviene de algunos grupos de consumidores asociados con prácticas y creencias religiosas. Los materiales originales y el proceso utilizado para la gelatina deben estar aprobados o certificados. Por ejemplo, la gelatina halal y sus productos deben etiquetarse en el paquete (Shabani, 2015). Además, algunos consumidores son alérgicos a los alimentos que contienen gelatina de mamíferos y pescado (Kuehn, 2009). Por lo tanto, es necesario determinar la adulteración de la gelatina prohibida en el producto (Benjakul, 2019).

Pero en la actualidad, hay muchas restricciones a productos de esta índole, por cuestiones de ideología, creencias religiosas hasta por salud, tal es el caso de los

hindúes, su religión prohíbe comer productos de origen bovino, pero pueden consumir de ganado porcino y caso contrario para productos halal o kosher donde los productos no pueden ser de ganado porcino (Sultana, 2020).

Sin embargo, los productos con este tipo de gelatinas aún son escasos lo que provoca que tengan mayor costo para el consumidor, y esto a su vez pueda ser objeto de fraude alimentario. Este estudio se enfoca a determinar el ADN de la materia prima con la que están elaboradas algunas gelatinas comercializadas en México, como por ejemplo ADN de ganado porcino (*Sus scrofa domesticus*), ganado bovino (*Bos taurus*), pescado (*Oreochromis niloticus*) y pollo (*Gallus gallus domesticus*) mediante técnicas de biología molecular como PCR para identificar las especies constituyentes del producto.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Evaluar la posible presencia de ADN de *Sus scrofa domesticus*, *Bos taurus*, *Oreochromis niloticus* y *Gallus gallus domesticus* en la gredetina usada en gelatinas comerciales, mediante pruebas de PCR (Reacción en cadena de polimerasa), para autenticar la especie de origen y tener confianza en la calidad del producto.

2.2.2. Objetivo particular 1

Diseñar primers de *Sus scrofa domesticus*, *Bos taurus*, *Oreochromis niloticus* y *Gallus gallus domesticus*, mediante el programa bioinformático Primer quest Tool y consulta de trabajos previos, para su uso en la técnica de PCR.

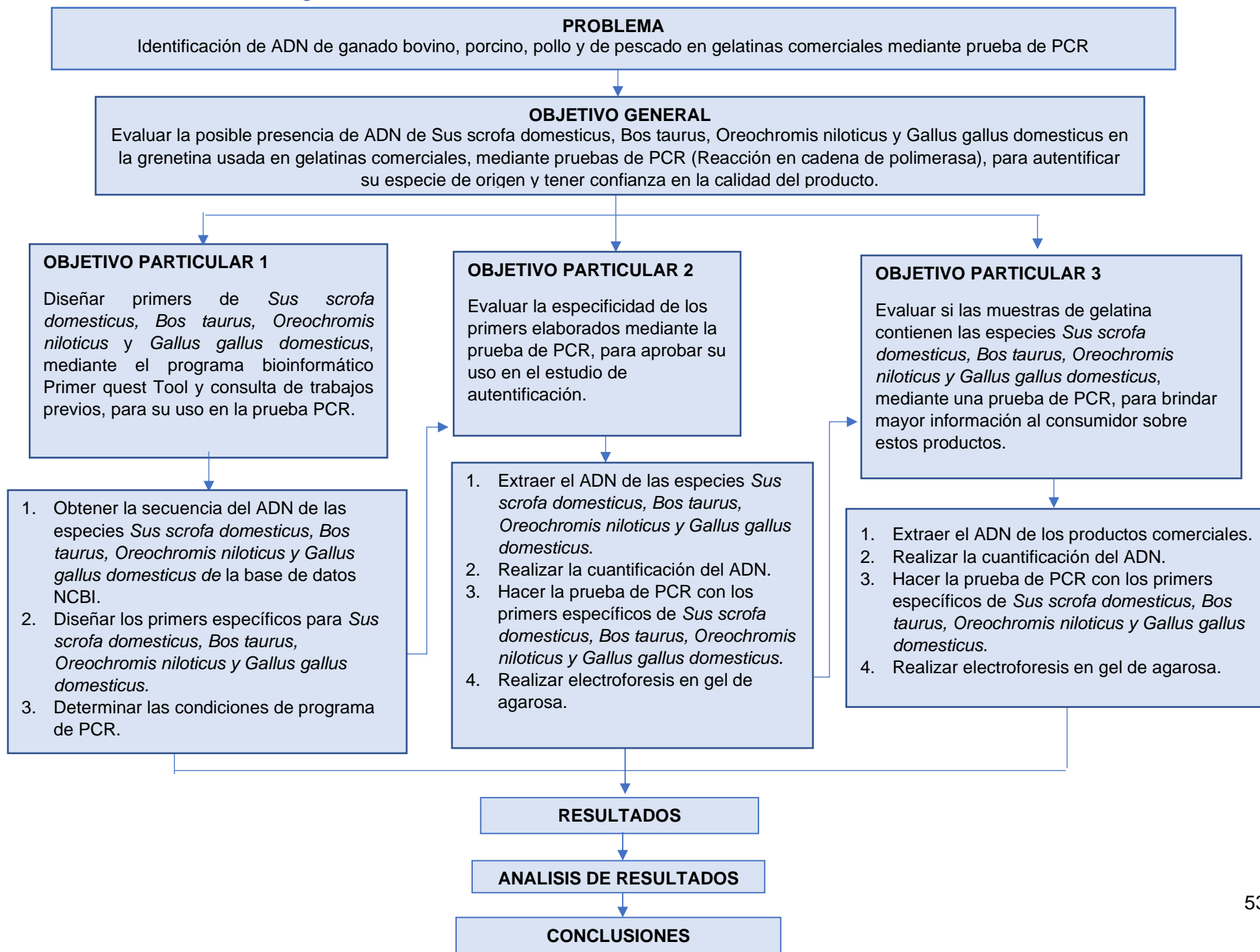
2.2.3. Objetivo particular 2

Evaluar la especificidad de los primers elaborados mediante la técnica de PCR, para implementar su uso en el estudio de autenticación.

2.2.4. Objetivo particular 3

Evaluar si las muestras de gelatina contienen las especies *Sus scrofa domesticus*, *Bos taurus*, *Oreochromis niloticus* y *Gallus gallus domesticus*, mediante la técnica de PCR, para identificar las especies constituyentes del producto.

2.3. Cuadro metodológico



2.4. Material Biológico

En el siguiente cuadro se pueden apreciar el número de muestras totales utilizadas durante la experimentación, al igual que su nombre, así como también algunas características importantes y su procedencia y en la figura 22, se puede apreciar con más detalle el material utilizado.

Cuadro 7. Material Biológico y sus características

| Numero de muestras totales | Nombre de la muestra | Código | Características importantes: Declaración nutrimental por envase | Lote | Procedencia |
|----------------------------|----------------------|--------|--|-----------|----------------------|
| 1 | D'Gari | GG1 | Proteínas 1.7g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 8.7g, Fibra dietética 0g, sodio 12mg. Contenido energético por envase 465.9 kcal (1980.2 kJ). | L2443 | AURRERA |
| 2 | McCormick | GMK1 | Proteínas 2.3g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 1.4g, Fibra dietética 0g, sodio 10mg. Vitamina A, B1, B6, D, Hierro, Zinc, 5% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 14.8 cal (62.9 kJ). | LOT M9080 | Tienda de la esquina |
| 3 | Jello | GJo1 | Proteínas 1.6g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 0.2g, Fibra dietética 0g, sodio 53mg. Vitamina C, 6mg = 10% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 73.8 kcal (313.5 kJ). | 8 19:11 | AURRERA |
| 4 | Aurrera | GA1 | Proteínas 1.8g, Grasas 0.5g, Hidratos de carbono disponibles 8.4g, Fibra dietética 0.7g, sodio 7 mg. Contenido energético por envase 463.90 kcal (62.9 kJ). | LOT 257A | AURRERA |
| 5 | Pronto | GPO1 | Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 6g, Fibra dietética 0g, sodio 80mg. Vitamina C, 15% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 32 kcal (136 kJ). | LT: 21H31 | AURRERA |
| 6 | Best Choice | GB1 | Proteínas 1.45g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 13.02g, Fibra dietética 0g, sodio 4.85mg. Contenido energético por envase 578.80 kcal (2459.90 kJ). | LOT 263A | Tienda NETO |

| | | | | | |
|----|------------|------|---|----------|-----------------|
| 7 | Spinni | GSP1 | Proteínas 1.45g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 8.86g, Fibra dietética 0g, sodio 30mg. Contenido energético por envase 412.4 kcal (1752.7 kJ). | LOT 279A | Tienda 3B |
| 8 | Precisimo | GPR1 | Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 4mg. Contenido energético por envase 500 kcal (200 kJ). | LOT 2081 | Soriana |
| 9 | Máxima | GM1 | Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 4mg. Vitamina C, 10% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051-SCFI) Contenido energético por envase 480 kcal (2040 kJ). | LOT 2082 | Tienda Scorpion |
| 10 | D'Guna | GD1 | Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 65mg. Contiene Fenilalanina, Tartrazina, TBHQ y sulfitos, Contenido energético por envase 500 kcal (2040 kJ). | Sin Lote | Tienda |
| 11 | Frutevia | GFr1 | Proteínas 1.94g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 0.15g, Fibra dietética 0g, sodio 2mg. Contenido energético por envase 9 kcal (35 kJ). | L160T1 | Internet |
| 12 | R.A Corona | GCo1 | Proteínas 2g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas Trans 0g, Hidratos de Carbono Disponibles 15.62g, Azúcares 15.62g, Azúcares añadidos 15.62g, Fibra dietética 0g, Sodio 6mg. Contenido energético por envase 624 kcal (261 kJ). | 250 | Internet |
| 13 | Sayes | GSa1 | Proteínas 2g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas Trans 0 mg, Hidratos de Carbono disponibles 9g, Azúcares 7g, Azúcares añadidos 4.22g, Fibra dietética 0g, Sodio 10 mg. Contenido energético por envase 440 kcal (1870 kJ). | LC270522 | Internet |
| 14 | Chedraui | GCH1 | Proteínas 1.7g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas trans 0mg, Grasas monoinsaturadas 0g, Grasas poliinsaturadas 0g, Colesterol 0mg, Hidratos de carbono disponibles 9.5 g, Azúcares 9.5g, Azúcares añadidos 9.5g, Fibra dietética 0g, Sodio 17.8mg. Contenido energético por envase 492.8 kcal (2094.4 kJ). | LOT03 | Tienda Chedraui |

| | | | | | |
|----|------|-------|---|-----------------|---|
| 15 | Jati | GJa1 | Proteínas 1.85g, Grasas Totales 0g, Grasas Saturadas 0g, Grasas Trans 0mg, Hidratos de carbono disponibles 9.7g, Azúcares 9.7g, Azúcares añadidos 9.7g, Fibra dietética 0g, Sodio 10 mg. Contenido energético por bolsa de 140g 375 kcal (1595 kJ). | 1312D 200403 | Central de abastos del municipio de Ecatepec de Morelos, Mex. |
| 16 | Caty | GCay1 | Proteína 8.4g, Grasas Totales 0g, Grasas Saturadas 0g, Grasas Trans 0mg, Hidratos de carbono 87.8g, Azúcares 83.6g, Azúcares añadidos 83.6g, Fibra dietética 0.0 mg, Sodio 21mg, contenido energético por envase de 100g 385 kcal (1635 kJ). | Sin Lote | Central de abastos del municipio de Ecatepec de Morelos, Mex. |



Figura 23. Material biológico, gelatinas.

Cuadro 8. Material biológico, gretinas y sus características.

| Numero de muestras totales | Nombre de la muestra | Código | Características importantes: Declaración nutrimental por envase | Lote | Procedencia |
|----------------------------|----------------------------|--------|---|------------------|---------------|
| 1 | D´Gari | GRDG1 | GRENETINA | 10.21L278 | WALMART |
| 2 | GRENETINA DUCHE | GRD1 | GRENETINA | LOTE 709 | WALMART |
| 3 | K´nox | GRK1 | GRENETINA | 22A03 | WALMART |
| 4 | Grenetina de pescado DUCHE | GRPD1 | GRENETINA | 208 | MERCADO LIBRE |
| 5 | GELITA | GRGE1 | GRENETINA | GPS275C /20/3005 | MERCADO LIBRE |



Figura 24. Material biológico, gretinas

2.5. Reactivos, materiales y equipos para la extracción de ADN

- Solución de lisis.
- Enzima proteinasa K.
- Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
- Etanol frío.
- Agua desionizada.
- Tubos eppendorff.
- Puntas para micropipetas.
- Balanza analítica.
- Agitador Vortex.
- Microcentrífuga.
- Micropipetas.
- Termoblock.

2.6. Extracción de ADN y preparación de las muestras.

Para poder realizar la extracción de las muestras control se siguió el método de sambrook 2001, primero se molió la muestra con ayuda de un mortero, para lograr desintegrar el tejido o materia prima (Sambrook & Russell, 2001). Después mediante el uso de una balanza analítica se pesaron 0.125g de muestra en un tubo eppendorff. A continuación, con ayuda de una micropipeta, adecuada para la cantidad, se agregaron 1250 μL de solución de lisis. A la vez también se adiciono a la muestra 7 μL de enzima Proteinasa K. Una vez realizados estos pasos se incubaron los tubos a 50°C en un termoblock durante 2 horas. Después se procedió a elevar la temperatura del termoblock a 60 °C durante 1 hora, para desactivar la enzima. Posteriormente se añadieron 250 μL de la mezcla fenol-cloroformo- alcohol isoamílico. A continuación, con ayuda de una centrifugadora de la marca eppendorff se centrifugo a 10,000 rpm durante 10 minutos. Después de este paso se recuperó la fase acuosa superior que contiene el ADN y con ayuda de una micropipeta se añadió 1500 μL de etanol frio a la muestra. Unos minutos más tarde se centrifugo nuevamente el tubo eppendorff de la muestra a 10,000 rpm durante 10 minutos. Como penúltimo paso se decantó el etanol y se dejó secar el ADN en la incubadora a 37°C durante 1 hora. Es importante resaltar que el ADN se ubicará pegado en las paredes del tubo, algunas veces se pueden apreciar algunos a simple vista. Y finalmente en el último paso se adicionó 50 μL de agua desionizada y se colocó la muestra en el equipo vórtex para poder conjuntar el ADN (Sánchez Mendoza, 2021).

Para el caso de las muestras de gelatina, primero se molió la muestra con ayuda de un mortero, posteriormente mediante el uso de una balanza analítica se pesaron 0.150g de muestra en un tubo eppendorff, después con ayuda de una micropipeta, adecuada para la cantidad, se agregaron 1500 μL de solución de agua libre de nucleasas, y se sometieron a un proceso de calentamiento a temperatura constante de 40°C por un tiempo de 25 a 30 min hasta que la muestra se observó lo más líquida posible, a continuación se centrifugo tres veces, la primera vez se centrifugo a 12,000 rpm durante 5 min, la segunda vez a 14,000 rpm durante 5 min y la tercera vez a 14,000 rpm durante 5 min, posterior a esto se observaron detenidamente los

tubos debido a que el ADN se ubicará pegado en las paredes del tubo, algunas veces se pueden apreciar algunos a simple vista en forma de pellet, con mucho cuidado se retiró la fase acuosa de cada uno, a continuación se procedió a concentrar la muestra, agregando nuevamente 0.150g y de igual forma se añadieron 1500 μ L de agua libre de nucleasas y posteriormente se sometieron nuevamente a un proceso de calentamiento a temperatura constante de 40°C por un tiempo de 20 min posterior a eso se procedió a centrifugar nuevamente tres veces a las mismas condiciones de revoluciones y tiempo anteriormente mencionadas, después de esto con mucho cuidado se retiró la fase acuosa de cada uno, a continuación se agregaron 1500 μ L de agua libre de nucleasas y se sometieron nuevamente a un proceso de calentamiento a temperatura constante de 40°C por un tiempo de 5 min y por último se centrifugaron nuevamente tres veces, la primera vez se centrifugo a 12,000 rpm durante 5 min, la segunda vez a 14,000 rpm durante 5 min y la tercera vez a 14,000 rpm durante 5 min y después se retiró la fase acuosa con el debido cuidado de no extraer el pellet y se añadieron 30 μ L de agua libre de nucleasas.

2.7. Cuantificación de ADN

Como primer paso se colocaron las muestras en la gradilla y se realizó el encendido del equipo Nanodrop. Después se encendió la computadora y se abrió el programa "Nanodrop". A continuación, se eligió la opción de ácidos nucleicos. Mas tarde se procedió a colocar 2 μ L de agua libre de nucleasas para iniciar el equipo y eligió la opción "ok". Como paso siguiente se limpió el sensor y colocamos 2 μ L de agua libre de nucleasas en el sensor, la cual servirá como blanco, "blank". Posteriormente ya que el equipo ha dado los valores del blanco, se limpió el sensor. Luego se colocó 2 μ L de la muestra a cuantificar y selecciono la opción "measure". Como penúltimo paso se registraron los valores, en la bitácora, de: Relación 260/280, y ng/ μ L. Por último, se limpió el sensor y cuantifico la siguiente muestra (Sanchez Mendoza, 2011).

Los datos se podrán analizar con ayuda de la siguiente información:

Concentración (ng/ μ L)

Para el caso de la concentración debemos de saber que en la celda del espectrofotómetro un haz de luz atraviesa la solución de ácidos nucleicos y cuando ha pasado por la muestra, un fotodetector mide la intensidad de luz absorbida. Mientras más luz absorba la muestra (absorbancia) mayor será la concentración de ácidos nucleicos a ese valor se le denomina densidad óptica (OD) y esta tiene valores particulares para cada molécula específica en una determinada longitud de onda por unidad de distancia. En el caso de los ácidos nucleicos, una OD de 1 a 260 nm equivale a una concentración de 50 μ g/ml (50 ng/ μ L) de ADNds. Las proteínas (en particular los aminoácidos aromáticos) absorben luz a una longitud de onda de 280 nm (Salazar Montes, 2013).

Relación 260/280

Para poder aprobar nuestras muestras por lo común el índice de absorción 260÷280 nm se utiliza para valorar la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a la contaminación con proteínas. Cuando éste se encuentra entre 1.8 y 2.0, se considera óptimo, ya que valores cercanos a 1.8 indican que la muestra contiene casi exclusivamente ADN (Salazar Montes, 2013). Pero también se puede considerar un límite de 1.6 donde un valor menor a este indica presencia de proteínas contaminantes o trazas de fenol (Aguilera Segura, 2016). Un índice mayor que valores de 2.0 indica una rotura de las cadenas de los ácidos nucleicos, y se considera que es un ácido nucleico de calidad insuficiente, por lo que en este caso también se recomienda una nueva extracción (Salazar Montes, 2013).

2.8. PCR

La técnica de PCR para las muestras control se llevó a cabo con la ayuda de un kit para PCR que contenía los siguientes componentes:

Cuadro 9. Cantidad correspondiente a cada componente para PCR

| Componente | Cantidad para preparar una muestra |
|--------------------------------|---|
| Master Mix | 12.5 µL |
| Primer Frontal | 0.5 µL |
| Primer Reverso | 0.5 µL |
| Agua libre de nucleasas | 10.5 µL |
| ADN | 2 µL |

El kit master mix a su vez está compuesto de Taq ADN polimerasa, dNTP y MgCl₂.

Primero se colocó la cantidad de 12.5 µL de la mezcla de kit master mix, después se agregaron 0.5 µL de primer frontal, 0.5 µL de primer reverso y posteriormente a la mezcla se le añadieron 10.5 µL de agua libre de nucleasas, en los tubos previamente etiquetados, el primero con el nombre de blanco, este tubo contendrá la mezcla, pero sin ADN de ningún tipo esto nos permitirá llevar un mejor control para evitar contaminaciones en nuestra reacción. los siguientes con sus respectivos nombres, siempre con letra legible, todo esto con ayuda de una micropipeta, el volumen final fue de 24 µL. Por último, se le añadieron 2 µL de ADN de la muestra a sus respectivos tubos. A continuación, se colocaron los tubos en la microcentrífuga por un tiempo de 5 segundos para poder eliminar las burbujas que se hayan producido en las muestras a la hora del micropipeteo. Por último, se ubicaron los tubos en el termociclador marca Apollo modelo ATC401 CLP en el cual se programaron los ciclos y diferentes condiciones para llevar a cabo la PCR, al concluir la prueba de las muestras se conservaron en el congelador para su posterior uso en electroforesis (Sanchez Mendoza, 2011)

Para el caso de las muestras de gelatina y grenetina respectivamente la técnica de PCR se realizó con la ayuda de un kit para PCR DIRECTA que contenía los siguientes componentes:

Cuadro 10. Cantidad correspondiente a cada componente para PCR directa

| Componente | Cantidad para preparar una muestra |
|--------------------------------|---|
| Buffer 2x Phire | 5 μ L |
| Enzima Polimerasa | 0.2 μ L |
| Primer Frontal | 0.25 μ L |
| Primer Reverso | 0.25 μ L |
| Agua libre de nucleasas | 3.3 μ L |
| ADN | 1 μ L |

2.9. Electroforesis en muestras

Para llevar a cabo la electroforesis primero se pesaron 1.5 g de agarosa los cuales se disolvieron en 50mL de TAE 1X. A continuación, se calentó la disolución en el horno de microondas especial para el laboratorio, aproximadamente 1 min con espacios de 20seg posteriormente se añadió una gota de BRET y se mezcló. Posteriormente se cerraron las aperturas laterales del soporte del gel, donde se vertió la mezcla, cuidando que no se formaran burbujas, al mismo tiempo se colocó el peine el cual formo los pocillos donde se habría de colocar la muestra. Después de esto esperamos a que la solución gelificara, una vez concluido esto se retiraron los peines y se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis donde se agregó el TAE 1X a la cámara de modo que el gel quedara cubierto.

Una vez realizado lo anterior se colocó un trozo de Parafilm donde se colocaron 3 μ L de BRET, 3 μ L de colorante blue/orange y 4 μ L de la muestra resultante de la PCR y 1 μ L de marcador de peso molecular, esto depende de la corrida respectivamente. A continuación, se activó el campo eléctrico a 60V donde la corrida duro hasta que el colorante se visualizó cerca del extremo opuesto (Sanchez Mendoza, 2011).

2.9.1. Visualización de ADN

Para poder visualizar el ADN se colocó el gel dentro del transiluminador de luz UV de la marca Cleaver Scientific LTD, la captura de las imágenes visualizadas se logró utilizando una cámara fotográfica para luz UV de marca Kodak digital Science, centrado y encendió el transiluminador al mismo tiempo que la cámara y se fotografió el gel (Sanchez Mendoza, 2011).

Cap.3 Resultados y discusión

3.1. Resultados del objetivo 1.

Se obtuvieron los primers de la especie *Sus scrofa domesticus* del trabajo realizado con anterioridad por Julio Cesar Ponce Hernández, en su tesis nombrada “Detección de especies animales no reportadas en la etiqueta de salchichas comerciales por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa” (Cesar, 2017).

Para el caso de los primers de la especie *Gallus gallus domesticus* y *Bos taurus* se obtuvieron del trabajo realizado con anterioridad por Aarón Roblero Domínguez, en su tesis que lleva por nombre “Determinación de aculturación con especies *Gallus gallus domesticus*, *Sus scrofa domesticus* y *Bos taurus* en embutidos de pavo mediante PCR (Roblero Domínguez, 2019).

Para el caso de la especie *Oreochromis niloticus* se realizó el diseño del primer con ayuda del programa bioinformático PrimerQuest Tool, copiando las secuencias de mtADN completo y siguiendo las consideraciones presentadas a continuación. Un ejemplo de este procedimiento se puede encontrar en la sección de anexos

1. Deben ser específicos para la región de estudio.
2. La longitud del primer debe ser de entre 18 y 25 pb.
3. Ambos primers deberán ser de la misma longitud o no rebasar una diferencia de 3 nucleótidos.
4. La temperatura de hibridación o melting temperatura (T_m) debe oscilar entre los 55°C y 62°C.
5. La T_m entre la pareja de primers no debe diferir en más de 2°C.
6. Composición entre 40% y 60% de G/C (Ideal 50%).
7. Evitar regiones CCCC o GGGG.
8. Preferentemente deben tener un residuo terminal G o C en el extremo 3´.

Programa de PCR.

En las siguientes figuras podemos apreciar que el inicio de la prueba PCR tuvo lugar a los 94°C, con ayuda de un termociclador es fácil lograr la temperatura adecuada, esta temperatura se mantuvo constante durante 5 min, donde solo se realizó un ciclo para poder conseguir la desnaturalización inicial del ADN, pasados esos 5 min, siguió con la desnaturalización repetitiva durante 5s, a 94°C, después se redujo la temperatura hasta 59.95°C, 48.1°C, 62°C y 57.65°C, para *Bos taurus*, *Sus scrofa domesticus*, *Oreochromis niloticus* y *Gallus gallus domesticus* respectivamente. Ahí es donde el primer se unió a una cadena base, esa temperatura es fundamental durante el proceso, posteriormente, ya transcurridos esos 5 s, la temperatura se volvió a elevar hasta 72°C a esta temperatura la enzima realizó su función y empezó la etapa de la extensión o elongación, este proceso de 3 temperaturas se repitió durante 40 ciclos, por último ya transcurridos esos 40 ciclos, empezó la etapa de la elongación final, a 72 °C durante 1 minuto por un ciclo, después de realizar este proceso obtuvimos nuestro ADN y se almacena a 4°C durante periodo de tiempo prolongado.

Bos taurus

Cuadro 11. Primer de *Bos taurus* empleado en la identificación de origen de grenetina.

| Primer | secuencia | No. De bases | Temperatura °C | Tamaño del amplificado | Número Genbanck |
|---------|------------------------|--------------|----------------|------------------------|-----------------|
| Frontal | CGCCGGACTCTATTTCTATTTC | 22 | 61°C | 461 pb | OK135155.1 |
| Reverso | TAACGAGTGCTATGTGGCTTAC | 22 | 59°C | | |

Programa de PCR

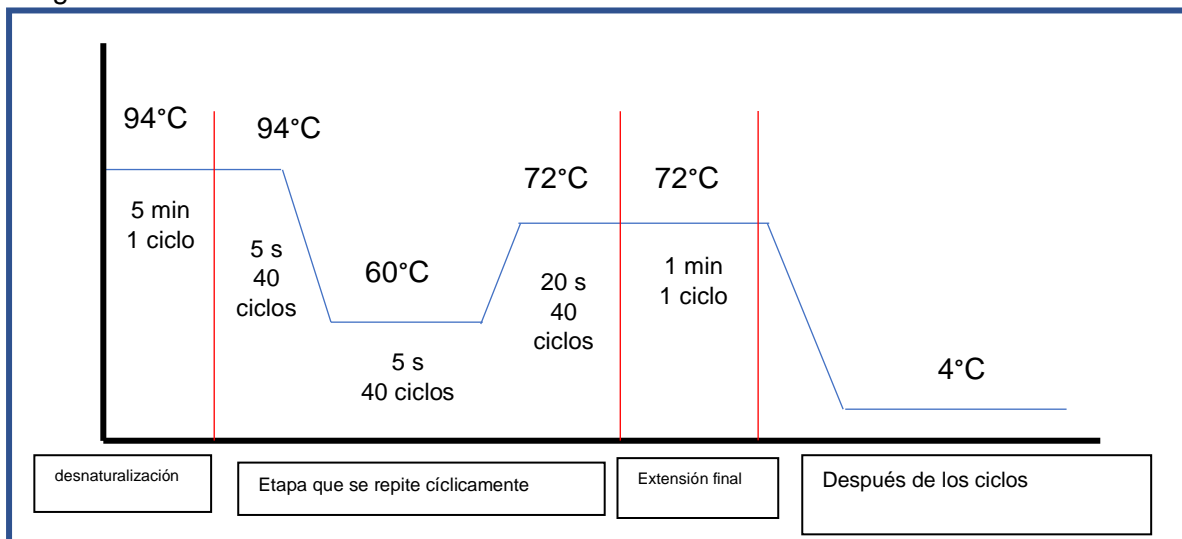


Figura 25. Programa PCR de *Bos taurus* para muestra control.

Programa de PCR directa

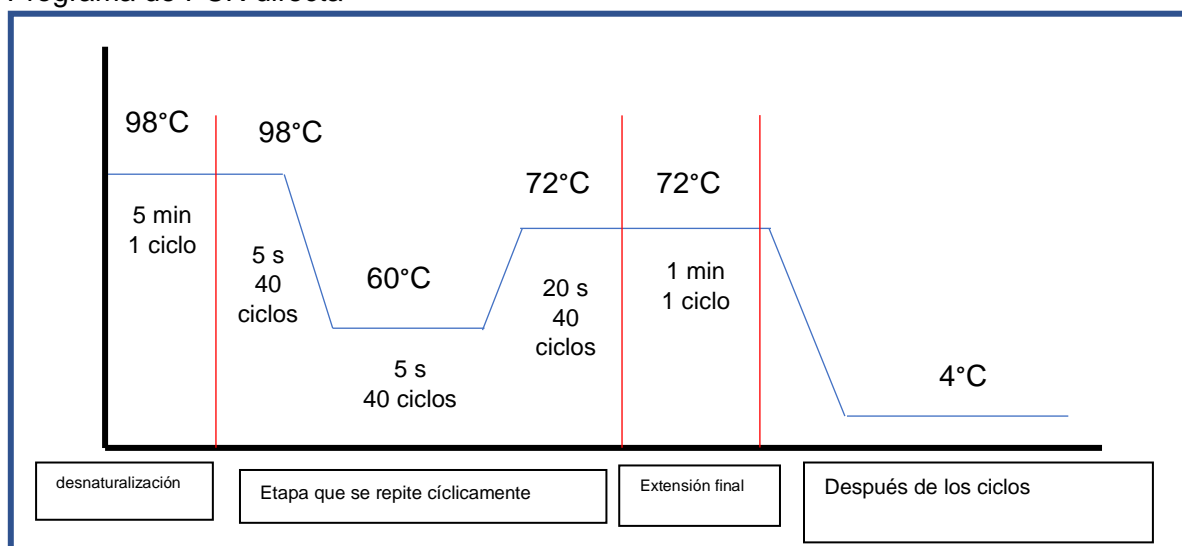


Figura 26. Programa PCR directa de *Bos taurus*

Sus scrofa domesticus

Cuadro 12. Primer de *Sus scrofa domesticus* empleado en la identificación de origen de grenetina.

| Primer | secuencia | No. De bases | Temperatura °C | Tamaño del amplificado | Número Gen Bank |
|---------|---------------------|--------------|----------------|------------------------|-----------------|
| Frontal | GCCTAAATCTCCCCTCAA | 18 | 52 °C | 210pb | OK329967.1 |
| Reverso | GAAAGAGGCAAATAGATTT | 19 | 52°C | | |

Programa de PCR

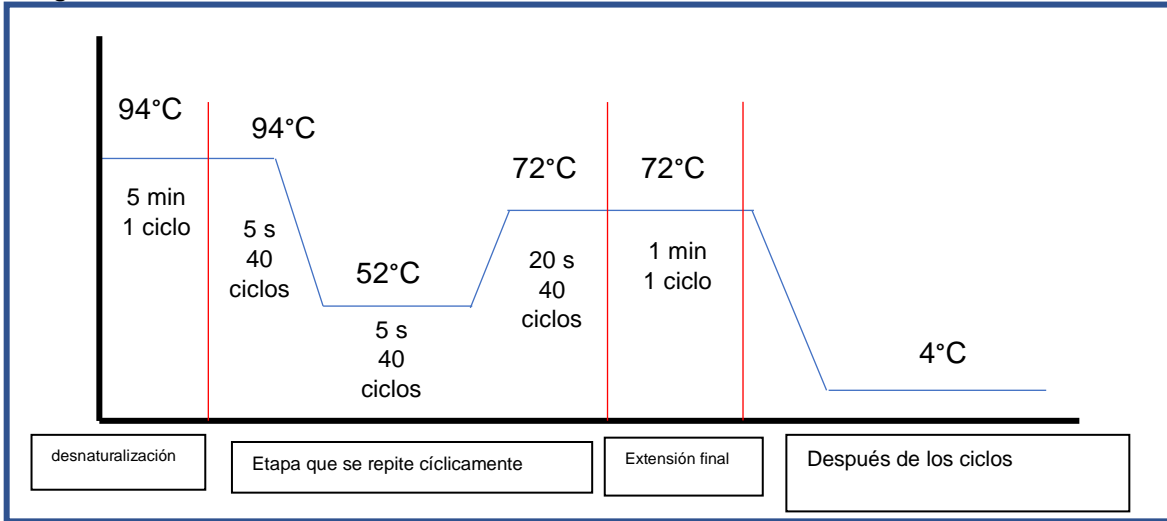


Figura 27. Programa PCR de la especie *Sus scrofa domesticus* para muestra control.

Programa de PCR directa

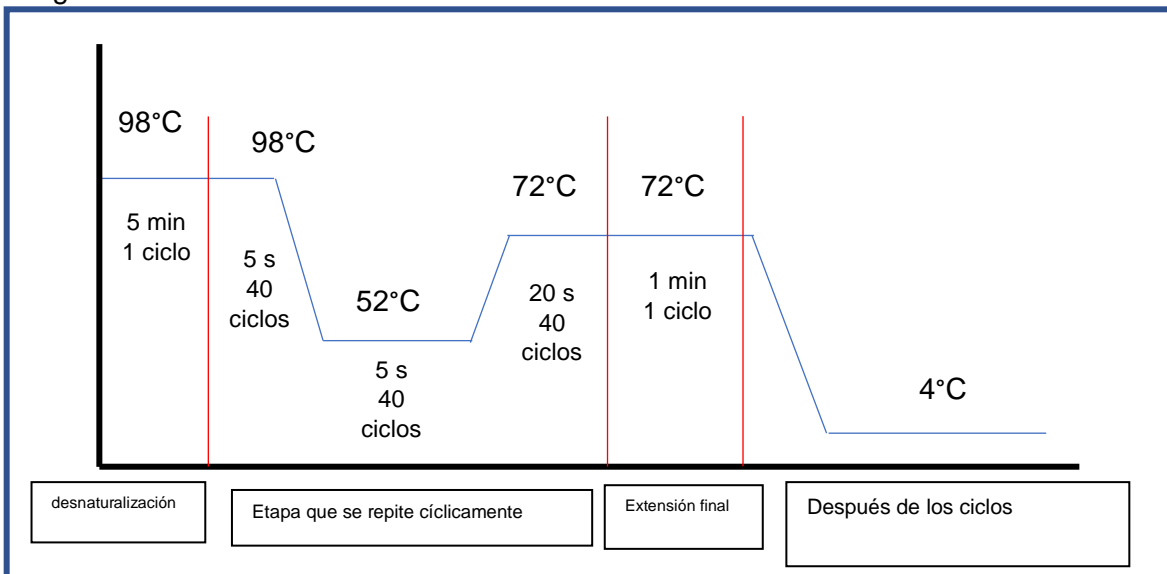


Figura 28. Programa PCR directa de la especie *Sus scrofa domesticus*.

Oreochromis niloticus

Cuadro 13. Primer de *Oreochromis niloticus* empleado en la identificación de origen de grenetina.

| Primer | secuencia | No. De bases | Temperatura °C | Tamaño del amplificado | Número Genbank |
|---------|------------------------|--------------|----------------|------------------------|----------------|
| Frontal | TCTCGGAGACGACCAAATCTA | 21 | 60°C | 209 pb | MT805375.1 |
| Reverso | CAGATGAGGCGAGAAGAAGAAG | 22 | 60°C | | |

Programa de PCR.

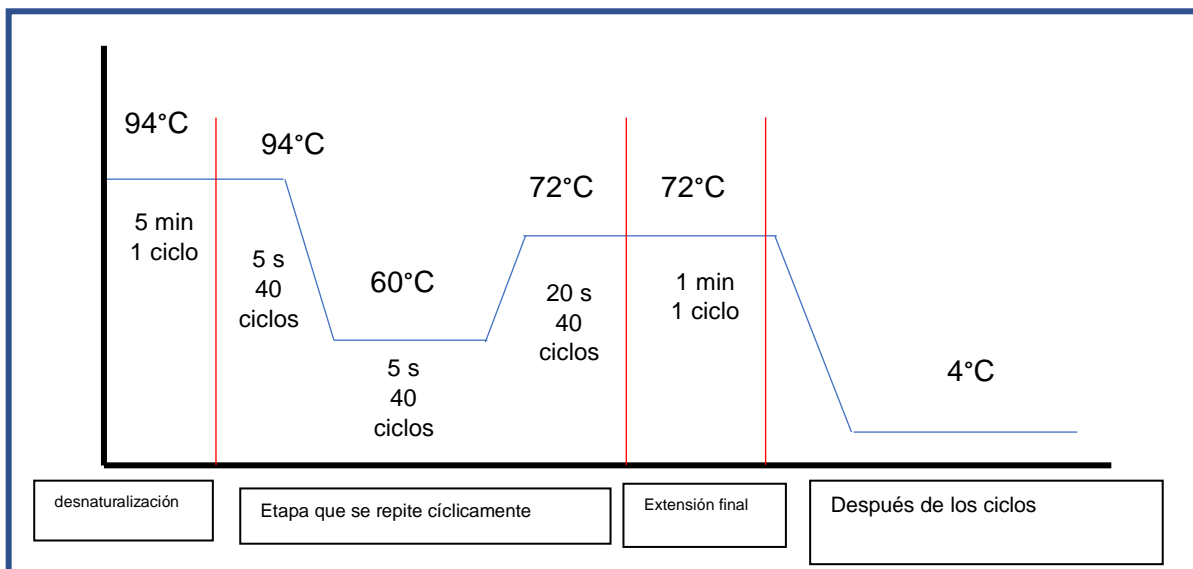


Figura 29. Programa PCR de la especie *Oreochromis niloticus* para muestra control.

Programa PCR Directa

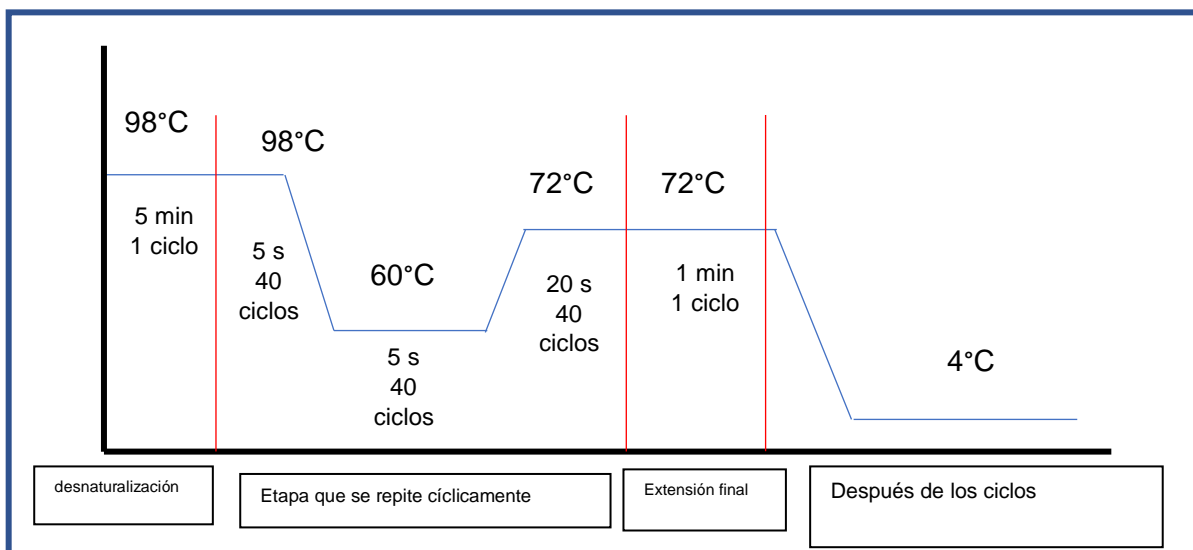


Figura 30. Programa PCR directa de la especie *Oreochromis niloticus*.

Gallus gallus domesticus

Cuadro 14. Primer de *Gallus gallus domesticus* empleado en la identificación de origen de grenetina.

| Primer | secuencia | No. De bases | Temperatura °C | Tamaño del amplificado | Número Gen bank |
|---------|------------------------|--------------|----------------|------------------------|-----------------|
| Frontal | GGAGCTAACCACAGCTACATAC | 22 | 61°C | 235pb | MT800500.1 |
| Reverso | GGGTTGGATAAGCAGAGAGAAG | 22 | 61°C | | |

Programa de PCR

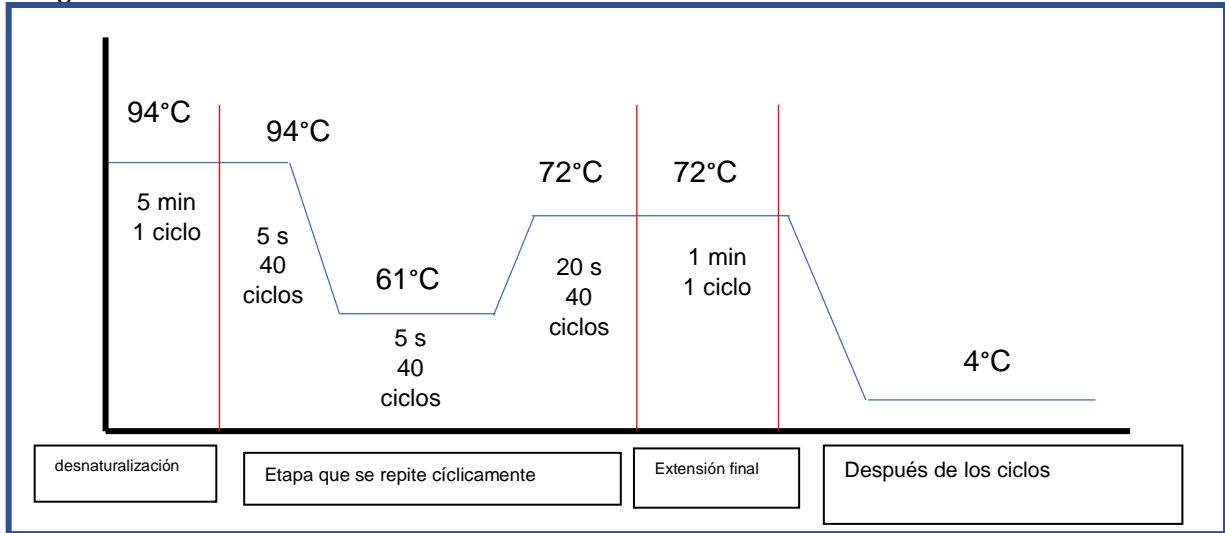


Figura 31. Programa PCR de la especie *Gallus gallus domesticus* para muestras control.

Programa PCR directa

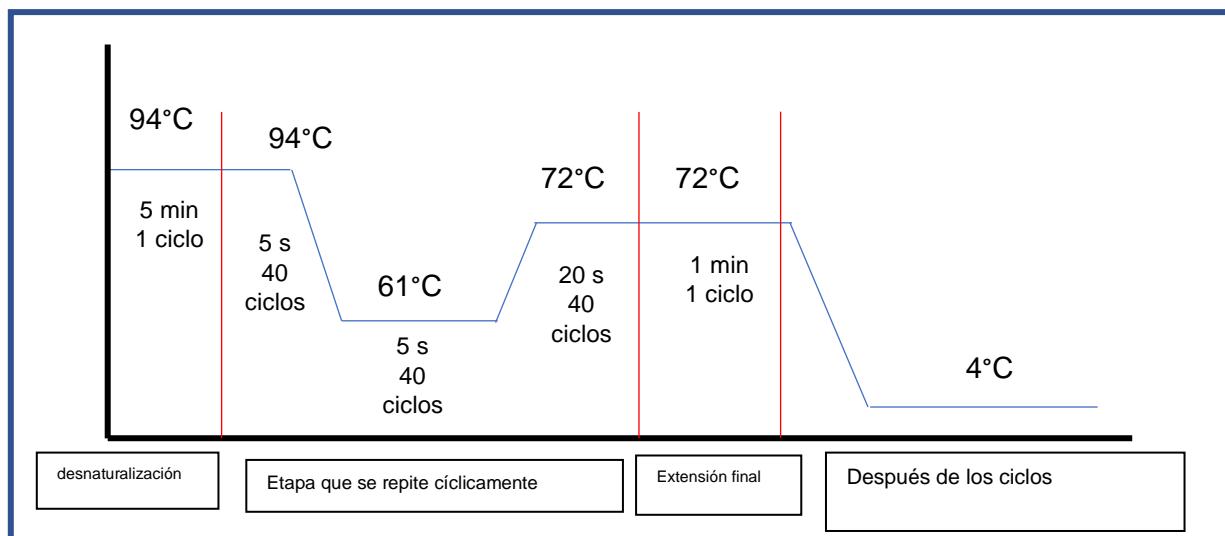


Figura 32. Programa PCR directa de la especie *Gallus gallus domesticus*.

3.2. Resultados del objetivo 2

Después de haber diseñado y adquirido los primers correspondientes para las especies de estudio se procedió a corroborar su especificidad para cada una de ellas mediante la aplicación de la técnica de PCR convencional.

Para poder desarrollar la PCR se extrajo el ADN por el método de sambrook 2001, donde se obtuvieron las siguientes concentraciones:

Cuadro 15. Resultados de la extracción y cuantificación de ADN concentrados y diluidos.

| Muestra | Concentradas | | Diluidas | |
|----------------|------------------|-------------|------------------|-------------|
| | Relación 260/280 | ADN (ng/μl) | Relación 260/280 | ADN (ng/μl) |
| Ganado Bovino | 1.57 | 566.7 | 1.59 | 106.8 |
| Ganado Porcino | 1.47 | 500.1 | 1.48 | 59.0 |
| Pollo | 1.63 | 805.2 | 1.60 | 54.2 |
| Pescado | 1.40 | 705.0 | 1.45 | 55.7 |

Al analizar el cuadro 15, primero podemos apreciar los datos pertenecientes a la relación de contaminación de proteínas 260/280 de las especies de interés, para el caso de la muestra de ganado bovino se obtuvo un valor de 1.57, la de ganado porcino obtuvo un valor de 1.47, la muestra de pollo obtuvo un valor de 1.63 y por último la muestra de pescado obtuvo un valor de 1.40, analizando estos datos observamos que todas las muestras obtuvieron un valor menor al ideal de 1.8 esto nos indica que la cantidad de proteína en la muestra es alta, pero se pueden utilizar en las siguientes pruebas, debido a que la proteína sufre una desnaturalización al introducir la muestra al termociclador y someterlas a altas temperaturas, en el caso de las proteínas, la palabra desnaturalización indica que la estructuración se aleja de la forma nativa debido a un importante cambio en su conformación tridimensional, producido por movimientos de los diferentes dominios de la proteína, que conlleva un aumento en la entropía de las moléculas. Pueden ocurrir modificaciones conformacionales debidas a cambios térmicos, químicos o efectos mecánicos inducidos por calentamiento o enfriamiento (Badui Dergal, 2006).

Como segundo punto de interés tenemos la concentración para el caso de la muestra de ganado bovino se obtuvo un valor de 566.7 ng/μl, la de ganado porcino obtuvo un valor de 500.1 ng/μl, la muestra de pollo obtuvo un valor de 805.2 ng/μl y por último la muestra de pescado obtuvo un valor de 705.0 ng/μl. La bibliografía nos indica que el rango estimado de una concentración aceptable es de 60 a 100 ng/μl, porque al someter las muestras a la técnica de PCR se multiplicara la cantidad de

ADN y debido a que las muestras obtuvieron un valor muy alto, se procedió a diluir y cuantificar nuevamente todas las muestras.

Para obtener la dilución correcta se realizó el cálculo por medio de una regla de 3 para cada una de las muestras. El siguiente ejemplo pertenece a la muestra de ganado bovino:

$$50\mu L = 566.7 \frac{ng}{\mu L}$$

$$x = 60 \frac{ng}{\mu L}$$

$$x = \frac{(50\mu L) \left(60 \frac{ng}{\mu L}\right)}{566.7 \frac{ng}{\mu L}} = 5.29 \mu L = 5.3 \mu L$$

Por lo tanto, se complementó la muestra con 44.7 μL de agua libre de nucleasas. Obteniendo un total de 50 μL .

Los nuevos valores obtenidos en la cuantificación pertenecientes a la relación 260/280 de las muestras diluidas son los siguientes, para el caso de la muestra de ganado bovino se obtuvo un valor de 1.59, la de ganado porcino obtuvo un valor de 1.48, la muestra de pollo obtuvo un valor de 1.60 y por último la muestra de pescado obtuvo un valor de 1.45, analizando estos datos observamos que todas las muestras se mantuvieron en un valor menor al ideal de 1.8. para el caso de la concentración se obtuvieron los siguientes valores para cada muestra respectivamente 106.8 ng/ μl , 59.0 ng/ μl , 54.2 ng/ μl y 55.7 ng/ μl , se puede apreciar que los valores se encuentran cercanos al rango establecido en la bibliografía, por lo tanto, se procedió a su uso en las pruebas siguientes (Salazar Montes, 2013).

Especificidad de primers de las especies de estudio para corroborar su correcta y completa amplificación durante su uso en la técnica de PCR.

La evaluación de la especificidad de los primers para su correcta amplificación se realizó mediante la técnica de PCR, en la reacción se incluyeron las 4 especies diferentes pertenecientes al reino animal pero similares genéticamente (res, cerdo, pollo y pescado) y 3 especies pertenecientes al reino vegetal (papa, chayote y calabaza). Es conveniente explicar un poco lo que sucederá en este proceso, los primers que se incluyan en la reacción, solo deben amplificar para la especie que fueron diseñados, por ejemplo si nosotros agregamos primers de Bos Taurus (res) a la reacción solo deberá amplificar para esa especie, de suceder esto al concluir la técnica podremos precisar que el diseño fue correcto y que los primers son específicos para esa especie, en caso contrario si los primers amplifican para otra especie quiere decir que no son específicos y se deberá volver a diseñarlos.

Otro aspecto importante que se tiene que considerar a la hora de revisar los resultados de la especificidad de primers, es el tamaño del amplificado de los mismos, debido a que se diseñan con una longitud específica y cada una de las especies cuenta con una longitud diferente por eso se requiere validar si los primers de la especie de la cual se busca su especificidad cuentan con esa longitud real, para esto se hace uso de un marcador de peso molecular, los cuales son moléculas de ADN o de proteínas que permiten determinar por comparación el tamaño de los fragmentos de ácidos nucleicos o proteínas contenidos en las muestras sometidas a electroforesis (Salazar Montes, 2013). En la figura 32 se pueden observar las escaleras de las bandas que se obtienen de fragmentos de ADN que son visibles con la tinción de bromuro de etidio de dos diferentes marcadores de peso molecular usados durante la experimentación, el inciso a) es un marcador que presenta una triple intensidad en la banda de los 600 pb, tiene un alcance de 2072 pb y este requiere menos cantidad para distinguir su intensidad y el inciso b) tiene triple intensidad en la banda de los 500 pb y requiere más cantidad de este para distinguirse.

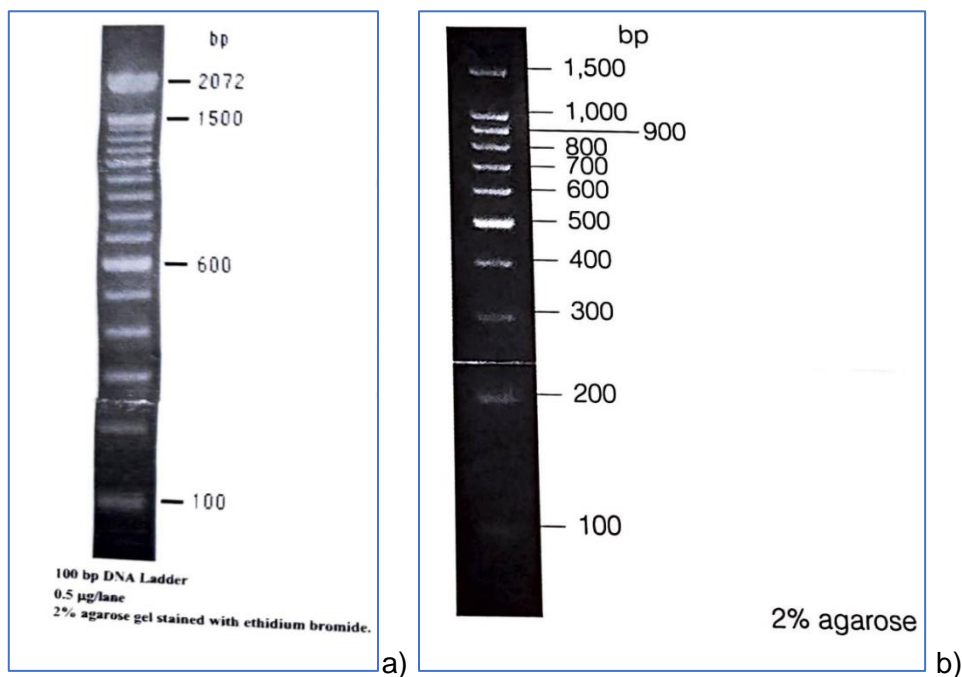


Figura 33. Escaleras de ADN de marcadores de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, 2022).

Considerando la información anterior, se presentan los siguientes resultados para la especificidad de primers para cada una de las especies de interés.

- **Bos taurus (Res).**

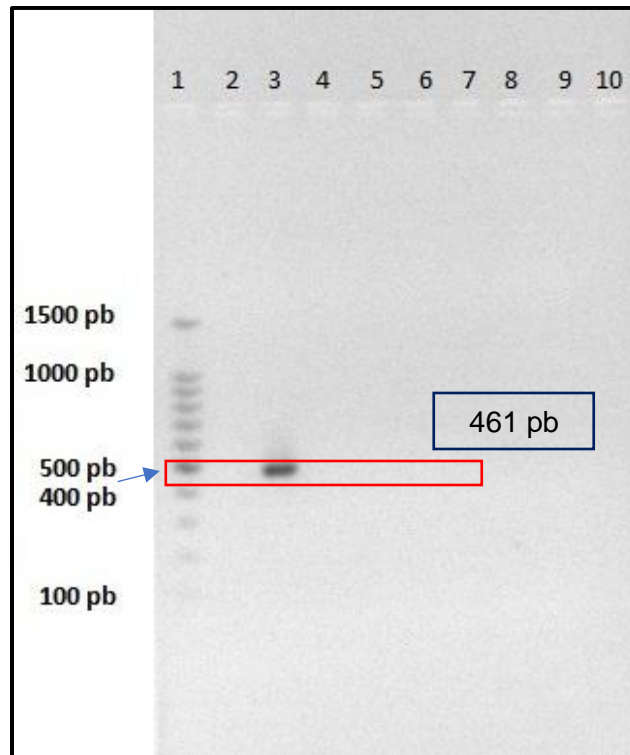


Figura 34. Gel de agarosa al 1%, determinación de especificidad de primers *Bos taurus* vs diferentes especies 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Bos taurus*, 4) *Gallus gallus domesticus*, 5) *Oreochromis niloticus*, 6) *Sus scrofa domesticus*, 7) Papa, 8) Chayote, 9) Calabaza.

Al observar la figura 33 se puede apreciar que el ADN extraído para la especie *Bos taurus* si logro amplificar con los primers diseñados y que estos no amplificaron para ninguna de las otras especies incluidas en la reacción con lo que se logró corroborar su especificidad, considerando lo anterior, esta muestra la denominamos como control positivo, también se puede apreciar que la banda correspondiente al amplificado se encuentra ubicada entre el par de bandas correspondiente a las 400 las 500 pb, debido a que los primers que se diseñaron tienen una correcta amplificación de 461 pb.

- ***Sus scrofa domesticus* (cerdo).**

En la siguiente figura 34 se puede observar que el ADN extraído para la especie *Sus scrofa domesticus* de igual manera logro amplificar con los primers diseñados y que estos no amplificaron para ninguna otra especie de las incluidas en la reacción con lo que se logró comprobar su especificidad, esta muestra también la denominamos control positivo, también se puede apreciar que la banda correspondiente al amplificado se encuentra ubicada casi a la par de la marca de as 200 pb, debido a que los primers que se diseñaron tienen un amplificado de 210 pb, coincidiendo con lo esperado.

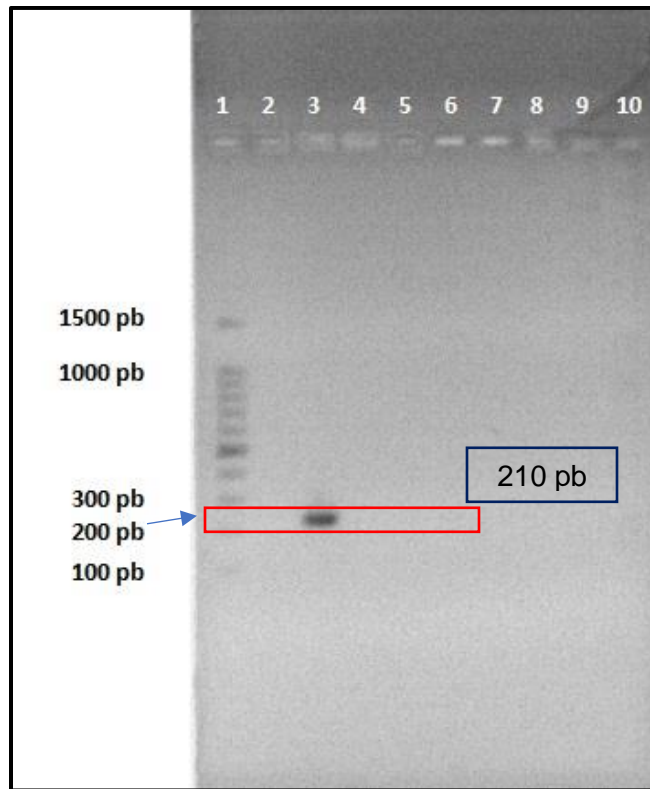


Figura 35. Gel de agarosa al 1%, determinación de especificidad de primers *Sus scrofa domesticus* vs diferentes especies 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Sus scrofa domesticus*, 4) *Gallus gallus domesticus*, 5) *Oreochromis niloticus*, 6) *Bos taurus*, 7) Papa, 8) Chayote y 9) Calabaza.

- **Gallus gallus domesticus**

A continuación en la figura 35 se puede observar que el ADN extraído para la especie *Gallus gallus domesticus* obtuvo el mismo comportamiento que las especies anteriores al correr su gel, debido a que logra amplificar con los primers diseñados y que estos no amplificaron para ninguna otra especie de las incluidas en la reacción con lo que se logró comprobar su especificidad, esta muestra también la denominamos control positivo, en la figura también se puede apreciar que la banda correspondiente al amplificado se encuentra ubicada entre las bandas correspondientes a las 200 y 300 pb, debido a que los primers que se diseñaron tienen un amplificado de 235 pb.

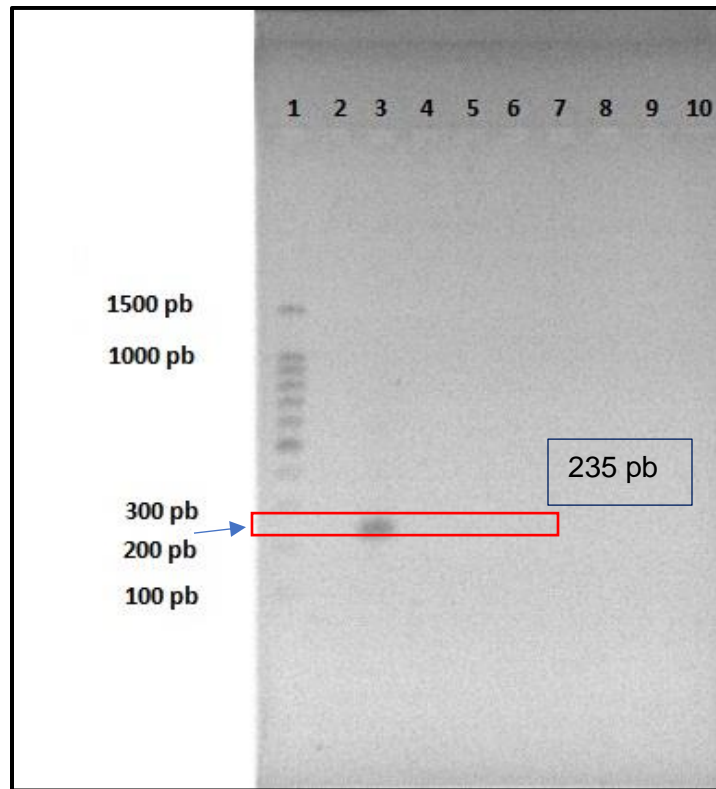


Figura 36. Gel de agarosa al 1%, determinación de especificidad de primers *Gallus gallus domesticus* vs diferentes especies 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Gallus gallus domesticus*, 4) *Sus scrofa domesticus*, 5) *Oreochromis niloticus*, 6) *Bos taurus*, 7) Papa, 8) Chayote, 9) Calabaza.

- **Oreochromis niloticus (pez)**

En la siguiente figura 36 se puede observar que con el ADN extraído para la especie *Oreochromis niloticus* y con los primers diseñados se logró amplificar de manera correcta y que estos no amplificaron para ninguna otra especie de las incluidas en la reacción con lo que se logró comprobar su especificidad, esta muestra también la denominamos control positivo, también se puede apreciar que la banda correspondiente al amplificado se encuentra ubicada casi a la par de la marca de as 200 pb, debido a que los primers que se diseñaron cuentan con un amplificado esperado de 209 pb.

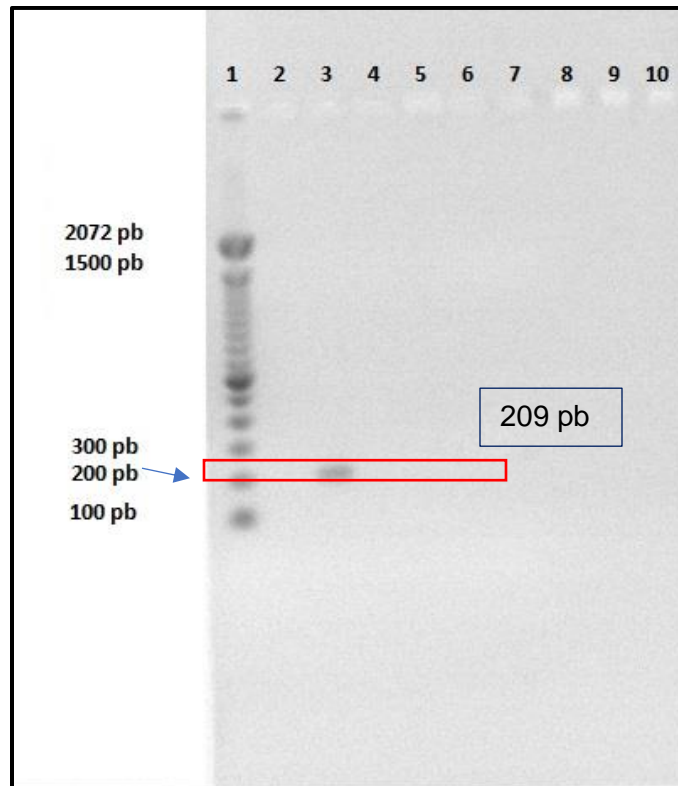


Figura 37. Gel de agarosa al 1%, determinación de especificidad de primers *Oreochromis niloticus* vs diferentes especies 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Oreochromis niloticus*, 4) *Bos taurus*, 5) *Sus scrofa domesticus*, 6) *Gallus gallus domesticus*, 7) Papa, 8) Chayote, 9) Calabaza.

Los resultados obtenidos de las pruebas de especificidad nos demostraron que los primers diseñados para cada una de las especies son totalmente específicos, debido a esto se procedió a realizar las posteriores pruebas de PCR para detectar la presunta presencia de las especies de estudio en muestras comerciales.

3.3. Resultados del objetivo 3

Después de corroborar que los primers diseñados solo amplificaban para las especies de estudio, se inició la búsqueda de las especies *Bos taurus*, *Sus scrofa domesticus*, *Gallus gallus domesticus* y *Oreochromis niloticus* para lo cual se realizaron pruebas de PCR punto final directas a todas y cada una de las 16 muestras de ADN diluidas pertenecientes a gelatinas comerciales, siguiendo las condiciones de las figuras 22, 23, 24 y 25, obteniendo los siguientes resultados.

PCR Directa análisis

- *Bos taurus* (res).

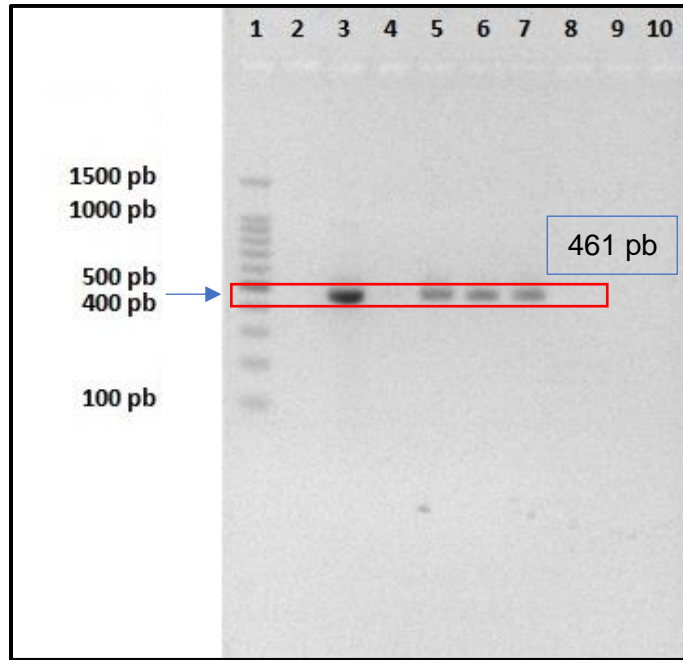


Figura 38. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie *Bos taurus* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Bos taurus*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

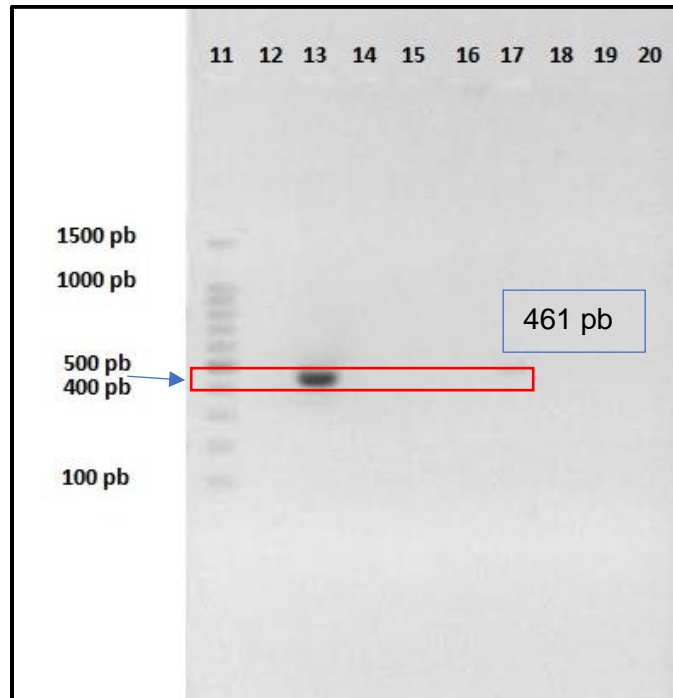


Figura 39. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie *Bos taurus* en diferentes gelatinas comerciales 11) Marcador de peso Molecular, 12) Blanco, 13) *Bos taurus*, 14) GPR1, 15) GD1, 16) GMK1, 17) GSP1, 18) GFR1, 19) GG1 y 20) GM1.

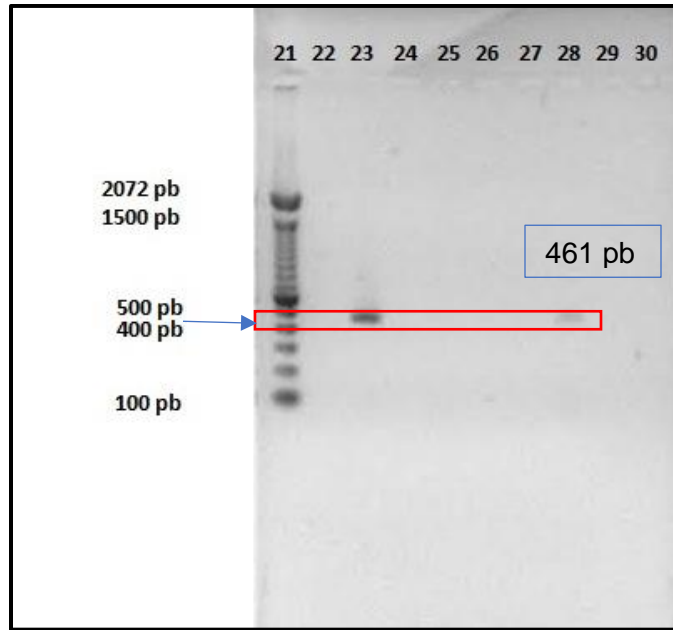


Figura 40. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie *Bos taurus* en diferentes gelatinas comerciales 21) Marcador de peso Molecular, 22) Blanco, 23) *Bos taurus*, 24) GJa1, 25) GSa1, 26) GCo1, 27) GCH1 y 28) GCay1.

Las figuras 37, 38 y 39 pertenecen a los resultados correspondientes a la prueba de identificación de la especie de *Bos taurus*. En primer lugar, se presenta la figura 37 donde se aprecia en el carril número uno el marcador de peso molecular, en el segundo carril el blanco, en el tercer carril se encuentra el control positivo de *Bos taurus*, en el cuarto carril se logra observar un amplificado muy tenue y en los carriles 5, 6 y 7 apreciamos amplificadas más gruesas. Haciendo un análisis más detallado podemos decir que las muestras GJo1, GB1 y GA1 contienen grenetina de la especie *Bos Taurus* y que la muestra GPo1 si contiene grenetina de la especie de interés, pero en muy poca cantidad.

En segundo lugar, se presenta la figura 38 donde se puede apreciar que en el carril 13 se encuentra el control positivo de *Bos taurus* y en los carriles siguientes no se logra apreciar ningún amplificado a excepción del carril 17 en el que si se aprecia un amplificado tenue este pertenece a la muestra GSP1 con lo que se puede decir que esta muestra contiene la especie de interés, pero no en gran cantidad.

Y en tercer lugar en la Figura 39 se observa en el carril número 21 el marcador de peso molecular, en el carril 23 se encuentra el control positivo de *Bos taurus* y en los carriles posteriores no se logra apreciar ningún amplificado a excepción del carril 28 en el que se ubicó la muestra GCay1 y en el que si se aprecia un amplificado, con lo que se determinó que esta muestra contiene la especie de interés.

- **Sus scrofa domesticus (cerdo).**

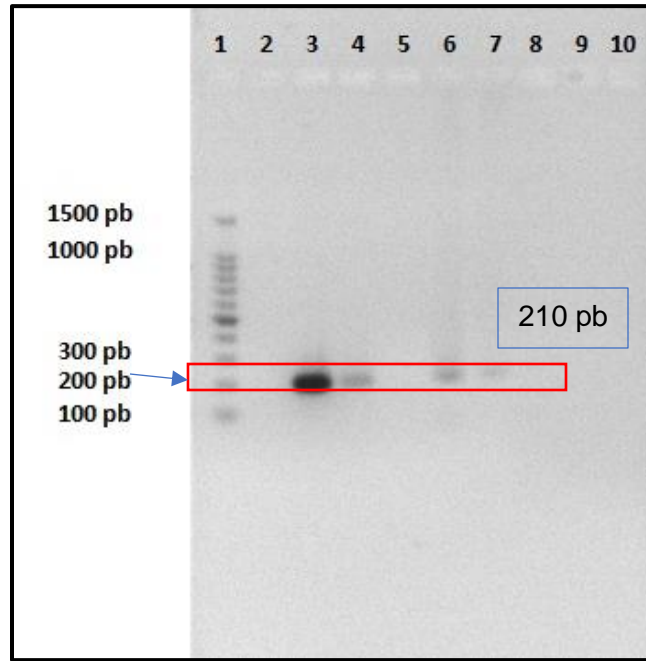


Figura 41. Gel de agarosa al 1.5%, para identificación de la especie *Sus scrofa domesticus* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Sus scrofa domesticus*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

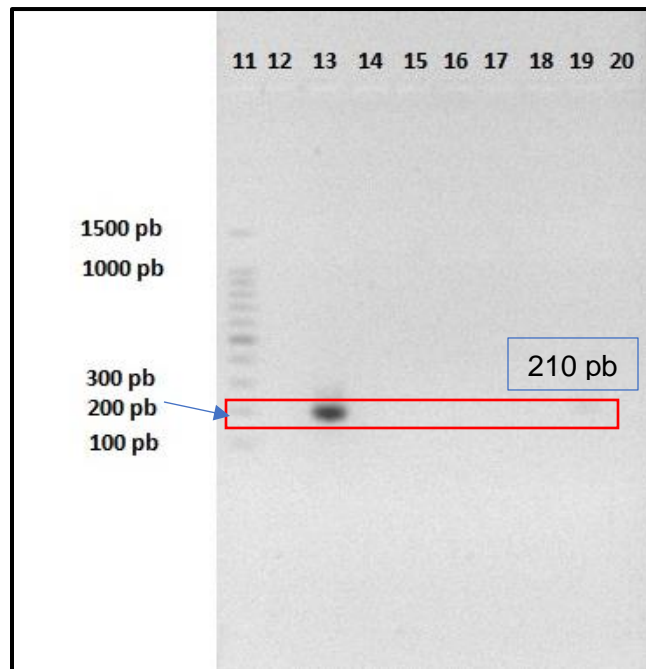


Figura 42. Gel de agarosa al 1.5%, para identificación de la especie *Sus scrofa domesticus* en diferentes gelatinas comerciales 11) Marcador de peso Molecular, 12) Blanco, 13) *Sus scrofa domesticus*, 14) GPR1, 15) GD1, 16) GMK1, 17) GSP1, 18) GFR1, 19) GG1 y 20) GM1.

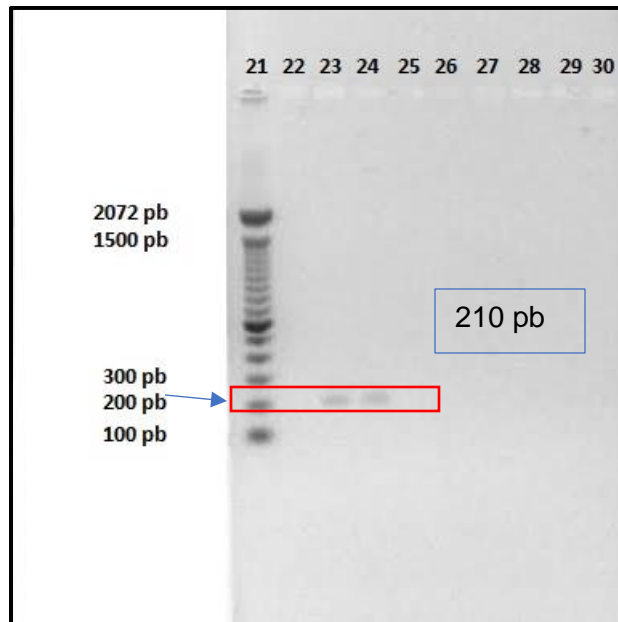


Figura 43. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie *Sus scrofa domesticus* en diferentes gelatinas comerciales 21) Marcador de peso Molecular, 22) Blanco, 23) *Sus scrofa domesticus*, 24) GJa1, 25) GSa1, 26) GCo1, 27) GCH1 y 28) GCay1.

En las figuras anteriores 40, 41 y 42 pertenecientes a los geles de agarosa correspondientes a la prueba de identificación de la especie *Sus scrofa domesticus*. En los resultados obtenidos y presentados en la figura 40 se puede apreciar en el carril número uno el marcador de peso molecular, en el segundo carril el blanco, en el tercer carril se encuentra el control positivo de *Sus scrofa domesticus*, en el cuarto y sexto carril se logran observar amplificadas, en el quinto carril no se logra apreciar amplificado y en el séptimo se aprecia un amplificado tenue. Continuando con el análisis a profundidad podemos decir que las muestras GPo1 y GB1 con seguridad contienen gnetina de la especie *Sus scrofa domesticus* al igual que la muestra GA1, pero esta última en muy poca cantidad. La muestra GJo1 no amplificó con lo que se puede decir que no contiene gnetina proveniente de la especie *Sus scrofa domesticus*.

Parte de los resultados obtenidos también se presentan en la figura 41 donde también contamos con marcador de peso, blanco y control en los carriles 11, 12, y 13 respectivamente, la diferencia radica en las diferentes muestras presentadas, como podemos apreciar los carriles del 14 al 20 no se aprecian amplificadas, a excepción del 19 donde se colocó la muestra GG1 y se puede apreciar un amplificado tenue lo que nos indica que esa muestra contiene gnetina de la especie de interés en esta prueba pero en poca cantidad.

Posteriormente en la Figura 42 se observa en el carril número 21 el marcador de peso molecular, en el carril 23 el control positivo de *Bos taurus* y en el carril 24 en el que se ubicó la muestra GJa1 que es el único en que se aprecia un amplificado, con lo que se determinó que esta muestra contiene la especie de interés.

- Gallus gallus domesticus

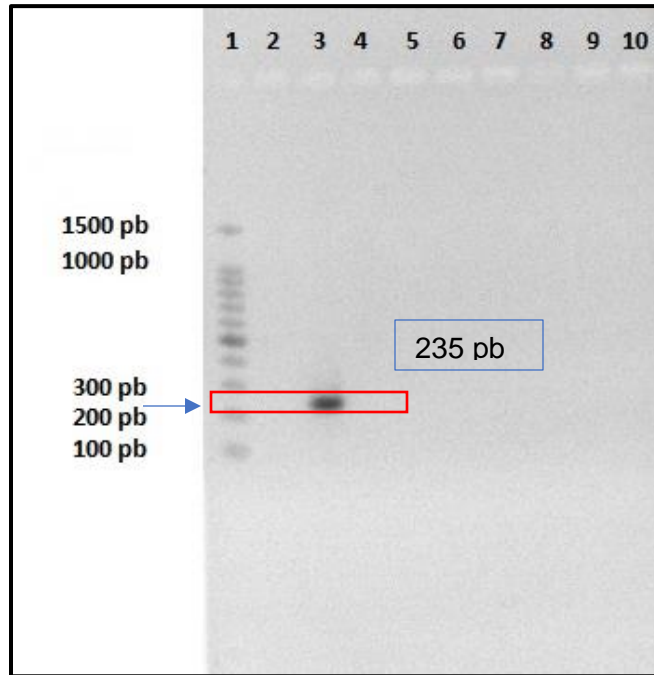


Figura 44. Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de la especie *Gallus gallus domesticus* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Gallus gallus domesticus*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1 y 7) GA1.

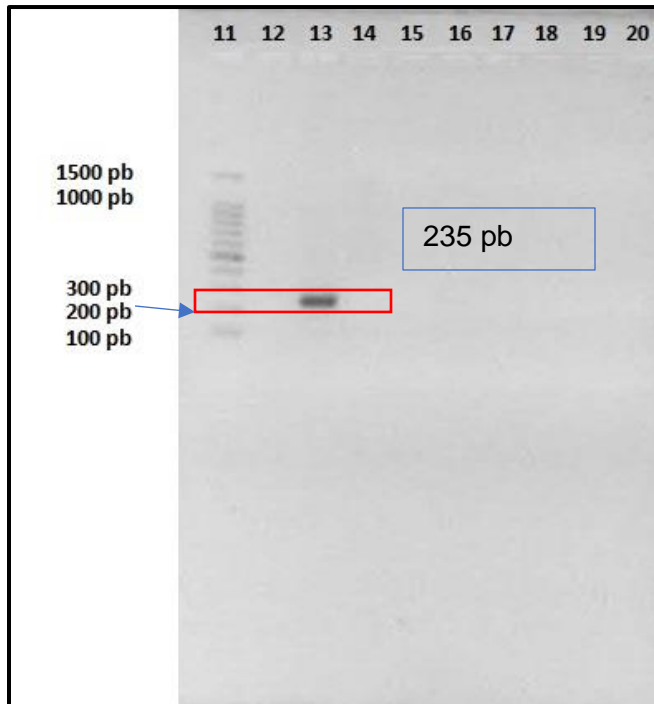


Figura 45. Gel de agarosa al 1.5%, para identificación de la especie *Gallus gallus domesticus* en diferentes gelatinas comerciales 11) Marcador de peso Molecular, 12) Blanco, 13) *Gallus gallus domesticus*, 14) GPR1, 15) GD1, 16) GMK1, 17) GSP1, 18) GFR1, 19) GG1 y 20) GM1.

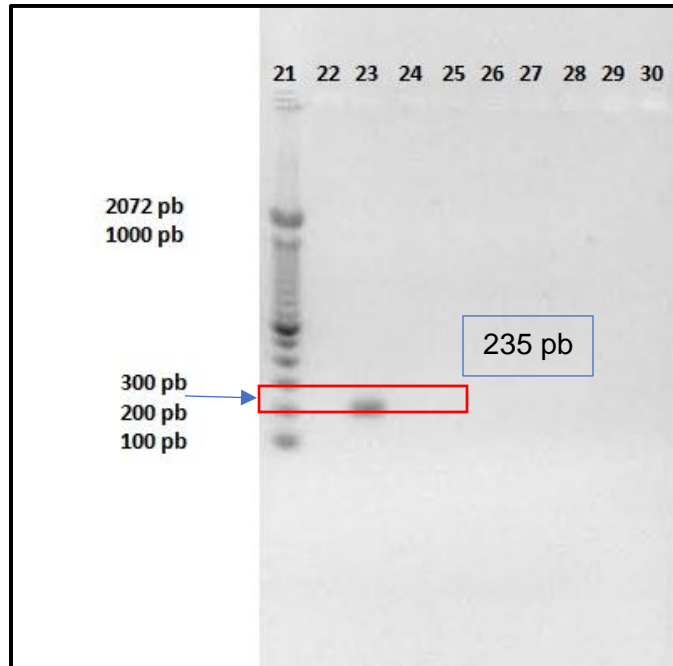


Figura 46. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie *Gallus gallus domesticus* en diferentes gelatinas comerciales 21) Marcador de peso Molecular, 22) Blanco, 23) *Gallus gallus domesticus*, 24) GJa1, 25) GSa1, 26) GCo1, 27) GCH1 y 28) GCay1.

Las figuras anteriores 43, 44 y 45 pertenecientes a los geles de agarosa correspondientes a la prueba de identificación de la especie *Gallus gallus domesticus* nos presentan los resultados obtenidos. En las tres figuras se puede apreciar en los carriles 1, 11 y 21 el marcador de peso molecular, en los carriles 2, 12, y 22 el blanco y en los carriles 3, 13 y 23 se encuentra el control positivo de *Gallus gallus domesticus*, para los demás carriles. Podemos notar que ninguna de las muestras presentadas en ambos geles contiene la especie de interés.

- **Oreochromis niloticus (Pez)**

En las siguientes figuras 46, 47 y 48 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de identificación de la especie *Oreochromis niloticus*. En la figura 46 se puede apreciar al igual que en los anteriores geles en el primer carril el marcador de peso, en el segundo el blanco y en el tercero se encuentra el control de la especie y podemos destacar que en el carril cuarto se aprecia un amplificado muy grueso, este carril contenía la muestra de GPo1 lo que nos indica que esta muestra contiene en una gran proporción grenetina de la especie *Oreochromis niloticus*, las demás muestras se pueden descartar debido a que no se logró apreciar ningún amplificado.

En la figura 47 se puede apreciar en el carril 11 el marcador de peso, en el 12 el blanco y en el 13 se encuentra el control, en los carriles contiguos que son el 14, 15, 16, 17, 18 y 20 no se logra apreciar ningún amplificado con lo que podemos decir que las muestras GPR1, GD1, GMK1, GSP1 y GFR1 respectivamente ubicadas en cada carril de estos no contienen grenetina proveniente de esta especie. En el carril 19 se aprecia un amplificado grueso, este pertenece a la muestra GG1, lo que nos indica que esta muestra si contiene grenetina de la especie de interés en gran proporción.

Siguiendo la secuencia de figuras se presenta la figura 48 donde se pueden apreciar las muestras restantes, pero a diferencia de los geles 46 y 47 podemos notar que ninguna de las muestras presentadas este gel contiene la especie de interés.

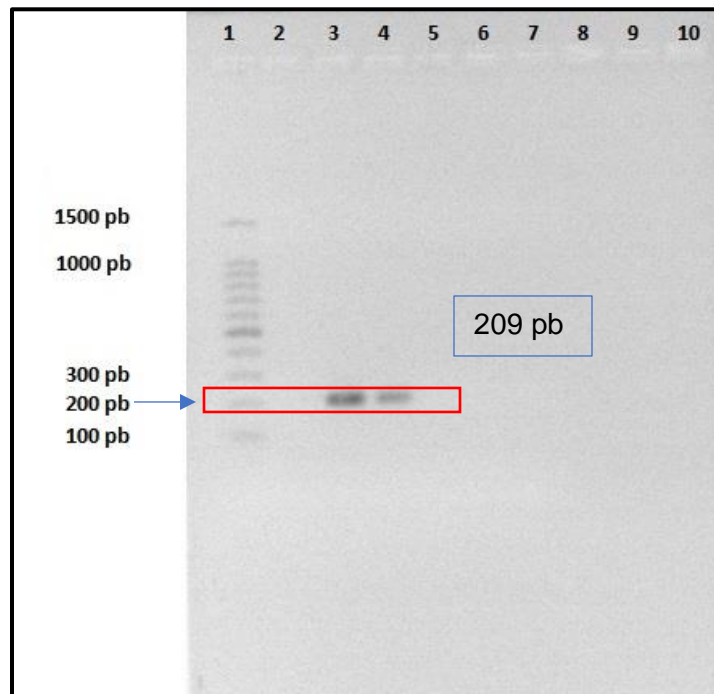


Figura 47. Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de la especie *Oreochromis niloticus* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Oreochromis niloticus*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

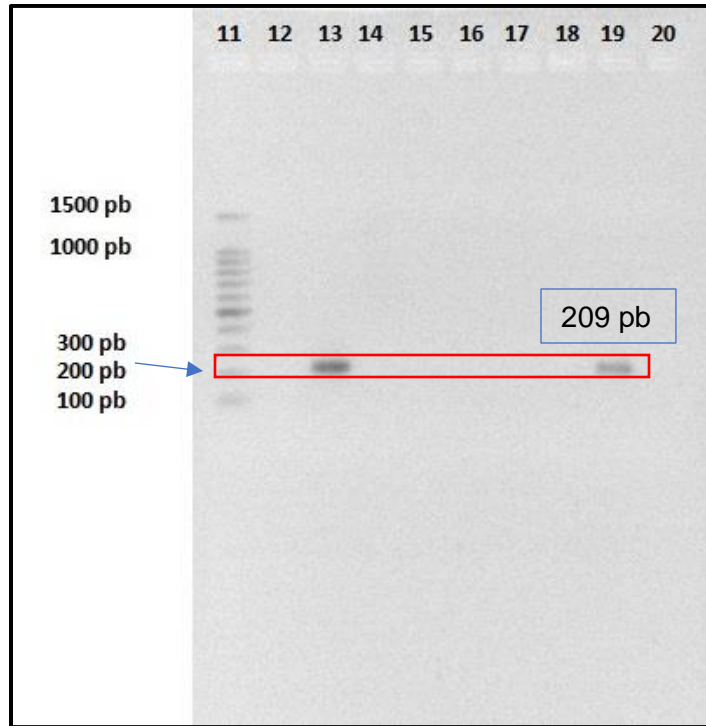


Figura 48. Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de la especie *Oreochromis niloticus* en diferentes gelatinas comerciales 11) Marcador de peso Molecular, 12) Blanco, 13) *Oreochromis niloticus*, 14) GPR1, 15) GD1, 16) GMK1, 17) GSP1, 18) GFR1, 19) GG1 y 20) GM1.

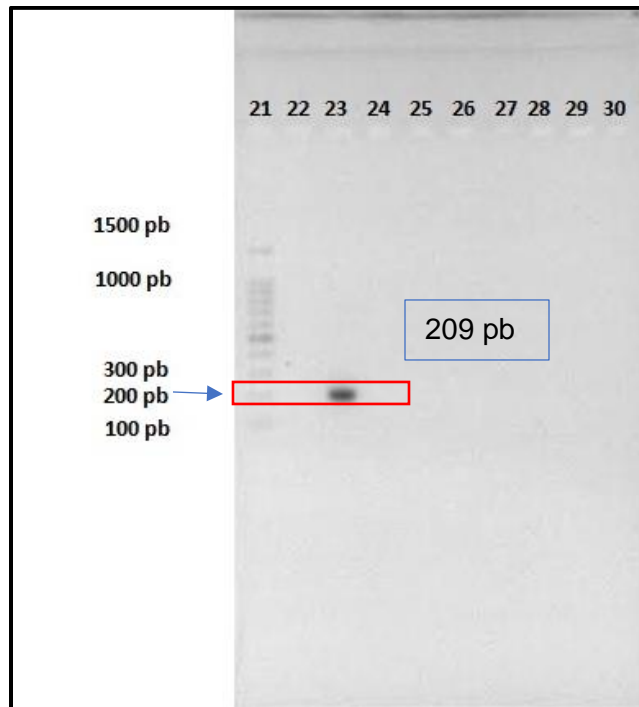


Figura 49. Gel de agarosa al 1.5%, para identificar la especie *Oreochromis niloticus* en diferentes gelatinas comerciales 21) Marcador de peso Molecular, 22) Blanco, 23) *Oreochromis niloticus*, 24) GJa1, 25) GSa1, 26) GCo1, 27) GCH1 y 28) GCay1.

Grenetinas

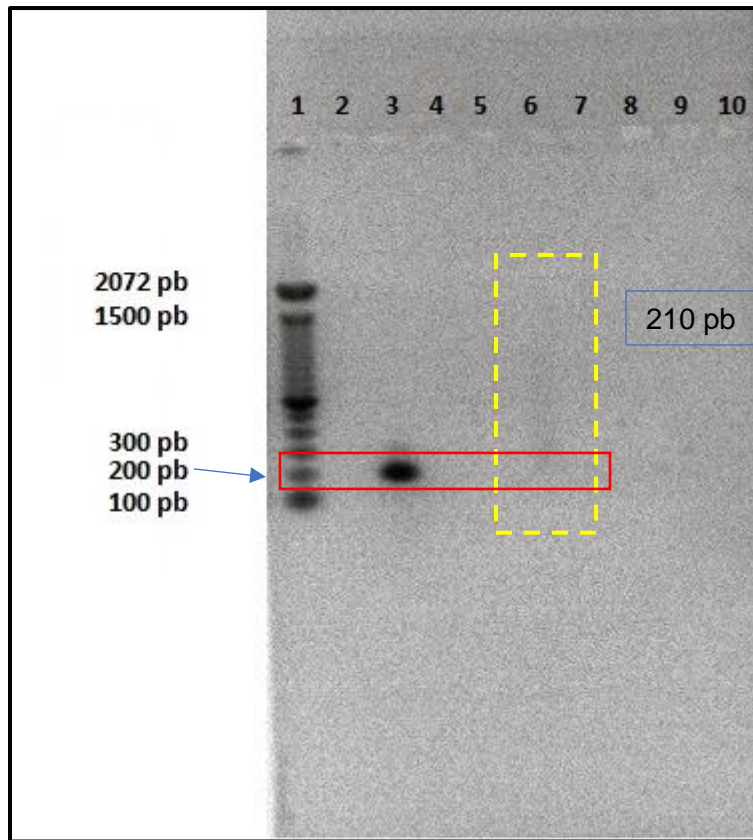


Figura 50. Gel de agarosa al 1.5%, para identificación de la especie *Sus scrofa domesticus* en diferentes grenetinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *Sus scrofa domesticus*, 4) GRDG1, 5) GRPD1, 6) GRGE1, 7) GRD1 Y 8) GRK1.

En la figura 49 se puede apreciar en el carril uno el marcador de peso, en el 2 el blanco y en el 3 se encuentra el control, en los carriles siguientes que son el 4, 5, 7, 8, 9 y 10 no se logra apreciar ningún amplificado con lo que podemos decir que las muestras GRDG1, GRPD1, GRD1 y GRK1 respectivamente ubicadas en cada carril de estos no contienen grenetina proveniente de esta especie. En el carril 6 se aprecia un degradado del amplificado, este pertenece a la muestra GRGE1, lo que nos indica que esta muestra si contiene grenetina de la especie de interés, pero es importante destacar que el ADN se encuentra degradado, lo que pudo haber ocurrido durante el proceso de elaboración.

Cuadro 16. Especies encontradas mediante la técnica de PCR en muestras de gelatinas comerciales

| Muestra | Bos taurus | Sus scrofa domesticus | Gallus gallus domesticus | Oreochromis niloticus |
|---------|------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| GG1 | | * | | * |
| GPO1 | * | * | | * |
| GA1 | * | * | | |
| GM1 | | | | |
| GJo1 | * | | | |
| GB1 | * | * | | |
| GPR1 | | | | |
| GMK1 | | | | |
| GSP1 | * | | | |
| GD1 | * | | | |
| GFR1 | | | | |
| GCo1 | | | | |
| GSa1 | | | | |
| GCH1 | | | | |
| GJa1 | | * | | |
| GCay1 | * | | | |

Cuadro 17. Especies encontradas mediante la técnica de PCR en muestras de gnetinas comerciales

| Muestra | Bos taurus | Sus scrofa domesticus | Gallus gallus domesticus | Oreochromis niloticus |
|---------|------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| GRPD1 | | | | |
| GRGE1 | | * | | |
| GRD1 | | | | |
| GRK1 | | | | |
| GRDG1 | | | | |

Para el análisis de los resultados primero es importante hacer énfasis en que se revisaron todas las etiquetas que se encuentran en la parte de atrás del empaque de cada una de las muestras, para esto se revisó la norma que brinda las Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria la cual es la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. Esta norma nos indica que la información contenida en las etiquetas de los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados debe ser veraz y describirse y presentarse de forma tal que no induzca a error al consumidor con respecto a la **naturaleza** y características del producto. Unas de las especificaciones de la norma que aplican a las muestras con las que contamos por ser deshidratadas son las siguientes: Cuando se trate de alimentos deshidratados o condensados, destinados a ser reconstituidos, pueden enumerarse sus ingredientes por orden cuantitativo decreciente (m/m) en el producto reconstituido, siempre que se incluya una indicación como la que sigue: "ingredientes del producto cuando se prepara según las instrucciones de la etiqueta", u otras leyendas análogas.

En el cuadro 16 se presentan los resultados obtenidos en las pruebas de identificación de especies en gelatinas comerciales mediante la técnica de PCR en la primera columna podemos encontrar las siglas de las muestras, en la segunda columna el nombre de la especie *Bos taurus*, en la tercera el nombre de la especie de *Sus scrofa domesticus*, en la cuarta columna se tiene el nombre de la especie *Gallus gallus domesticus* y en la quinta y última columna se tiene el nombre de la especie *Oreochromis niloticus*.

En la primera muestra analizada que es GG1, gracias a las pruebas realizadas, se logró identificar que contiene ADN de dos especies diferentes *Sus scrofa domesticus* y *Oreochromis niloticus*, con lo que podemos decir que la galletina que contiene es originaria de las especies antes mencionadas.

La segunda muestra analizada es GPO1, al realizarle las pruebas correspondientes, se logró identificar que contiene ADN de Tres especies diferentes *Bos taurus*, *Sus scrofa domesticus* y *Oreochromis niloticus*, con lo que podemos decir que la galletina que contiene es originaria de las especies mencionadas.

Al realizarle las pruebas correspondientes a la tercera muestra analizada que corresponde a GA1, se logró identificar que contiene ADN de dos especies diferentes *Bos taurus* y *Sus scrofa domesticus*, con lo que se puede decir que la galletina que contiene es originaria de estas dos especies.

En la quinta muestra analizada que es GJo1, gracias a las pruebas realizadas, se logró identificar que contiene ADN de *Bos taurus*, con lo que podemos decir que la galletina que contiene es originaria de esa especie.

En las pruebas correspondientes a la sexta muestra analizada que corresponde a GB1, se logró identificar que contiene ADN de dos especies diferentes *Bos taurus* y

Sus scrofa domesticus, con lo que se puede decir que la grenetina que contiene es originaria de estas dos especies.

Al realizarle las pruebas correspondientes a la novena y la décima muestras analizadas que corresponde a GSP1 y GD1, se logró identificar que contienen ADN de la especie Bos taurus, con lo que se puede decir que la grenetina que contienen es originaria de esta especie.

En la décimo quinta muestra analizada que es GJa1, gracias a las pruebas realizadas, se logró identificar que contiene ADN de Sus scrofa domesticus, con lo que podemos decir que la grenetina que contiene es originaria de esa especie.

Con la décimo sexta muestra analizada que corresponde a GCay1, se logró identificar que contiene ADN de la especie Bos taurus, con lo que se puede decir que la grenetina que contiene es originaria de la especie de interés.

En el caso de las muestras analizadas de grenetinas, en la que se logró identificar la especie es GRGE1 que contiene ADN DE sus scrofa lo que nos indica que esta muestra si contiene grenetina de esta especie.

Al realizarle las pruebas correspondientes a las muestras GM1, GPR1, GMK1, GFR1, GCo1, GSa1, GCH1, GRDG1, GRPD1, GRD1 y GRK1 no se logró identificar contenido de ADN de ninguna de las especies esto puede explicarse porque durante el proceso de elaboración de la gelatina y grenetina, las pieles o huesos de los diferentes mamíferos de los cuales se elaboran se someten a diferentes tratamientos ácidos, muchas veces esos tratamientos ocasionan la desnaturalización del ADN, debido a que esta puede ocurrir por exposición de los ácidos nucleicos a agentes químicos o físicos, cambios de pH y enzimas (Salazar Montes, 2013). También podemos justificar que no lográramos encontrar las especies de interés en las muestras al revisar el capítulo 1 del presente estudio, debido a que se puede hacer uso de grenetina de origen vegetal lo que seguiría dentro de la vía de lo legal, porque al revisar las etiquetas de las muestras siguen al pie de la letra la norma al solo mencionar "grenetina" y no especificar el tipo, aunque también esto puede traer consigo algunas complicaciones a la hora de que el consumidor elija el producto debido a que el origen del producto puede generar problemas de índole de salud (alergias) o socioculturales (Religión).

En el siguiente gráfico de pastel se pueden apreciar mejor, la cantidad de gelatinas en las que fue identificado ADN de las especies de estudio vs las gelatinas en las que no identifico su ADN de origen, en ella se puede observar que se registró un mayor número de muestras identificadas.



Figura 51. Cantidad de gelatinas en las que fue identificado ADN de las especies de estudio vs las gelatinas no identificadas.

La figura 52 representa la cantidad de grenetinas en las que fue encontrado ADN de las especies de interés vs las muestras en las que no fue encontrado, se puede apreciar que la mayoría de las grenetinas no fueron identificadas, esto puede deberse a que las grenetinas pueden provenir de alguna otra especie no analizada en esta investigación o al proceso de elaboración de la misma.

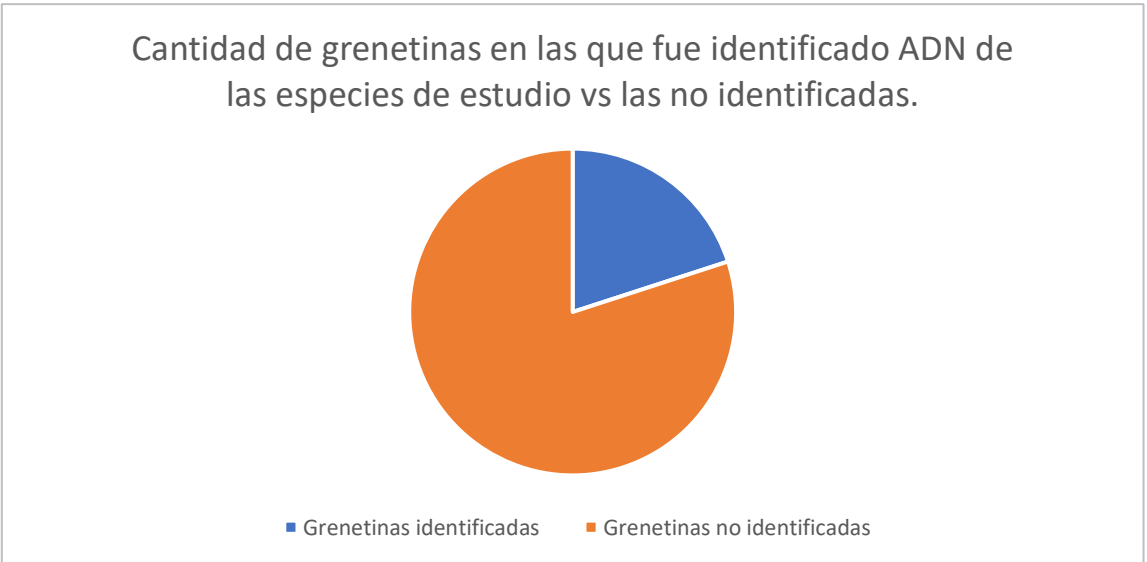


Figura 52. Cantidad de grenetinas en las que fue identificado ADN de las especies de estudio vs las no identificadas.

En la figura 53 se puede apreciar la frecuencia con la que se encontraron las especies de interés en gelatinas comerciales y donde podemos corroborar que las especies que más contienen las gelatinas son *Bos taurus* y *Sus scrofa domesticus* tal y como lo dice la bibliografía.

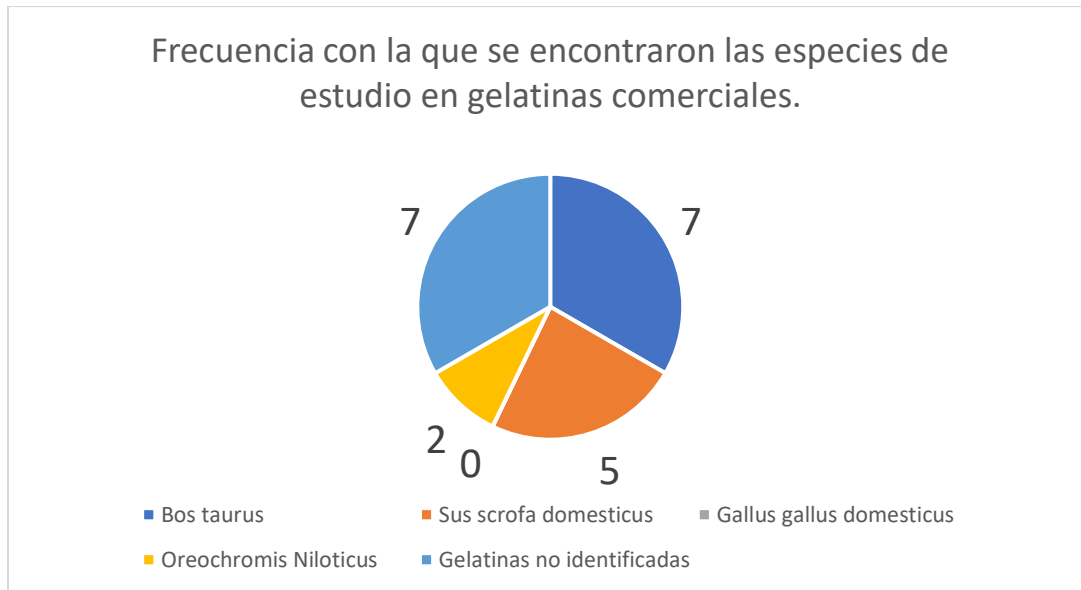
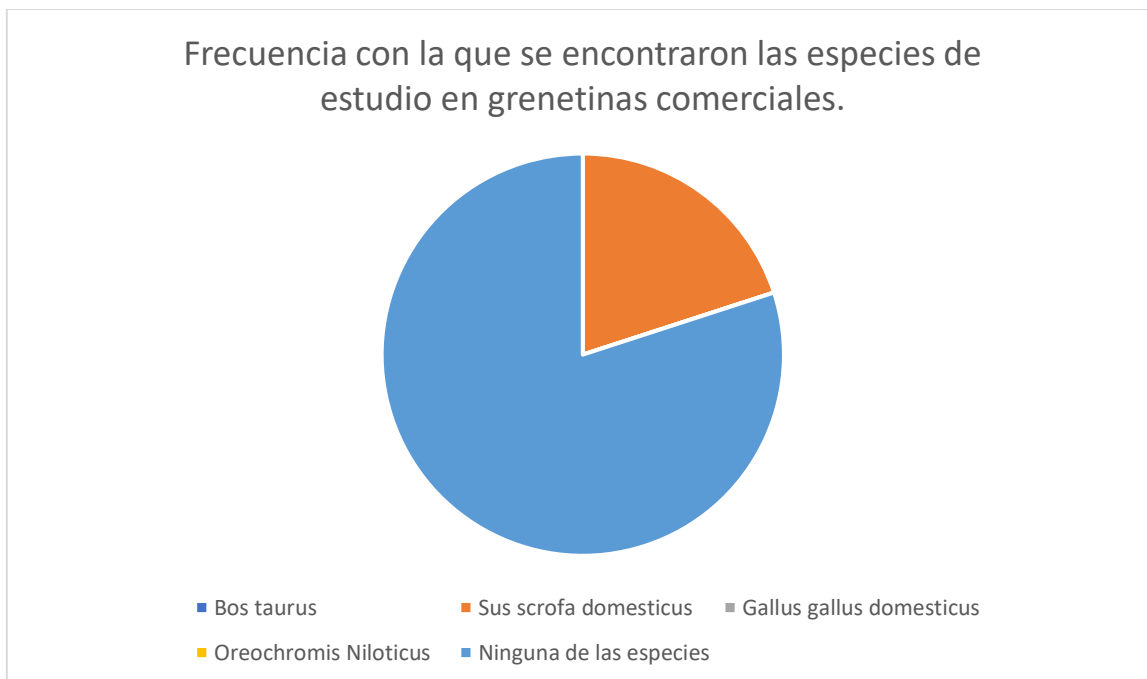


Figura 53. Frecuencia con la que se encontraron las especies de estudio en gelatinas comerciales.

En el caso de las muestras de gernetinas comerciales solo se encontró la especie de *Sus scrofa domesticus* en una de las 5 muestras analizadas.



Conclusiones

La completa consolidación del presente trabajo, fue la investigación en textos que comprendió la identificación de especies en gelatinas comerciales, logrando recabar la información necesaria para fundamentar las bases del proyecto.

El objetivo general se cumplió al lograr detectar el ADN de las especies de estudios en las muestras de gelatinas con ayuda de la técnica PCR.

El objetivo particular uno, demandó el diseño de “primers” para la identificación de las especies de interés en las muestras de gelatinas, se logró cumplir gracias a la revisión de proyectos previos donde se han utilizado “primers” para la identificación de las especies *Sus scrofa domesticus*, *Bos taurus* y *Gallus gallus domesticus* a excepción de la especie *Oreochromis niloticus* estos últimos “primers” se diseñaron mediante el programa bioinformático “Primer quest Tool”.

La obtención de ADN de las muestras de tejido, se logró gracias al uso del método de **Sambrook 2001**, posteriormente se utilizó en la técnica de **PCR punto final** para comprobar la especificidad de los “primers” y logrando amplificar, para su especie respectivamente, cumpliendo así el objetivo particular dos.

El objetivo particular tres, se cumplió al realizar la técnica de PCR directa a las muestras de gelatinas con ayuda de un kit comercial, es importante resaltar que la especificidad y efectividad de la enzima contenida en este, logro demostrar la gran perceptibilidad de la técnica y que con una pequeña porción intacta de ADN en la muestra se compruebo la especie de origen de las gelatinas, también se demuestro que al no estar integro se le dificulta a la enzima la detección y amplificación de las cadenas de ADN.

Los resultados obtenidos, demostraron la efectividad de la técnica PCR en la identificación de especies en productos ultraprocesados, debido a que la mayoría de las muestras contienen *Sus scrofa domesticus* y *Bos taurus*, tal y como lo dicta la bibliografía, algunas muestras minoritarias no contenían ADN por causas ajenas a la experimentación, en otras gelatinas se logró encontrar más de una especie tal es el caso de GG1 y GPO1, lo interesante es que contenían ADN de la especie *Oreochromis niloticus*, es importante decir que la obtención de esta grenetina suele ser más costosa en comparación de las otras especies, e indica que estas gelatinas utilizan una mejor tecnología en su proceso dentro del marco de la legalidad.

Finalmente, es fundamental que se coloque en la etiqueta, el origen de las materias primas que conforman el producto, para que a la hora de que el cliente lo adquiera o consuma, tenga la confianza de que no infringe alguna norma socio-cultural o religiosa, o que no afectara su salud, en el caso de las personas alérgicas. De esta manera se cumplen satisfactoriamente los objetivos planteados en la investigación.

Bibliografía

- Aguilera Segura, M. S. (2016). *Biología molecular y citogenética*. Madrid: Editorial Síntesis.
- Amaral, J. (2016). *Advances in Food Authenticity Testing*. Cambridge: Elsevier.
- Anil, A. (2015). Scurvy in pediatric age group e A disease often forgotten? *ScienceDirect*, 101-107.
- Asencio, L. (2008). Determinación de la autenticidad de los alimentos mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). *Food control*, 1-8.
- Asghar, A., & Henrickson, R. (1982). Características químicas, bioquímicas, funcionales y nutricionales del colágeno en los sistemas alimentarios. *Advances in Food Research*, 231-372.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* (Cuarta edición ed.). México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Beas, C., Ortuño, D., & Armendáriz, J. (2009). *Biología Molecular Fundamentos y Aplicaciones*. México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Bejarano, J., & Suárez, L. (2015). Algunos peligros químicos y nutricionales del consumo de los alimentos de venta en espacios públicos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 349-360.
- Benjakul, S. (2019). *Enciclopedia de química alimentaria*. Hat Yai: Elsevier.
- Cabezas, C., & Hernández, B. (2016). Azúcares adicionados a los alimentos: efectos en la salud y regulación mundial. Revisión de la literatura. *Revista de la Facultad de medicina*, 319-329.
- Cai, H. (2012). Real-time PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules. *Journal of Food Composition and Analysis*, 83-87.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Vacunación y Enfermedades Respiratorias (NCIRD). (12 de diciembre de 2018). *Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Vacunación y Enfermedades Respiratorias (NCIRD)*. Obtenido de <https://espanol.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-virus.htm>
- Cesar, J. (2017). *Detección de especies animales no reportadas en la etiqueta de salchichas comerciales por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tesis para obtener el título de ingeniero en alimentos*. Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Choi, S., & Regenstein, J. (2000). Características fisicoquímicas y sensoriales de la gelatina de pescado. *Revista de ciencia de los alimentos*, 194-199.
- Codex . (21 de 10 de 2021). *Codex class names and the international numbering system for food additives*. Obtenido de codex alimentarius: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B36-1989%252FCXG_036e.pdf
- Coloidales duche . (08 de 11 de 2021). *Coloidales duche*. Obtenido de <http://www.duche.com/conocenos/>
- Cornejo, A., & Serrato, A. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. Distrito federal : INEEC.

- Dalmaso, A. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 81-87.
- Demirhan, Y. (2012). Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products—Halal/Kosher authentication. *Meat Science*, 686-689.
- Du, I. (2016). *Conversion of Avian Collagen to Gelatin and Cryoprotective Peptides. thesis presented to obtain the degree of doctor*. Edmonton: Universidad de Alberta.
- European Food Information Council. (07 de 11 de 2021). *EUFIC*. Obtenido de Carbohidratos: <https://www.eufic.org/es/que-contienen-los-alimentos/categoria/carbohidratos>
- FAO/OMS. (22-26 de Octubre de 2018). Documento de debate sobre la integridad y la autenticidad de alimentos. *Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias*, 1-2. Brisbane, Queensland, Australia: Comisión del Codex Alimentarius.
- Farrugia, C., Farrugia, I., & Groves, M. (1998). Comparación de la distribución del peso molecular de las fracciones de gelatina mediante cromatografía de exclusión por tamaño y dispersión de luz. *Pharm. Pharmacol. Commun*, 559 - 562.
- Fennema, O., & Damodaran, S. (2008). *Fennema Química de los alimentos*. Barcelona: Acribia.
- Fumière, O. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1045-1054.
- Gelatin Manufacturers Institute of America, Inc. (15 de agosto de 2022). *Gelatin Manufacturers Institute of America*. Obtenido de Standard Testing Methods For Edible: http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia_official_methods_2019.pdf
- Gelatine Manufactures of Europe. (26 de 10 de 2022). *Gelatine Manufactures of Europe*. Obtenido de <https://www.gelatine.org/es/aplicaciones/industria-alimentaria.html>
- Gennaro, A. (2003). *remington farmacia*. argentina-mexico: medica panamericana.
- Giaretta, N. (2013). Myoglobin as marker in meat adulteration: A UPLC method for determining the presence of pork meat in raw beef burger. *Food Chemistry*, 1814-1820.
- Gilsenan, P., & Ross, S. (2000). Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 191-195.
- Grand View Research. (2020). Gelatin market estimates and trend analysis. *Grand View Research*, 1-69.
- Grossman, S., & Bergman, M. (1992). *Estados Unidos Patente nº US5093474A*.
- Grupo de Investigacion Ciencias Forences y Salud. (2018). Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa clásica. En L. Gomez, & G. Gomez, *Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas* (págs. 105-115). medellin : PUBLICAR-T.
- Hassan, F., & Osman, I. (2019). *Contemporary Management and Science Issues*. Singapore : Springer.
- Hassan, N., Ahmad, T., & Zain, h. M. (2018). Métodos químicos y quimiométricos para la autenticación halal de gelatina: una descripción general. *Journal of Food Science*, 2903 - 2911.
- Hickman, D. (2000). Cola de pescado / colágeno: desnaturalización y funcionalidad. *Journal of biotechnology*, 245-257.

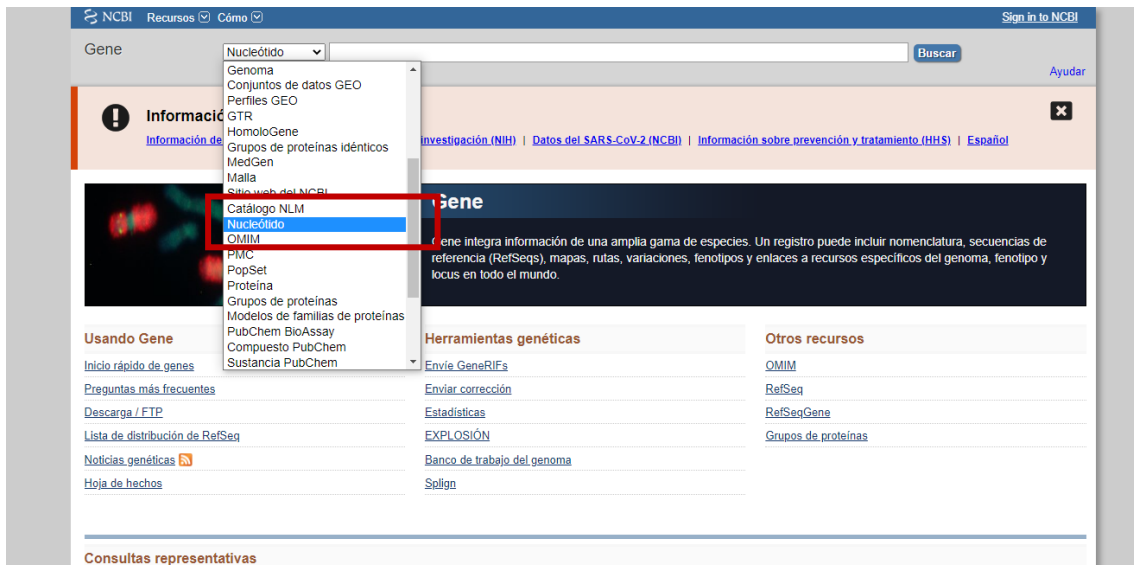
- Holzer, D. (1996). *Estados Unidos Patente nº 5.484.888*.
- INEGI. (21 de 11 de 2021). *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. Obtenido de <https://www.inegi.org.mx/app/indicadores/?tm=0&ind=647748>
- Institute Of Medicine of The Nationals Academies. (2005). Dietary Carbohydrates: Sugar and Starches. En U. S. Agriculture., *Ingestas dietéticas de referencia para energía, carbohidratos, fibra, grasas, ácidos grasos, colesterol, proteínas y aminoácidos* (págs. 265-338). Washington D.C: The Nationals Academies Press.
- Invitrogen. (03 de 11 de 2022). *Thermo Fisher Scientific (Online)*. Obtenido de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals>
- Iwasa, J., & Marshall, W. (2018). *Biología Celular y Molecular*. México : Mc Graw Hill Interamericana editores .
- Jaswir, I. (2016). Optimization of extraction process of plant-based gelatin replacer. *International Food Research Journal*, 2519-2524.
- Jiménez, L., & Merchant, H. (2003). *Biología Celular y molecular*. Edo. de México : Pearson Education.
- Johnston-Banks, F. (1990). Geles de comida. *Elsevier Applied Science Publishers* , 233-289.
- Kamal, S., & Sagadevan, S. (2021). Halal and Kosher gelatin: Applications as well as detection approaches with challenges and prospects. *Food Bioscience*, parte A.
- KamalUddin, S. M. (2021). Halal and Kosher gelatin: Applications as well as detection approaches with challenges and prospects. *Food Bioscience*, 1-14.
- Karim, A., & Bhat, R. (2018). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 644–656.
- Koolman, J. (2012). *Bioquímica Humana*. Madrid: Editorial Medica Panamericana.
- Kuehn, A. (2009). Anaphylaxis provoked by ingestion of marshmallows containing fish gelatin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 708-709.
- Ledward, D. (1986). Propiedades funcionales de las macromoléculas de alimentos . *Elsevier Applied Science Publishers*, 171-201.
- Legislation, E. (22 de Mayo de 2001). *Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council*. Obtenido de <https://www.boe.es/doue/2001/147/L00001-00040.pdf>
- Leuenberger, B. (1991). Investigación de las propiedades de viscosidad y gelificación de diferentes gelatinas de mamíferos y peces. *Hidrocoloides alimentarios, ELSEVIER.*, 353-361.
- Lisker, R., & Zentella, A. (2013). *Introducción a la genética humana*. D.F: El manual moderno.
- Liu, D., Y.K, L., & M.T, C. (2001). Optimun Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and its characteristics. *science on* , 1640.
- López, M. (2009). Las dietas hiperproteicas y sus consecuencias metabólicas. *An Venezolanos de Nutrición*, 95-104.
- Lozano Teruel, J. A. (2005). *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud*. Madrid: Mc Graw Hill.
- Lugo, P. d. (2006). *Estimulación de síntesis de colágeno en cultivos celulares*. Granada: Editorial de la Universidad de Granada.
- Matyjaszewski, K. (2012). *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Amsterdam: Elsevier.

- Montalvo, C., & Lugo, M. (2019). Electroforésis: Fundamentos, avances y aplicaciones. *Epistemus*, 48-54.
- Montero, P., Álvarez, C., Martí, M., & Borderías, A. (1995). Plaice skin collagen extraction and functional properties. *Journal of Food Science*, 1-3.
- Montero, P., Borderías, J., Turnay, J., & Lizarbe, M. (1990). Characterization of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb.) collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 604-609.
- NaKang, S. S. (2018). Development and comparison of a porcine gelatin detection system targeting mitochondrial markers for Halal authentication. *LWT*, 697-702.
- Norland, R. (1990). Avances en tecnología pesquera y biotecnología para aumentar la rentabilidad. *Technomic Publishing Co*, 325-333.
- Nur Hanani, Z. (2016). *Encyclopedia of Food and Health*. Serdang: Elsevier.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (21 de 02 de 2022). FAO. Obtenido de GLOSARIO: <http://www.fao.org/3/am401s/am401s07.pdf>
- Phillips, G. (2021). *Handbook of Hydrocolloids (Third Edition)*. Cambridge: Elsevier.
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. (2016). Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*, 58-69.
- Regenstein, J., & Zhou, P. (2007). *Collagen and gelatin from marine by-products*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Renneberg, R. (2008). *Biotecnología para principiantes*. Barcelona: Reverté.
- Roblero Domínguez, A. (2019). *Determinación de aculturación con especies Gallus gallus domesticus, Sus scrofa domesticus y Bos taurus en embutidos de pavo mediante PCR. Tesis para obtener el título de ingeniero en alimentos*. Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Saddler, J., & Horsey, P. (1987). Las gelatinas de nueva generación. Una revisión de su historia, fabricación y propiedades. *Anestesiología*, 998-1004.
- Salazar Montes, A. (2013). *Biología Molecular*. México D.F: Mc Graw Hill education.
- Sambrook, J., & Russell, d. (2001). *Clonación molecular: un manual de laboratorio*. 3.^a edición, vol. 1, . Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez Mendoza, A. E. (2011). *Desarrollo de un protocolo para identificar la presencia de carne de pollo (Gallus gallus domesticus),cerdo (Sus scrofa domesticus) y soya (Glycine max) en hamburguesas comerciales, mediante la aplicacion de la tecnica de PCR múltiple*. Tesis licenciatura. Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez Mendoza, A. E. (2021). *Estudio de la influencia de polimorfismos sobre fenotipos asociados a la terneza de carne en las subespecies Bos taurus, Bos indicus Y Bos taurus x Bos indicus*. Tesis doctoral. CUAUTITLÁN IZCALLI: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez, A. (23 de febrero de 2021). *El financiero*. Obtenido de <https://www.elfinanciero.com.mx/empresas/covid-impulsa-record-historico-en-produccion-de-grenetina-en-mexico/>
- Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Secretaria de comercio y Fomento industrial. (1983). *NMX-F-041-1983, ALIMENTOS - POSTRE DE GELATINA DE SABORES* . Naucalpan de Juárez: DIRECCION GENERAL DE NORMAS.

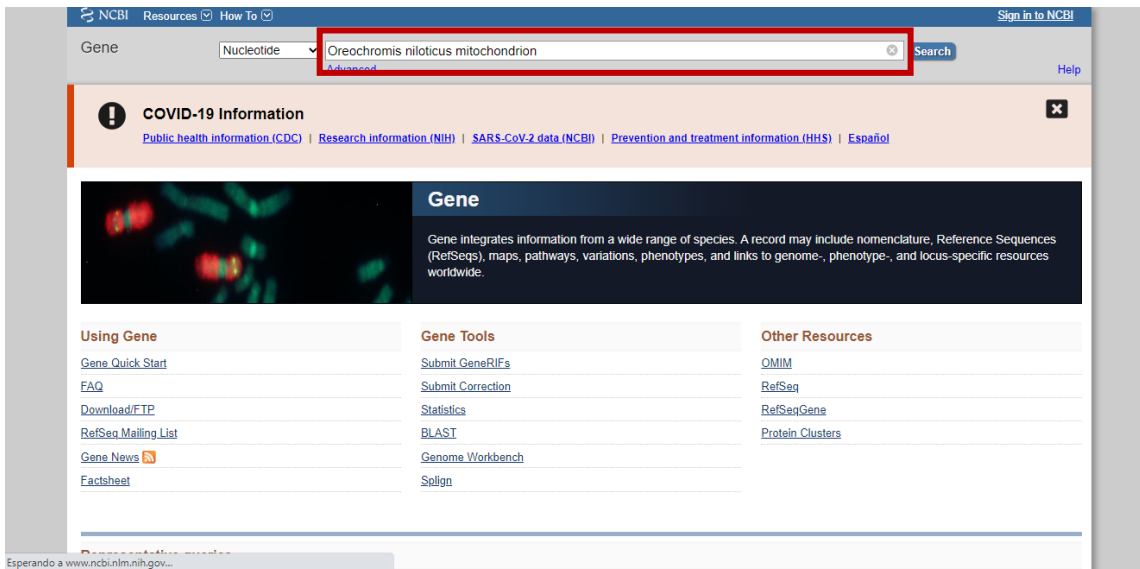
- Shabani, H. (2015). Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. *Food Chemistry*, 203-206.
- Stainsby, G. (1987). Avances en la investigación de la carne. *Van Nostrand Reinhold Company Inc*, 209-222.
- Stephen, A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications*. Boca raton : Taylor & Francis Group.
- Sudjadi, W. H. (2016). Analysis of Porcine Gelatin DNA in a Commercial Capsule Shell Using Real-Time Polymerase Chain Reaction for Halal Autentication. *International Journal of Food Properties*, 2127-2134.
- Sultana, S. (2020). TaqMan probe based multiplex quantitative PCR assay for determittion of bovine, porcine and fich DNA ing gelatin admixture , food products and dietary supplements. *Food chemestry*, 1-7.
- Thieman, W. (2010). *Introducción a la biotecnología*. Madrid: Pearson educación.
- Tribunales, A. (1954). Los residuos de aminoácidos N-terminales de la gelatina: 2. Degradación térmica. *Biochemical Journal*, 74-79.
- Tridge. (27 de 11 de 2021). *Tridge*. Obtenido de Jelly: <https://www.tridge.com/intelligences/jelly/export>
- Tuna, B., & Aarstad, O. (2022). Long-term storage stability of type A and type B gelatin gels: The effect of Bloom strength and co-solutes. *Food Hydrocolloids*, 1-10.
- Umoren, S. (2022). *Polymeric Materials in Corrosion Inhibition*. Amsterdam: Elsevier.
- Upcroft, P., & Upcroft, J. (1993). Comparison of properties of agarose for electrophoresis of DNA. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 79-93.
- Valle, P., & Lucas, B. (2000). *Toxicología de alimentos* . México: Instituto Nacional de Salud Publica, Centro Nacional de Salud Ambiental.
- Velásquez, G. (2006). *Fundamentos de alimentación saludable*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Wasswa, J., Tang, J., & Gu, X. (2007). Utilization of Fish Processing By Products in the Gelatin Industry. *Food Reviews International*, 159-174.

Anexos Diseño de primers de *Oreochromis Niloticus*

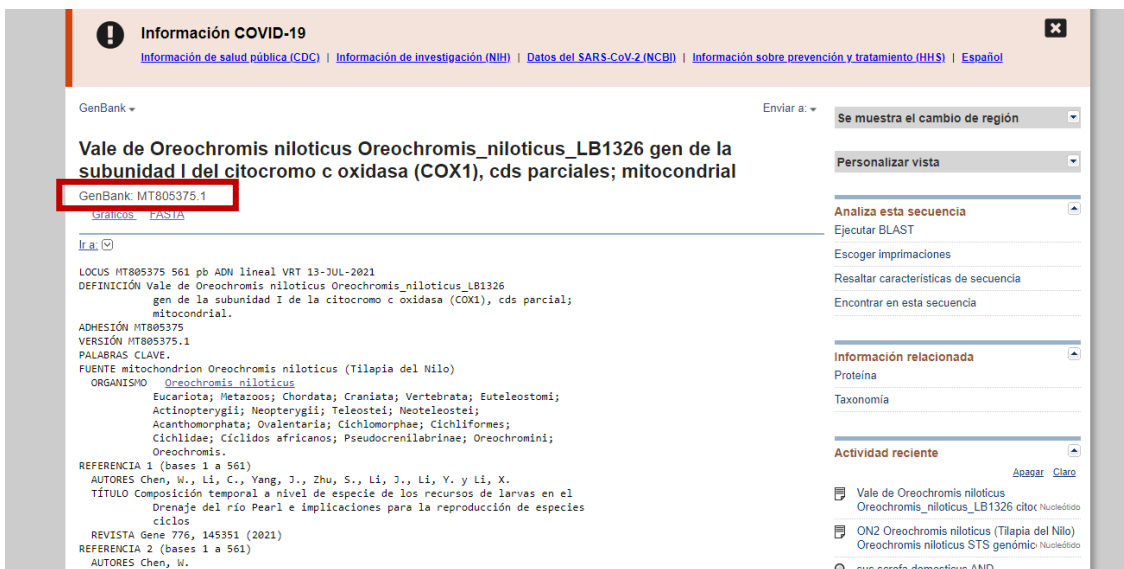
Paso 1. Con ayuda de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), nos ubicaremos en su página y en el apartado donde dice gene, desplegaremos las opciones y seleccionaremos nucleótido



Paso 2. En el apartado de búsqueda vamos a colocar el nombre científico de la especie de la que deseamos encontrar su secuencia, en este caso se buscó *Oreochromis Niloticus* específicamente mitocondria.



Paso 3. De las secuencias de datos que obtuvimos, elegimos una mayor a 200 pb para su posterior uso, de donde obtendremos el gen back que contiene la secuencia que ocuparemos en pasos posteriores.



Paso 4. Con ayuda del programa Primer Quest Tool, que es un programa que nos facilitara y ayudara a diseñar nuestros primers. Introducimos el genback obtenido en el anterior paso.

PrimerQuest Tool
 ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT
Sequence Entry
 Enter sequence(s) manually
 Download sequence(s) using Genbank or Accession ID
 Upload sequences in an Excel file
Choose Your Design
 PCR 2 Primers qPCR 2 Primers + Probe qPCR 2 Primers Intercalating Dyes SHOW CUSTOM DESIGN PARAMETERS

Herramienta PrimerQuest
 DISEÑO DE ENSAYO RESULTADOS AYUDAR SOBRE
Entrada de secuencia
 Ingrese la (s) secuencia (s) manualmente
 Descargar secuencia (s) usando Genbank o ID de acceso
 N.º de identificación NCBI: OBTENER SECUENCIA

```

ATTGGGGCAGAATAAGCCAGCCGGCTCTCTCTCGGAGACGACCAATCTATAATGTAATTGTTACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTCTT
TATAGTAATACCAATATGATTGGAGGCTTTGGAACTGACTAGTACCCCTCATGATTGGTGACCGACATGGCTTCCCTCGAATAAATAACA
TGAGCTTTTGACTTCTCCCCCTCATTCTCTCTCTCGCTCATCTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CGCTCGCAGGCAATCTTGGCCACGCTGGACCTTCTGTTGACTTAACCATCTTCTCCCTCCACTTGGCCGGAGTGTGCATATTTAGGTGCAAT
TAATTTTATCACAACCATTTAACATGAACCCCTGCCATCTCCCAATATCAACACCCCTATTTGTGTGATCCGTCCTAATACCGCAGTACTA
CTCCTTCTATCCCTGGCCGTTCTTCCGCGGCGATCACAATAGTTCTAACAGACCAGAACTAAACACAACCTTTTGAACCTGGCC

```

 Sugerencias

- Ingrese Genbank o ID de acceso
- NM_001111 o 301601652
- Separados por comas para lotes
- NM_001234, 301601652
- La longitud de la secuencia debe ser superior a 80 bases
- PrimerQuest acepta solo bases de ácido nucleico

 Nombre de secuencia: BORRAR ENTRADA DE SECUENCIA
 Cargar secuencias en un archivo de Excel
Elija su diseño

Paso 5. Después de que ya está la secuencia en el programa, vamos a dar clic en la opción de PCR 2 primers.

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

Sequence Entry

Enter sequence(s) manually

Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

NCBI ID# GET SEQUENCE

```
>ACC# MT805375.1
ATTCCGGGCAGAACTAAGCCAGCCCGGCTCTCTCCGGAGACGACCAATCTATAATGTAATTGTTACAGCACATGCTTCGTAATAATTTTC
TTTAAAGTATACCAATATGATTGGAGGCTTTGGAACTGACTAGTACCCCTCATGATTGGTGACCCGGACATGGCCCTTCCTCGAATAAAT
AACATGAGCTTTTGAATTTGCCCGCCCTCATTTCTTCTGTGGGCTCATCTGGAGTCCGAAGCAGAGTCCCGGCACAGAGGATGGACTGTTT
ATCCCGCCGCTCGCAGGCAACTTGGCCAGCTGGACCTTCTGTTGACTTAACCATCTTCCCTCCACTTGGCCGGAGTGTCTATTTTA
GGTGCAATTAATTTATCACAACTATTAAACATGAAACCCCTGCCATCTCCAATATCAAACCCCTATTGTGTGATCCGCTCCTAATTAC
CGCAGTACTACTCTCTATCCCTGCCCGCTTGGCCCGGCATCACAACTTCTAACAGACCGAAACTAAACACAACTTCTTTTGACC
CTGCC
```

Sequence Name CLEAR SEQUENCE ENTRY

Upload sequences in an Excel file

Choose Your Design

PCR 2 Primers qPCR 2 Primers + Probe qPCR 2 Primers Intercalating Dyes SHOW CUSTOM DESIGN PARAMETERS

Paso 6. Con el anterior paso la pantalla hará una transición a esta otra, donde encontraremos 5 conjuntos de primers que podremos revisar y descubrir cual es el que amplifica para la especie que buscamos.

Herramienta PrimerQuest

DISERNO DE ENSAYO RESULTADOS AYUDAR SOBRE

Ubicaciones de los equipos de ensayo para ACC # MT805375.1

AGREGAR A LA ORDEN DESCARGAR ENSAYOS PERSONALIZAR EL DISEÑO DEL ENSAYO MOSTRAR REGIONES DE DESTINO PERSONALIZADAS

Conjunto 1 ACC # MT805375.1

Longitud del amplicón: 210
Ver detalles del ensayo

| | Comienzo | Parada | Largo | Tm | GC% |
|----------------|----------|--------|-------|----|------|
| Hacia adelante | 348 | 368 | 20 | 62 | 50 |
| Marcha atrás | 535 | 558 | 23 | 62 | 43,5 |

Conjunto 2 ACC # MT805375.1

Conjunto 2 ACC # MT805375.1

Longitud del amplicón: 327
Ver detalles del ensayo

| | Comienzo | Parada | Largo | Tm | GC% |
|----------------|----------|--------|-------|----|-----|
| Hacia adelante | 165 | 185 | 20 | 62 | 50 |
| Marcha atrás | 470 | 492 | 22 | 62 | 50 |

Conjunto 3 ACC # MT805375.1

Longitud del amplicón: 228
Ver detalles del ensayo

| | Comienzo | Parada | Largo | Tm | GC% |
|----------------|----------|--------|-------|----|------|
| Hacia adelante | 118 | 139 | 21 | 62 | 47,6 |
| Marcha atrás | 324 | 346 | 22 | 62 | 50 |

Conjunto 4 ACC # MT805375.1

Longitud del amplicón: 209
Ver detalles del ensayo

| | Comienzo | Parada | Largo | Tm | GC% |
|----------------|----------|--------|-------|----|------|
| Hacia adelante | 33 | 54 | 21 | 62 | 47,6 |
| Marcha atrás | 220 | 242 | 22 | 62 | 50 |

Conjunto 5 ACC # MT805375.1

Longitud del amplicón: 202
Ver detalles del ensayo

| | Comienzo | Parada | Largo | Tm | GC% |
|----------------|----------|--------|-------|----|------|
| Hacia adelante | 259 | 279 | 20 | 62 | 50 |
| Marcha atrás | 438 | 461 | 23 | 62 | 43,5 |

AGREGAR A LA ORDEN

EMPRESA

- Carreras
- Sustentabilidad
- Noticias
- Eventos
- Contáctenos

PRODUCTOS

- Soluciones COVID-19
- ADN y ARN
- Edición del genoma CRISPR
- Secuenciación de próxima generación
- Genes y fragmentos de genes
- qPCR y PCR
- Genómica funcional
- Reactivos y kits
- GMP, OEM e integraciones
- Servicios opcionales
- Clonación LDT

APOYO

- Guías de usuario y protocolos
- Hojas de datos de seguridad
- Preguntas frecuentes
- Información del proveedor
- Contáctenos

EDUCACIÓN

- DESCIFRADO
- Seminarios web y tutoriales en vídeo

INSTRUMENTOS

- Herramienta OligoAnalyzer
- Entrada de oligo de ADN
- Herramienta PrimerQuest
- Entrada de fragmentos genéticos gBlocks
- UNAFold
- Herramienta de optimización de codones
- Todas las herramientas

Paso 7. Cuando elegimos la opción más adecuada daremos clic en la opción blast para el primer frontal, lo que nos trasladara a una nueva ventana de la NCBI, donde encontraremos una lista de secuencias que pertenecen a una especie en específico.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS
HELP ABOUT

ACC# MT805375.1 Assay Set 4 Details

BACK TO RESULTS

Parameter Set: General PCR (Primers only)
 Sequence Name: ACC# MT805375.1
 Amplicon Length: 209

| | | Start | Stop | Length | Tm | GC% |
|---------|--|-------|------|--------|----|------|
| Forward | TCTCGGAGACGACCAATCTA (Sense) Hairpin Blast | 33 | 54 | 21 | 62 | 47.6 |
| Reverse | CAGATGAGCGAGAAGAAG (AntiSense) | 220 | 242 | 22 | 62 | 50 |

| Base | Sequence |
|------|---|
| 1 | ATTCGGGCGAAGCTAAGCCAGCCCGGCTCTCTCTCTCGGAGACGACCAATCTAATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTCGTAAATAATTTCTTATAG |
| 101 | TAATACCAATTATGATTGGAGGCTTTGGAAACTGACTAGTACCCCTCATGATTGGTGACCGGACATGGCCCTCCCTCGAATAAATAACATGAGCCTTTG |
| 201 | ACTTCTCCCCCTCATTCTCTCTCTCTCGGCTCATCTGAGTCTGAAGCAGGTGCCGGCACAGGATGGACTGTTTATCCCCCGCTCGCAGGCAATCTT |
| 301 | GCCACGGTGAACCTCTTCTGACTTAACCATCTCTCCCTCCACTTGGCCGAGTGTCACTATTTAGGTGCAATTAATTTATCACAACCATATTA |
| 401 | ACATGAACCCCTGCCATCTCCCAATATCAACAGCCCTATTTGGTATCCGTCTAATACCCGCACTACTCTCTATCCCTGCCCTTCTTTC |
| 501 | CGCCGGCATCAAACTACTTCTAACAGACCCGAACCTTAACACACCTTCTTTGACCCCTGCC |

Paso 8. La pantalla de NCBI es la siguiente, ahí mismo encontraremos un botón en a parte de abajo al cual le daremos clic para acceder a listas de secuencias.

U.S. National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information
Log in

BLAST® >> blastn suite
Home Recent Results Saved Strategies Help

blastn
blastp
blastx
tblastn
tblastx
Standard Nucleotide BLAST

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

Enter Query Sequence
Reset page
Bookmark

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

TCTCGGAGACGACCAATCTA

Or, upload file Seleccionar archivo | Ningún archivo seleccionado

Job Title

Align two or more sequences

Query subrange

From

To

New columns added to the Description Table

Click 'Select Columns' or 'Manage Columns'.

Choose Search Set

Database Standard databases (nr etc.): rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism exclude [Add organism](#)

Exclude Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to Sequences from type material

Or, upload file To

Seleccionar archivo | Ningún archivo seleccionado ?

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search ?

Align two or more sequences ?

Choose Search Set

Database Standard databases (nr etc.): rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism exclude

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown ?

Exclude Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to Sequences from type material

Entrez Query [YouTube](#) [Create custom database](#)

Enter an Entrez query to limit search ?

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast) More dissimilar sequences (discontiguous megablast) Somewhat similar sequences (blastn) Choose a BLAST algorithm ?

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences) Show results in a new window

Y la pantalla que obtendremos será la siguiente: Blast frontal.

NIH Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU. Centro Nacional de Información Biotecnológica [Iniciar sesión](#)

BLAST® » suite blastn » resultados para RID-P8ZUWA4D016 [Hogar](#) [Resultados recientes](#) [Estrategias guardadas](#) [Ayudar](#)

[< Editar búsqueda](#) [Guardar búsqueda](#) [Resumen de búsqueda](#)

[¿Cómo leer este informe?](#) [Vídeos de ayuda de BLAST](#) [Volver a la página de resultados tradicional](#)

! Sus parámetros de búsqueda se ajustaron para buscar una secuencia de entrada corta.

| | |
|-------------------------|--|
| Título profesional | Secuencia de nucleótidos |
| DESHACERSE | P8ZUWA4D016 La búsqueda vence el 10-13 02:15 am Descargar todo |
| Programa | BLASTN Citación |
| Base de datos | Nuevo Testamento Ver detalles |
| ID de consulta | Idl Query_60751 |
| Descripción | Ninguno |
| Tipo de molécula | ácido nucleico |
| Longitud de la consulta | 21 |
| Otros | Árbol de distancia de resultados Visor de MSA |

Filtrar Resultados

Organismo solo aparecerán los 20 primeros excluir

[+ Agregar organismo](#)

Porcentaje de identidad Valor E para para

Cobertura de consultas para

[Realimentación](#)

Secuencias que producen alineaciones significativas

[Descargar](#)
Nuevo
[Seleccionar columnas](#)
Show

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas







[GenBank](#)
[Gráficos](#)
[Árbol de resultados de distancia](#)
Nuevo
[Visor de MSA](#)

| Descripción | Nombre científico | Maximo puntaje | Puntaje total | Cubierta de consulta | Valor E | Por. Ident | Acc. Len | Adhesión |
|--|-------------------|----------------|---------------|----------------------|---------|------------|----------|--------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 3Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854609 LC648886.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus gen COX1 mitocondrial 13Gar para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854607 LC648885.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 14Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854605 LC648884.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 8Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854603 LC648883.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 14Epr gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854601 LC648882.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 5 Para el gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854599 LC648881.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 50Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854597 LC648880.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 16Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854595 LC648879.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 10Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854593 LC648878.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 19 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854591 LC648877.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 31 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854589 LC648876.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 8Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854587 LC648875.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 22Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854585 LC648874.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 46Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854583 LC648873.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 28Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854581 LC648872.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 40Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854579 LC648871.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 17Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854577 LC648870.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 14Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854575 LC648869.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 4Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854573 LC648868.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 1Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854571 LC648867.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Gen COX1 mitocondrial de Oreochromis niloticus 4Gar1 para la subunidad 1 de la citocromo... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 580 | gi 2089854569 LC648866.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 18Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854567 LC648865.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 13Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854565 LC648864.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 13Epr gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854563 LC648863.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 2 Para el gen COX1 mitocondrial de la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854561 LC648862.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 1 Para el gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854559 LC648861.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 36 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854557 LC648860.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 29Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854555 LC648859.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 6 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854553 LC648858.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 39 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854551 LC648857.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 5Bek1 gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854549 LC648856.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 3Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854547 LC648855.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 2Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854545 LC648854.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 1 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854543 LC648853.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 54Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854541 LC648852.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 51Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854539 LC648851.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 53Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854537 LC648850.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Oreochromis niloticus 21Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854535 LC648849.1 |

Realimentación


Realimentación

| | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|------------------|------|------|------|------|---------|-----|------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 5 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854441 LC648802.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 41Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854439 LC648801.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 11 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854437 LC648800.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 9Bek gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854435 LC648799.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 4Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854433 LC648798.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 94Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854431 LC648797.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 44Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854429 LC648796.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 43Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854427 LC648795.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 29Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854425 LC648794.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 55Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854423 LC648793.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 48Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854421 LC648792.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 49Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854419 LC648791.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 39Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854417 LC648790.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 37Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854415 LC648789.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus gen COX1 mitocondrial 23Dah para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854413 LC648788.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 19Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c ... | Oreochromis n... | 42,1 | 42,1 | 100% | 0,23 | 100,00% | 581 | gi 2089854411 LC648787.1 |







Blog
?
Centro de Apoyo
Realimentación

Paso 9. Repetimos los pasos 6, 7y 8 para poder obtener el blast reverse.

Blast reverse


Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU.
Centro Nacional de Información Biotecnológica
Iniciar sesión

BLAST® >> suite blastn
Hogar Resultados recientes Estrategias guardadas Ayudar

blastn
blastp
blastx
tblastn
tblastx
BLAST de nucleótidos estándar

Los programas BLASTN buscan bases de datos de nucleótidos utilizando una consulta de nucleótidos. [más...](#)

Restablecer página
Marcador

Ingresar secuencia de consulta

Ingrese el (los) número (s) de acceso, gi (s) o secuencia (s) FASTA ? Claro Subrango de consultas ?

De

Para

O sube el archivo Seleccionar archivo Ningún archivo seleccionado ?

Título profesional

Ingrese un título descriptivo para su búsqueda BLAST ?

Alinear dos o más secuencias ?

Elegir conjunto de búsqueda

Base de datos Bases de datos estándar (nr, etc.) Bases de datos de ARNr / ITS Bases de datos de transcripciones genómicas Betacoronavirus

Organismo Recolección de nucleótidos (nr / nt) ?

Organismo Opcional excluir Añadir organismo

Excluir Opcional Modelos (XM / XP) Secuencias de muestras ambientales / sin cultivar

Nuevas columnas agregadas a la tabla de descripción

Haga clic en "Seleccionar columnas" o "Administrar columnas".

[< Editar búsqueda](#) [Guardar búsqueda](#) [Resumen de búsqueda v](#)

[¿Cómo leer este informe?](#) [Vídeos de ayuda de BLAST](#) [Volver a la página de resultados tradicional](#)

i Sus parámetros de búsqueda se ajustaron para buscar una secuencia de entrada corta.

Título profesional
DESHACERSE [P90FH5AE013](#) *La búsqueda vence el 10-13 02:26 am*
[Descargar todo v](#)

Programa BLASTN [Citación v](#)

Base de datos Nuevo Testamento [Ver detalles v](#)

ID de consulta lcl | Query_62177

Descripción Ninguno

Tipo de molécula ácido nucleico

Longitud de la consulta 22

Otros informes [Árbol de distancia de resultados](#) [Visor de MSA](#) [?](#)

Filtrar Resultados

Organismo solo aparecerán los 20 primeros **excluir**

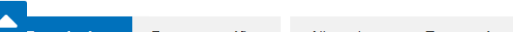
Escriba el nombre común, binomio, taxid o nombre de grupo

[+ Agregar organismo](#)

Porcentaje de identidad Valor E para para

Cobertura de consultas para

Filtrar **Reiniciar**



[Realimentación](#)

Descripciones Resumen gráfico Alineaciones Taxonomía

Secuencias que producen alineaciones significativas [Descargar v](#) [Nuevo](#) [Seleccionar columnas v](#) Show [?](#)

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas [GenBank](#) [Gráficos](#) [Árbol de resultados de distancia](#) [Nuevo](#) [Visor de MSA](#)

| | Descripción | Nombre científico | Maximo puntaje | Puntaje total | Cubierta de consulta | Valor E | Por. Ident | Acc. Len | Adhesión |
|-------------------------------------|---|-------------------|----------------|---------------|----------------------|---------|------------|----------|------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 3Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c ox... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854609 LC648886.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus gen COX1 mitocondrial 13Gar para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854607 LC648885.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 14Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854605 LC648884.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 8Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c ox... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854603 LC648883.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 14Epr gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854601 LC648882.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 5 Para el gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854599 LC648881.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 50Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854597 LC648880.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 16Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854595 LC648879.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 10Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854593 LC648878.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 19 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854591 LC648877.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 31 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854589 LC648876.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 8Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854587 LC648875.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 22Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854585 LC648874.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 46Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854583 LC648873.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 28Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854581 LC648872.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 40Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854579 LC648871.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 17Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854577 LC648870.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 14Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854575 LC648869.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 4Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854573 LC648868.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 1Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854571 LC648867.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Gen COX1 mitocondrial de Oreochromis niloticus 4Gar1 para la subunidad 1 de la citocrom... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 580 | gi 2089854569 LC648866.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 18Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854567 LC648865.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 13Tos gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854565 LC648864.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 13Epr gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854563 LC648863.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 2 Para el gen COX1 mitocondrial de la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854561 LC648862.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 1 Para el gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854559 LC648861.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 36 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854557 LC648860.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 29Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854555 LC648859.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 6 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854553 LC648858.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 39 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854551 LC648857.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 5Bek1 gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854549 LC648856.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 3Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854547 LC648855.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 2Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854545 LC648854.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 1 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854543 LC648853.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 54Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854541 LC648852.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 51Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854539 LC648851.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 53Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854537 LC648850.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 21Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854535 LC648849.1 |



[Realimentación](#)

| | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|------------------|------|------|------|-------|---------|-----|------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 7Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854443 LC648803.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 5 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854441 LC648802.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 41Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854439 LC648801.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 11 Gen COX1 mitocondrial Bek para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854437 LC648800.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 9Bek gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854435 LC648799.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 4Bek gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c o... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854433 LC648798.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 94Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854431 LC648797.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 44Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854429 LC648796.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 43Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854427 LC648795.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 29Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854425 LC648794.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 55Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854423 LC648793.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 48Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854421 LC648792.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 49Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854419 LC648791.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 39Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854417 LC648790.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 37Dah gen mitocondrial COX1 para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854415 LC648789.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus gen COX1 mitocondrial 23Dah para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854413 LC648788.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oreochromis niloticus 19Dah gen COX1 mitocondrial para la subunidad 1 de la citocromo c... | Oreochromis n... | 44,1 | 44,1 | 100% | 0,058 | 100,00% | 581 | gi 2089854411 LC648787.1 |

