



**Universidad Nacional
Autónoma de México**

**Facultad de Estudios
Superiores Cuautitlán**

AUTENTIFICACIÓN DE BACALAO (*Gadus morhua*) DE DISTINTOS PRODUCTOS DE INTERÉS COMERCIAL EN MÉXICO POR MEDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE REGIONES ESPECÍFICAS DEL GEN CITOCROMO b (*cyt b*) LOCALIZADAS EN EL ADN MITOCONDRIAL, POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MARIO ALBERTO BANDA PIÑA

ASESORES:

DR. JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA

Director de tesis

DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

Asesora

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Índice de figuras	iv
Índice de Tablas	v
Presentación del trabajo	vi
Resumen	vii
Terminología	viii
Introducción	ix
Capítulo 1. Generalidades	1
1.1 Definición de pescado	1
1.2 Clasificación del bacalao	1
1.3 Características del bacalao	2
1.3.1 Desove y crecimiento	3
1.3.2 Pesca	5
1.3.3 Productos	6
1.3.4 Producción	6
1.4 Valor nutritivo y calidad del bacalao	7
1.4.1 Composición química	7
1.4.1.1 Agua	7
1.4.1.2 Proteínas	8
1.4.1.3 Carbohidratos	9
1.4.1.4 Lípidos	9
1.4.1.5 Vitaminas	10
1.4.1.6 Minerales	10

1.4.2 Criterios de calidad	11
1.4.3 Deterioro microbiológico en pescado salado	11
1.5 Tecnología y procesado del bacalao	13
1.5.1 Conservación por salado y secado	13
1.5.1.1 Secado	13
1.5.1.2 Salazón	14
1.5.1.3 Normatividad del bacalao salado y secado	15
1.5.2 Bacalao enlatado	16
1.5.2.1 Normatividad del bacalao enlatado y procesado térmicamente	16
1.6 Importaciones de bacalao	17
1.7 Especies marinas con las que se puede adulterar el bacalao	18
1.8 Autenticación e importancia del etiquetado	23
Capítulo 2. Aplicaciones biotecnológicas en la autenticación de alimentos.	29
Reacción en cadena de la polimerasa (RCP ó PCR)	
2.1 Métodos para la autenticación de alimentos	29
2.1.1 Métodos de identificación de especies de pescado	29
2.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
2.1.3 Análisis de proteínas	34
2.1.4 Análisis de DNA	36
2.1.4.1 Hibridación de DNA	36
2.2 Descripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
2.2.1 Fundamento de la técnica de PCR	37
2.2.2 Etapas de la reacción	38
2.2.2.1 Desnaturalización	38

2.2.2.2 Hibridación	40
2.2.2.3 Elongación (Replicación)	40
2.2.3 Componentes de la reacción	42
2.2.3.1 Oligonucleótidos	42
2.2.3.2 DNA polimerasa termoestable	43
2.2.3.3 Desoxynucleotidos trifosfatos (dNTP's) en exceso	44
2.2.3.4 Cationes divalentes	44
2.2.3.5 DNA diana	44
2.2.4 Análisis del producto de PCR	45
2.2.4.1 Primers específicos en las especies	45
2.2.4.2 RAPD (Random Amplified polymorphic DNA)	46
2.2.4.3 Secuenciación de los productos de PCR	47
2.2.4.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	47
2.2.4.5 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)	52
Capítulo 3 Metodología Experimental	52
3.1 Cuadro metodológico	53
3.1.1 Descripción de cuadro metodológico	53
3.2 Materiales	55
3.2.1 Material Biológico	55
3.2.2 Reactivos y productos biológicos	57
3.2.3 Equipo utilizado	59
3.3 Métodos	59
3.3.1 Extracción de DNA total a partir de tejido muscular	60
3.3.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia a 260 nm	61

3.3.3 Amplificación de DNA	63
3.3.3.1 Preparación de la reacción	63
3.3.3.2 Etapas y ciclos de la reacción	64
3.3.4 Análisis de productos	65
3.3.4.1 Preparación del gel de agarosa	65
3.3.4.2 Electroforesis horizontal	66
3.3.4.3 Fotografías de los geles	67
3.3.5 Purificación de DNA	68
Capítulo 4. Resultados y discusión	69
4.1 Diseño y selección de primers	69
4.2 Evaluación experimental de los primers	71
4.2.1 Grupo 1. Especies lejanas filogenéticamente	71
4.2.2 Grupo 2. Especies marinas lejanas filogenéticamente	72
4.2.3 Grupo 3. Tipos distintos de bacalao comercial	73
4.3 Planteamiento del protocolo de autenticación	75
4.4 Autenticación de productos de bacalao	75
4.5 Desarrollo de protocolo para RFLP	76
Capítulo 5. Recomendaciones	78
Referencias citadas	80
Anexos	86

Indice de figuras

Figura 1.1 Bacalao	1
Figura 1.2 Secado del bacalao	13
Figura 1.3 Salazón en seco del bacalao	14
Figura 1.4 Melan	18
Figura 1.5 Molva	20
Figura 1.6 Carbonero	21
Figura 1.7 Abadejo	22
Figura 1.8 Eglefino	23
Figura 1.9 Modelo de etiquetado	26
Figura 2.1 Representación del DNA mitocondrial	32
Figura 2.2 Representación del mecanismo de la PCR	39
Figura 2.3 DNA resultante en el transcurso de los ciclos	41
Figura 2.4 Análisis electroforetico para productos de PCR que utilizaron primers específicos	46
Figura 2.5 Perfil electroforetico de un gel con muestra digeridas utilizando enzimas de restricción	50
Figura 3.1 Cuadro metodológico	53
Figura 3.2 Esquematización del programa utilizado en el termociclador	64
Figura 3.3 Fotografía de geles por iluminación UV	68
Figura 4.1 Ejemplo de genoma mitocondrial	69
Figura 4.2 Especies lejanas filogenéticamente	72
Figura 4.3 Especies marinas filogenéticamente distantes	73
Figura 4.4 Tipos distintos de bacalao comercial	74

Indice de tablas

Tabla 1.1	Diferentes clases de pescado de acuerdo a su calidad	2
Tabla 1.2	Composición del bacalao	7
Tabla 1.3	Contenido de proteínas de bacalao	8
Tabla 1.4	Aminoácidos esenciales en las proteínas del bacalao en g/100g de proteína	8
Tabla 1.5	Vitaminas de la parte comestible del pescado	10
Tabla 1.6	Minerales del músculo de pescado	10
Tabla 1.7	Volumen y valor de las importaciones de bacalao por presentación y país de origen	17
Tabla 1.8	Comparación entre métodos de análisis de proteínas y los métodos genéticos para identificación de especies de pescado	30
Tabla 2.1	Diseño de primers: propiedades de los oligonucleotidos que influyen la eficiencia de amplificación	43
Tabla 2.2	Secuencias de conocimiento de algunas enzimas de restricción	48
Tabla 3.1	Muestras frescas y procesadas	55
Tabla 3.2	Muestras procesadas	56
Tabla 3.3	Componentes de la PCR, preparación de los ensayos	63
Tabla 3.4	Componentes de un gel de agarosa para electroforesis	65
Tabla 3.5	Volumen de los componentes utilizados en la electroforesis	66
Tabla 4.1	Selección y diseño de primers	70

Presentación del trabajo

El presente trabajo experimental consta de una parte teórica y una experimental, siendo la primera el sustento de la parte experimental y los resultados obtenidos. Así mismo la parte experimental detalla la manera en que se llevo a cabo la experimentación y los objetivos alcanzados tras su realización.

Del mismo modo, la parte teórica fue dividida a modo de describir en el primer capítulo el bacalao, su definición, composición, criterios de calidad y tecnologías, para posteriormente abordar en el segundo capítulo el fundamento del método de autenticación (reacción en cadena de la polimerasa), comparación con otros métodos y también métodos complementarios.

Finalmente el capítulo tercero, cuarto y quinto detallan el método experimental, resultados, conclusiones; así como las aportaciones del presente trabajo.

Resumen

Este trabajo tiene como finalidad desarrollar un protocolo para autenticar bacalao (*gadus morhua*) de distintos productos de interés comercial en México por medio de la amplificación de regiones específicas del gen citocromo b, localizadas en el ADN mitocondrial, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Dando como resultado la autenticación del bacalao (*gadus morhua*) una clara diferenciación y selección entre especies lejanas, y cercanas filogenéticamente.

Terminología

Adulteración:	Falsificación, fraude.
Amplificado:	Producto resultante de la PCR. Fragmentos específicos de DNA multiplicados durante la reacción.
Annealing:	Apareamiento. Asociación de hebras simples complementarias de DNA para formar una doble hélice.
Autenticar:	Reconocer como autentico.
BrEt:	Bromuro de etidio.
DNA diana:	DNA molde, plantilla. Fragmento al que se aplica la PCR delimitado por los primers.
Elongación:	Extensión, replicación, polimerización. Etapa de la PCR en la cual amplifica al DNA diana a partir de primers
Nt:	Nucleótido (s)
Pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
Primer:	Cebador, oligonucleótido. Secuencia corta de DNA de cadena simple, que apareada a una hebra de DNA molde puede ser alongada en su extremo 3' por una DNA polimerasa
RFLP:	Polimorfismos de restricción de DNA (restriction fragment lenght polymorphism)
Sitio de restricción:	Termino que describe en una molécula de DNA el sitio de acción de una enzima de restricción
Tm:	Temperatura de fusión (Melting temperature)
Variabilidad específica:	inter Variaciones que presentan las secuencias genomas de las especies de una familia con especies de otra familia
Variabilidad específica:	intra Variaciones que presentan las secuencias genomas dentro de una misma familia

Introducción

Los métodos disponibles actualmente para la diferenciación de especies, consisten principalmente en el análisis de proteínas por electroforesis, enfoque isoeléctrico en geles, métodos inmunológicos y técnicas basadas en la identificación de DNAm. Se ha encontrado que para algunos casos particulares, se han tenido problemas con los métodos basados en proteínas, mencionados anteriormente, ya que las proteínas pueden verse afectadas bajo algunos procesos, en específico los que requieren de calor. Dichos problemas, no afectan para las técnicas basadas en el DNA que detectan la presencia de elementos específicos mediante el DNA en los productos alimenticios.

En particular, en el presente trabajo, se tratara lo referente a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es una técnica genética, con un alto potencial para la identificación de especies, debido a su sensibilidad y especificidad. Esto es gracias a que todas las células de los individuos presentan información genética idéntica, el DNA es mas específico que una proteína, y finalmente, que el DNA es una molécula más estable y es posible su extracción a partir de diferentes tipos de tejidos o muestras.

Esta técnica es de gran utilidad, sobre todo cuando lo que se desea es autenticar o certificar el contenido de un producto, ya sea fresco o procesado, debido a similitudes con otros. Simplemente aunque en el país no se produce bacalao, existen variedades organolépticamente

similares, que aunque bien, no son similares morfológicamente, al ser procesadas, llegan a parecerse mucho al bacalao. Para el caso del bacalao, al ser este un producto de costo elevado, algunas veces se adultera o se sustituye con otras especies morfológica u organolépticamente similares, a modo de reducir costos de inversión y de producción.

El bacalao es una especie importante en el aspecto comercial en nuestro país, sobre todo en algunas temporadas, por tanto es de gran utilidad hacer un estudio con respecto a su identificación, manejo y conservación.

El bacalao que se comercializa en México principalmente es procesado, ya que es una especie que no se produce en el país y por tanto se importa de países fríos como Canadá, Francia, Islandia y sobre todo Noruega, siendo esta ultima el principal productor de bacalao a nivel mundial. Este es principal factor por el cual se eleva el costo del producto.

La falsificación es un tema grave legalmente hablando, ya que esto implica el engaño al consumidor debido a que no se esta comprando lo que el productor declara como su producto.

La técnica de PCR fue utilizada en el presente trabajo para la identificación de fragmentos específicos del DNA mitocondrial del bacalao, ya que esto implica ciertas ventajas que trabajar con el DNA nuclear. Dichas ventajas han sido descritas por varios autores tales como C. D. Hurst, Ladish, A. K. Lockley, I. M. Mackie, J. F. Montiel, C. Wolf y T. D. Kocher.

El DNA mitocondrial es mas abundante que el nuclear, permite la discriminación entre especies cercanas debido a su alto grado de mutación comparado con los genes nucleares; el DNA mitocondrial evoluciona mas rápido que el nuclear, además de exhibir mayor tasa de variabilidad intra específica, del cual existen mas copias dentro de una célula. El DNA mitocondrial es mas pequeño que el DNA nuclear, ya que el primero cuenta con 13 genes mientras que el ultimo cuenta con 30,000 a 40,000 genes, lo cual facilita mas los estudios con un DNA relativamente corto.

Todas estas ventajas facilitan plantear una metodología experimental, en específico para diseñar un par de primers específico para la especie, lo cual será el factor que distinga y certifique la especie en cuestión.

Por tanto, se desarrollo un protocolo para autentificar bacalao (*gadus morhua*) de distintos productos de interés comercial en México por medio de la amplificación de regiones específicas del gen citocromo b, localizadas en el ADN mitocondrial, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Capítulo 1. Generalidades

1.1 Definición de pescado

La denominación genérica de pescados comprende a los animales vertebrados comestibles marinos o de agua dulce (peces, mamíferos, cetáceos y anfibios), frescos o conservados por distintos procedimientos. (2)

1.2 Clasificación del bacalao

BACALAO

Bacalao (Gadus morhua) Linneo 1758

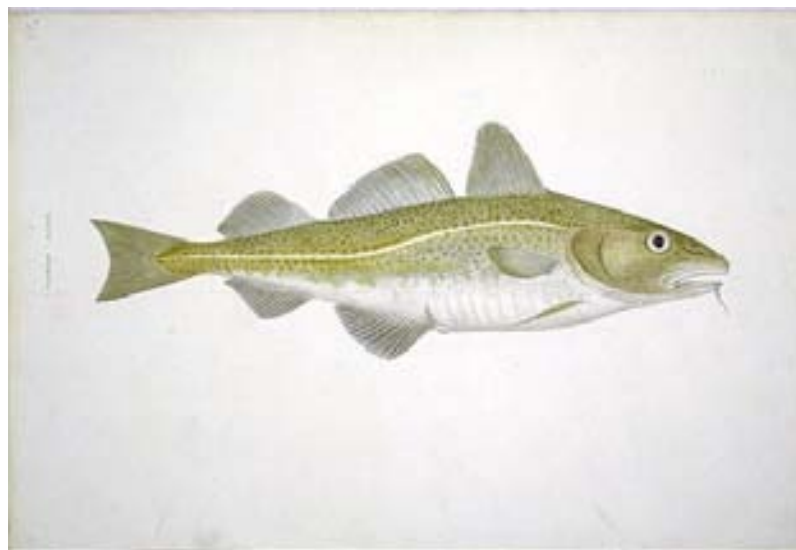


Figura 1.1 Bacalao

Superorden: PARACANTOPTERIGIOS

Orden: GADIFORMES

Familia: GADIDOS **(63)**

El bacalao está clasificado en la siguiente categoría de acuerdo con la tabla que se muestra a continuación:

CA TE GO RIA	CLASE	GRASA CONTENIDA %	PROTEÍNA CONTENIDA %	EJEMPLOS
A	Grasa baja-alta proteína	Menos del 5	15-20	Bacalao
B	Grasa media-alta proteína	5-15	15-20	Salmón rojo
C	Grasa alta-baja proteína	Más del 15	Menos del 15	Trucha lacustre
D	Grasa baja-muy alta proteína	Menos del 5	Más del 20	Atún
E	Grasa baja-baja proteína	Menos del 5	Menos del 15	Almejas

FUENTE: STANSBY, Maurice E., Tecnología de la Industria pesquera, Acribia, España, 1988.

Tabla 1.1 Diferentes clases de pescado de acuerdo a su calidad.

La categoría A es la más corriente. Los peces en ella incluidos se caracterizan por un elevado contenido proteico (del 15 al 20%) y una reducida tasa de grasa (inferior al 5%). Muchas especies de la categoría A poseen contenidos de grasa próximos al mínimo de dicha cifra, es decir, más cercanos al 1-2% que al 5%. **(6)**

1.3 Características del bacalao

Cuerpo robusto, con larga barbilla en el mentón y ojos pequeños, de diámetro inferior a la longitud del morro. La mandíbula superior sobrepasa a la inferior. Tres aletas Dorsales, muy juntas por la base, la primera netamente redondeada y algo redondeadas las otras dos, dos anales, la primera bastante corta, algo redondeada y con su inicio frente al interés espacio entre la primera y la segunda dorsal. Las pelvianas no alcanzan el ano. La línea lateral es continua con una suave curva sobre las aletas escapulares. La coloración del dorso es variable, generalmente pardo amarillenta, verdosa, grisácea o rojiza, con manchas más oscuras o más claras, sobre todo en los jóvenes, sobre el dorso y flancos y un reticulado pardo rojizo muy característico, vientre blanco, línea lateral muy clara sin mancha negra específica. **(6)**

La mayor parte de la grasa se acumula en hígado, proporcionando carne blanca muy apreciada.

Talla: hasta 1.80 metros.

Peso: hasta 45 Kg.

En aguas de Islandia y de las islas Lofoden con frecuencia se capturan ejemplares de 110cm de longitud, de 15Kg de peso y de unos 20 años de edad. Muy raramente llega a medir 150cm y pesar 40Kg. Vive a lo largo de las costas hasta una profundidad de 500 a 600m, sobre todo a temperaturas entre 2 y 10°C; generalmente se mantiene en las proximidades del fondo pero también nada entre las aguas. Algunos ejemplares de gran talla y de 15 a 20 años de edad parece que se aventuran a ir más lejos, en alta mar, a la captura de arenques y otros peces gregarios. **(6)**

1.3.1 Desove y crecimiento

Al igual que el arenque, el bacalao forma razas que se diferencian en sus costumbres y época de freza, así como en el ritmo de crecimiento y los biólogos donde se mantienen de preferencia. Los grupos más importantes están constituidos por peces emigrantes oceánicos, los cuales emprenden grandes periplos para reproducirse o alimentarse. Las razas más importantes para la industria son las del mar de Barents y las de Islandia así como las poblaciones de Groenlandia y Terranova. Las formas del Mar del Norte y del Báltico constituyen, tan sólo el 10 % o menos de la población total de bacalaos. Junto a las grandes poblaciones de bacalaos emigrantes se encuentran razas locales sedentarias que viven permanentemente junto a la costa o dentro de los fiordos. **(6)**

La mayor parte de razas frezan en primavera, buscando a este efecto aguas cuya temperatura sea de 4 a 6° C. El número de huevos varía según la talla de las hembras entre 500 000 y 5 millones. Tanto los óvulos como el esperma son emitidos libremente en el seno del agua al tiempo que el macho y la hembra se aprietan estrechamente uno contra el otro. Los huevos, transparentes y pelágicos, miden 1,5mm y suben rápidamente a la superficie. **(6)**

El desarrollo embrionario dura de 2 a 4 semanas, según la temperatura. Al nacer, los jóvenes miden unos 5mm; mientras llevan vida pelágica, se nutren de copépodos y otros animales planctónicos. Transcurridos de 3 a 5 meses, los jóvenes, que miden ya de 3 a 6cm, bajan al fondo. Los de razas oceánicas se establecen en aguas bastante profundas, mientras que los de las costeras buscan los bajos fondos. Los huevos –y también las larvas mientras llevan vida pelágica- son arrastrados muchas veces por las corrientes, en ocasiones muy lejos de sus lugares de origen. **(6)**

Los índices de crecimiento de los jóvenes en los años siguientes dependen de las temperaturas y de la densidad del banco (competencia por el alimento) así como de la calidad de alimento disponible. **(6)**

El bacalao es omnívoro; se alimenta de toda suerte de cangrejos, gusanos y moluscos; con la edad, también de otros peces. Las razas migratorias siguen, en sus largos recorridos, a los arenques y capelinas. Además, los lanzones constituyen para ellos una rica fuente de alimentos. **(6)**

Durante el periodo de freza del arenque, con frecuencia se capturan bacalaos con el estómago repleto de huevos de ese pez; por el contrario, durante los meses de invierno la ingestión de alimento disminuye enormemente. El bacalao casi no se alimenta durante el periodo de freza. Los individuos de los grandes grupos emigrantes de Terranova, Groenlandia, Islandia y Noruega no maduran hasta la edad de 6 a 15 años, la mayoría entre los 8 y 12 años, cuando miden de 70 a 100cm (3 a 8Kg). Los que habitan la zona costera crecen con mayor rapidez y maduran antes, siendo ya capaces de reproducirse a la edad de 2 años; en las costas occidentales de Noruega maduran a una edad que varía entre los 4 y los 6 años. **(6)**

El bacalao de las aguas árticas noruegas es llamado también “bacalao de los capelines” ya que persigue a los individuos de esta especie que van a frezar; aparece en grandes bancos de abril a junio en las costas de Finmark, donde es objeto de una activa pesca bajo el nombre de “bacalao de primavera”. En abril vuelve al mar de Barents siguiendo las corrientes que se dirigen al norte. Desde este momento los individuos maduros emprenden cada año las migraciones reproductoras. **(6)**

La raza islandesa freza a las costas del Sudeste de Islandia y, por su comportamiento, se parece a la noruega ártica. Los marcajes han demostrado que emprende largos viajes, que lo llevan incluso al Mar de Barents y el oeste de Groenlandia. **(6)**

El bacalao de Groenlandia deriva de la raza islandesa; de tiempo en tiempo tienen lugar importantes intercambios entre los dos grupos. Freza a una profundidad que va de los 200 a los 450m y a temperaturas de 4°C sobre las plataformas del Estrecho de Davis. Además de este tipo “skrei”, se encuentra también otra raza que freza en el interior de los fiordos. **(6)**

1.3.2 Pesca

El bacalao se pesca al arrastre, con cerco (si el fondo es uniforme), o con redes de deriva de fondo, palangres (si los peces se mantienen cerca de la superficie o el fondo es irregular); el de las razas costeras también se captura con nasas y encañizadas. Para la pesca del “skrei” los cebos deben escogerse cuidadosamente, dado que el bacalao durante la freza come poquísimo; por lo común se utilizan lamelibranquios ligeramente salados (“modiola”) que son llevados en barriles. Las pescas de mayor importancia comercial son las del “skrei”, que se efectúan cerca de las islas Lofoden, y las del bacalao de primavera, llevadas a cabo a lo largo de las costas de Finmark. **(54)**

En aguas de Islandia el bacalao se pesca con palangres de fondo desde el mes de marzo hasta el mes de abril en las zonas de freza cerca de las islas Westmanner, durante el verano las capturas se efectúan a lo largo de la costa oriental y septentrional. **(54)**

A partir de 1920 el bacalao se ha extendido hasta aguas de Groenlandia; esto se explica a causa del calentamiento del Océano Ártico. Las cantidades capturadas sobre los bajos fondos del estrecho de Davis van en aumento progresivo, mientras que las capturadas fuera de los mares nórdicos son cada vez más modestos y poco interesantes desde el punto de vista comercial. Los

compromisos que actualmente están en vigor en el Mar del Norte fijan como talla mínima de captura las piezas de 30cm. **(54)**

1.3.3 Productos

La palabra “Dorsch”, utilizada en las lenguas germánicas para designar el bacalao, significa “pescado secado” (Dorrfisch). Desde la época de los vikingos, el bacalao secado constituye una fuente de alimento importante para los pueblos nórdicos, así como una mercancía de gran importancia comercial. El pescado es simplemente secado (“Klippfisch”). El bacalao costero es llevado también a los mercados fresco o conservado en hielo picado. Una gran parte se vende bajo la forma de filetes congelados. Los desechos del bacalao también se aprovechan ya que son utilizados para la fabricación de harina de pescado. Cada año se producen como mínimo 60.000 toneladas de aceite de hígado de bacalao, muy apreciado en la industria farmacéutica como reconstituyente. Las huevas se venden frescas o ahumadas, si bien gran parte de ellas se utilizan como cebo para la pesca de sardina (raba). **(63)**

1.3.4 Producción

Las descargas anuales del bacalao totalizan en el Atlántico Norte alrededor de 1,5 millones de toneladas:

Inglaterra, 290.000-390.000 toneladas;

Rusia 200.000-400.000 toneladas (estimación aproximada);

Noruega 200.000-280.000 toneladas;

Islandia, 190.000-240.000 toneladas;

Alemania, 76-116.000 toneladas;

Portugal, 53-88.000 toneladas;

Francia, 57.000-65.000 toneladas;

Dinamarca, 55.000-58.000 toneladas;

Islas Feroe, 40.000-840.000 toneladas;

Polonia, alrededor de 40.000 toneladas;

España 34-66.000 toneladas;

Suecia, 30.000 toneladas,

Bélgica, 10-12.000 toneladas

Holanda, 5.000-7.000 toneladas;

Irlanda, 1.200 toneladas.

En la región de Terranova Canadá 235.000-297.000 toneladas; Estados Unidos, 16.000-20.000 toneladas.

Las capturas realizadas en Groenlandia ascienden aproximadamente a unas 25.000 toneladas anuales.

En la región norte del Océano Pacífico vive una especie estrechamente emparentada con el bacalao del Atlántico. **(54,55)**

1.4 Valor nutritivo y calidad del bacalao

1.4.1 Composición química

AGUA	PROTEINA	GRASA	MINERALES	FRACCION COMESTIBLE (%)
82	17	0.3	1.0	56

FUENTE: ASTIASARAN, Iciar, Alimentos :Composición y propiedades, Mc Graw-Hill, España, 2000.

Tabla 1.2 Composición del bacalao.

1.4.1.1 Agua

El agua es el principal componente del pescado, llegando a constituir hasta el 80% de la porción comestible. Por lo general existe una relación inversa entre la grasa y el contenido de agua del tejido muscular del pescado, estando la suma de ambas próxima al 80%. **(28)**

1.4.1.2 Proteínas

La tasa de proteína bruta del pescado oscila entre un 17 y un 20%. Al igual que el de las carnes, las proteínas del músculo del pescado se dividen en:

-Proteínas sarcoplásmicas. Constituyen entre el 16 y 20% de la proteína total. En su mayor parte poseen naturaleza enzimática. Su separación electroforética origina patrones propios de cada especie que permite diferenciarlas. **(2)**

-Proteínas miofibrilares. Constituyen alrededor del 75% del total. Está compuesto fundamentalmente por filamentos de actina y miosina. **(2)**

-Proteínas del tejido conjuntivo. En el músculo del pescado hay menor cantidad de tejido conjuntivo y de colágeno. Este hecho repercute en sus características organolépticas (mayor ternura) y en su menor resistencia a la alteración, tanto enzimática como bacteriana. **(2)**

	Proteínas contenido medio	Proteínas valores Extremos
BACALAO	17.5	16.0-18.5

FUENTE: MADRID, A. Tecnología del Pescado y productos derivados, Mundi-prensa, España, 1994.

Tabla 1.3 Contenido de proteínas de bacalao (en gramos por cada 100 gramos)

Las proteínas del pescado tienen un elevado valor biológico, incluso mayor que el de la carne. El músculo de pescado es rico en lisina y metionina, por lo que tiene gran valor en una dieta humana y posee un excelente espectro de aminoácidos esenciales. **(2)**

Aminoácido	Bacalao	Huevo
Fenilalanina+Tirosina	7	6
Isoleucina	4	6.8
Leucina	6.5	9
Lisina	10.5	6.3
Metionina+cisteína	4.5	5.4
Treonina	4	5
Triptófano	1	1.7
Valina	4	7.4

FUENTE: PRIMO Yúfera, Química Agrícola III, alambra, España, 1997.

Tabla 1.4 Aminoácidos esenciales de las proteínas del bacalao en g/100g de proteína.

1.4.1.3 Carbohidratos

Los hidratos de carbono están presentes en muy poca cantidad en el músculo del pescado. Los valores son en general inferiores a 0.3g/100g. Sin embargo, su proporción en el hígado es variable, ya que depende de las reservas de glucógeno que posee el ejemplar. **(2)**

1.4.1.4 Lípidos

Los lípidos se encuentran en el pescado de dos formas. La primera de ellas consiste de triglicéridos, siendo ésta la principal manera en que se almacenan las reservas energéticas. El segundo grupo de lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol, son un componente esencial de paredes celulares, mitocondrias y otras estructuras subcelulares. **(7)**

El contenido en grasa del pescado es extremadamente fluctuante, ya que a la gran variabilidad que existe entre especies hay que añadir las fluctuaciones que se dan en el contenido de grasa de los peces a lo largo de las diferentes etapas fisiológicas que atraviesan durante su ciclo vital. En los pescados grasos o azules, los lípidos se depositan en el tejido muscular, formando una dispersión globular. En los pescados magros o blancos, los lípidos se acomodan en su mayor parte en el hígado, una pequeña porción se distribuye debajo de la piel y el músculo está prácticamente libre de grasa. En el bacalao la mayor parte de grasa está en el hígado, mientras que el músculo contiene cantidades despreciables; por ello, es muy apto para la conservación por salado, sin que en él se desarrollen sabores rancios. **(4)**

1.4.1.5 Vitaminas

El pescado es rico en vitaminas A y D, ambas liposolubles, y que se encuentran en las fracciones de grasas. En los pescados magros, ambas se encuentran, casi exclusivamente, en los aceites de hígado. (7)

PECES MAGROS	
Vitamina A	50-100 UI
Vitamina D	10-20 UI
Vitamina B1	0.1-0.4 mg
Vitamina B2	0.2-0.4 mg
Nicotinamida	6-12

FUENTE: PRIMO Yúfera, Química de los Alimentos, 2ª edición, Acribia, España, 1997

Tabla 1.5 Vitaminas de la parte comestible del Pescado (Valores corrientes aproximados por 100g)

1.4.1.6 Minerales

Elemento	Cantidad (mg/Kg.)	Elemento	Cantidad (mg/Kg.)
Ca	48-420	Fe	5-248
Mg	240-310	Cu	0.4-1.7
P	1730-2170	I	0.1-1.0

FUENTE: BELITZ, Química de los Alimentos, 2ª edición, Acribia, España, 1997.

Tabla 1.6 Minerales del músculo de pescado.

El fósforo y el calcio están s proporción adecuada y contribuyen a las necesidades dietéticas en parte importantes.

La concentración de yodo también tiene importancia dietética. **(4)**

1.4.2 Criterios de calidad

Hablar de criterios de calidad en el pescado equivale fundamentalmente a hablar de frescura. Los criterios generales del bacalao son.

-Ojos perfectamente frescos, pupila negra convexa, córnea translúcida; agallas rojo brillante, ausencia de limo bacteriano, limo externo acuoso blanco o transparente; lustre opalescente brillante, ausencia de blanqueamiento.

-Carne azulada translúcida, ausencia de enrojecimiento a lo largo de la espina dorsal y ausencia de coloración en las paredes abdominales; riñón rojo brillante.

-Olores frescos a algas marinas.

-Textura firme, elástica al tacto de los dedos. **(6)**

1.4.3 Deterioro microbiológico en pescado salado

La mayoría de los microorganismos asociados normalmente con el deterioro del pescado, por ejemplo, *Pseudomonas* spp., son galófobos y no crecen en concentraciones salinas superiores al 5%. Sin embargo, hay ciertos organismos que son saprófitos habituales y patógenos al mismo

tiempo, que pueden ser halotolerantes, creciendo en ambientes con un 10 o, incluso, 20% de sal. Un ejemplo muy significativo es el *Staphylococcus aureus*. **(11)**

Los microorganismos responsables del deterioro más importante son los halófilos, que realmente requieren sal para su desarrollo, y que no crecen a menos que haya presente un 10% de sal. Estas bacterias, que son responsables del deterioro rosa, conocidas por ese nombre debido al color de sus colonias y, en consecuencia, de la apariencia del pescado curado, incluyen *Halobacterium salinaia*, *H. cutirubum.*, *Sarcina morrhuae* y *S. litoralis*. Son aerobias y no se encuentra de forma usual en el pescado escabechado donde existe un acceso de oxígeno limitado por la salmuera. También son termófilas con una temperatura óptima de crecimiento próxima a 42°C y una temperatura mínima de 5°C. **(11)**

El primer signo de deterioro <<rosa>> es un suave brillo de color rosa en la superficie del pescado apilado o durante el madurado. Esta coloración se puede eliminar fácilmente sin estropear el pescado. Para prevenir la recontaminación se puede tratar con vapores de formaldehído o dióxido de azufre, o bien sumergiendo el pescado en una solución de metabisulfito sódico, si bien el mantenimiento de la temperatura del ambiente por debajo de 10°C puede ayudar a prevenir la germinación inicial y el crecimiento. Los casos de intoxicación atribuidos al consumo de pescado deteriorado por el defecto <<rosa>>, se han debido, en realidad, a la producción de exotoxinas por *Staphylococcus aureus*. Este comenzará a crecer a actividades del agua ligeramente superiores a las requeridas por las bacterias causantes del defecto rosa. Se ha demostrado que éstas bacterias no son tóxicas ni patógenas. **(11)**

La actividad del agua del pescado salado tras el secado es demasiado baja para permitir el crecimiento bacteriano pero, si las condiciones de temperatura y humedad se hacen adecuadas, ciertos mohos osmófilos pueden crecer. El nombre de deterioro <<pardo>> deriva de la decoloración marronácea de la superficie causada por el crecimiento de hongos del género *Wallemia*. Estos son capaces de crecer en concentraciones de sal entre 5 y 26%, aunque no son específicas para el cloruro sódico y pueden crecer en concentraciones osmóticas equivalentes de

cloruro potásico, cloruro amónico, glicerol o glucosa, por lo que son más osmófilos obligados que halófilos. Otras condiciones para el crecimiento son (I) temperatura de 10 a 37°C (óptimo 25°C); (II) Ph 4,0 a 8,0 (óptimo entre 6,0 y 7,0); y (III) humedad relativa óptima 75%.**(11)**

Al contrario de las bacterias del defecto rosa, los hongos del deterioro pardo no descomponen la carne pero hacen que la superficie sea repugnante y consecuentemente, el producto tiene menos venta. Las superficies pueden cepillarse y desaparece pero vuelve a crecer si las condiciones de frío y sequedad no se mantienen. La madera vieja y podrida alberga estos hongos, por lo que debería evitarse en los almacenes de pescado seco o guardarse a cubierto. Los agentes causantes de ambos deterioros, rosa y pardo abundan en las sales solares de curado, de manera que mantener la temperatura y humedad bajas es la mejor forma de combatirlos durante la producción y almacenamiento. Desafortunadamente, la mayoría del pescado salado (seco) se encuentra en zonas en las que predomina un clima húmedo y cálido, por ello la prevención de la entrada de humedad en el envase utilizado es un factor esencial. La utilización de bolsas de plástico no es adecuada porque cualquier disminución de temperatura en el ambiente circundante provocaría condensación. **(11)**

1.5 Tecnología y procesado del bacalao

1.5.1 Conservación por salado y secado

1.5.1.1 Secado

Desde tiempo inmemorial el hombre ha dejado secar el pescado al Sol para poder conservarlo y alimentarse en épocas de carestía. El pescado fresco con un 80% de humedad es un

caldo de cultivo excelente para el desarrollo de los microorganismos. Cuando se seca y se deja con una humedad inferior al 10%, se hace más difícil el desarrollo de bacterias levaduras y mohos que no encuentran el agua que necesitan para su desarrollo. **(28)**

Se pueden emplear tres tipos de procesos de secado del pescado:

-Secado por aire o por contacto.

-Secado al vacío.

-Liofilización. **(11)**



Figura 1.2 Secado del bacalao.

1.5.1.2 Salazón

Desde la Edad de bronce, el hombre viene usando la sal común para conservar alimentos. En el caso del pescado se han desarrollado productos especiales.

El salado del pescado se puede realizar de tres formas:

Salado en seco, donde el producto se pone apilado (en filetes, pescados abiertos sin vísceras, mitades de pescado, etc) sobre la sal sólida durante varios días. Se cambia cada día la posición de los pescados.

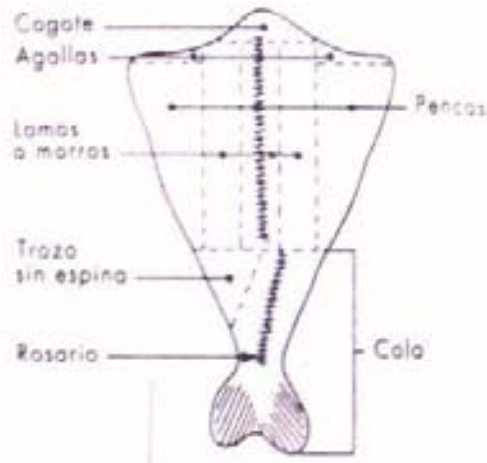


Figura 1.3 Salazón en seco del bacalao.

Salado húmedo. Se preparan soluciones de sal en agua (salmueras) donde se introducen las piezas de pescado. Este procedimiento se suele utilizar con los pescados grasos.

Salado mixto. Es una combinación de los dos anteriores. Para ello se procede al salado en seco de las piezas que se meten en un barril o depósito con la sal. **(20)**

1.5.1.3 Normatividad del bacalao salado y secado

La norma que rige en general a este tipo de productos en nuestro país es la norma oficial mexicana **NOM-129-SSA1-1995**, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias; con referencia en las normas **NOM-F-361-S-1981, NOM-F-359-S-1980, NOM-F-362-S-1980, NOM-F-541-1996, NOM-F-546-1996, NOM-F-547-1996, NOM-FF-005-C-S-1982.**

En especial para el pescado seco salado, también se tiene la norma oficial mexicana **NOM-F-506-1993** para pescado seco salado.

Así mismo es bien sabido que existen normas internacionales para el comercio exterior. Dichas normas se encuentran citadas en el CODEX ALIMENTARIUS. Para este caso se encuentran:

Norma del codex para pescado salado y pescado seco salado de la familia gadidae.

CODEX STAN 167-1989, Rev. 1-1995

Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado en Conserva

CAC/RCP 10-1976

Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado Salado

CAC/RCP 26-1979

1.5.2 Bacalao enlatado

La tecnología utilizada para el enlatado de bacalao es en general, la misma utilizada para otras variedades de peces. Consta en envasar en un recipiente de hoja de lata recubierta y herméticamente cerrada, la cual se somete a un proceso de calentamiento (esterilización o pasteurización) a unas condiciones de tiempo y temperatura determinadas para conservarlo tan cerca sea posible, de su estado natural al momento de consumirlo. En este método, el calor es el principal método de conservación. El enlatado puede ser en agua, en aceite o salsa, según sea el caso. **(75, 22)**

1.5.2.1 Normatividad del bacalao enlatado y procesado térmicamente

Se tienen normas en general y que son las mismas en algunos casos para el pescado en general, dicha norma oficial mexicana es: Norma Oficial Mexicana **NOM-129-SSA1-1995**, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

En general, para los pescados en conserva están las normas **NOM-028-SSA-1993**

NOM-FF-5S-1982.

NOM-084-SCFI-1994. Información comercial. Especificaciones de información

Comercial y sanitaria para productos de atún y bonita preenvasados.

NOM-002-SCFI-1993. Contenido neto, tolerancias y métodos de verificación.

Reglamento de control sanitario de productos y servicios 1999.

NMX-F-220-1982. Productos alimenticios para uso humano. Pesca. Atún y

Pescados similares en aceite enlatados. **(76)**

Como recomendaciones se encuentran en el CODEX ALIMENTARIUS las siguientes normas:

Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado en Conserva

CAC/RCP 10-1976

Norma del codex para pescados en conserva

CODEX STAN 119-1981, Rev. 1-1995

1.6 Importaciones de bacalao

Presentación	TOTAL		ESTADOS UNIDOS		NORUEGA	
	Volumen	Valor	Volumen	Valor	Volumen	Valor
Total	1,731	8,526	867	3,081	516	2,827
Congelado	856	2,994	856	2,994	-	-
Refrigerado	19	92	-	-	-	-

Secos, salados y ahumados	856	5,441	11	87	516	2,827
---------------------------------	-----	-------	----	----	-----	-------

CANADA		FRANCIA		OTROS	
Volumen	Valor	Volumen	Valor	Volumen	Valor
170	1,300	133	837	45	481
-	-	-	-	-	-
19	92	-	-	0	0
151	1,208	133	837	45	481

FUENTE: www.semarnat.gob.mx

Tabla 1.7 Volumen y valor de las importaciones de bacalao por presentación y país de origen, 2000 (toneladas y miles de dólares)

1.7 Especies marinas con las que se puede adulterar el bacalao

El bacalao (*Gadus morhua*) es adulterado con diversas especies de la misma familia a la que pertenece el bacalao, de los gádidos, ya que son todos pescados magros de carne blanca aunque con grandes diferencias en precio entre ellas, por lo que resulta interesante para los comerciantes poco ortodoxos sustituir las especies más baratas por las más caras. Sus características son las siguientes:



Figura 1.4 Merlán (*Merlangius merlangius*)

NOMBRE COMÚN: MERLAN

ORDEN: Gadiformes

SUBORDEN: Gadoideos

FAMILIA: Gadidae

GENERO: Merlangius

El merlán (*Merlangius merlangus*) es de la misma familia del bacalao y a menudo se pescan juntos. Además, el merlán, que vive justo por encima del fondo del mar, aparece regularmente en las redes de los pescadores de red de arrastre de vara que van en busca del pez plano. El merlán se encuentra en el Mar del Norte y en los Mares de Europa Occidental.

El merlán es más pequeño que el bacalao. Su longitud media es de 30 centímetros, pero en ocasiones puede alcanzar los 50 centímetros. Puede llegar a pesar 25 kilos.

Igual que el bacalao y la mayoría de los Gadiformes, el merlán tiene tres aletas dorsales. Se parece mucho al eglefino, pero es de color más claro. Además, la cabeza del merlán es más puntiaguda que la del eglefino y el primero no tiene hilo barbal.

El dorso del merlán tiene un color entre dorado y plateado. La línea lateral es de color marrón claro a amarillo dorado. En el punto de reunión de las aletas pectorales, tiene una manchita característica de color marrón casi negro.

Trato cuidadoso.

La carne del merlán es menos fina que, por ejemplo, la del eglefino. Tiene un color blanco grisáceo. La carne parece más transparente que la del eglefino o la del bacalao. Huele algo salina, fresca y un poco dulce. La mejor temporada para comer merlán es de enero a agosto.

La carne del merlán no es firme, se estropea antes, algo que hay que tener en cuenta al guardar t preparar este pescado.

Por lo tanto, ¡maneje el merlán con esmero y cuidado!. Muestras de que se ha estropeado son: la carne del pescado es aún menos firme, los segmentos se desprenden y desmejoran olor, color y sabor.

El pescado menos graso.

El merlán es una de las clases de pescado menos grasas. Además el merlán es bajo en calorías y rico en proteínas.

Valor nutritivo del producto sin preparar (por 100g)

Grasa: 0,7gramos.

Omega-3: 0,1miligramos.

Proteínas: 18gramos.

Agua: 79gramos.

Hidratos de carbono: 0gramos.

Sodio: 100miligramos.

Calcio: 20miligramos.

Hierro: 1,0miligramos.

Vitaminas:

retinol: 0,01miligramos.

B1: 0,05miligramos.

B2: 0,25miligramos.

C: 2,00miligramos. **(33)**



Figura 1.5 Molva (*Molva Molva*)

NOMBRE COMÚN: Maruca.

ORDEN: Gadiformes.

SUBORDEN: Gadoideos.

FAMILIA: Gadidae.

GENERO: Molva. **(33)**

Puede llegar a medir hasta 200cm de largo, pero comúnmente se encuentra entre los 63 a 160cm.

Se puede encontrar en el Atlántico, Mar de Barents, Islandia y rara vez en el Mediterráneo, en el sur de Groenlandia y Canadá. **(33)**

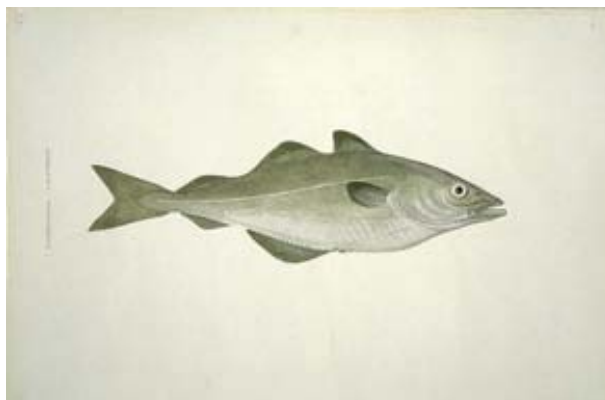


Figura 1.6 Carbonero (Pollachius Virens)

NOMBRE COMÚN: Carbonero.

ORDEN: Gadiformes.

SUBORDEN: Gadoideos.

FAMILIA: Gadidae.

GENERO: Pollachius (LUDORFF, 1988)

Comúnmente mide entre 30 y 100cm, aunque puede llegar a medir hasta 130cm.

Se le puede encontrar en el este del Atlántico: Mar de Barents Bahía de Biscay. Oeste del Atlántico: suroeste de Groenlandia, Norte de California. **(33)**

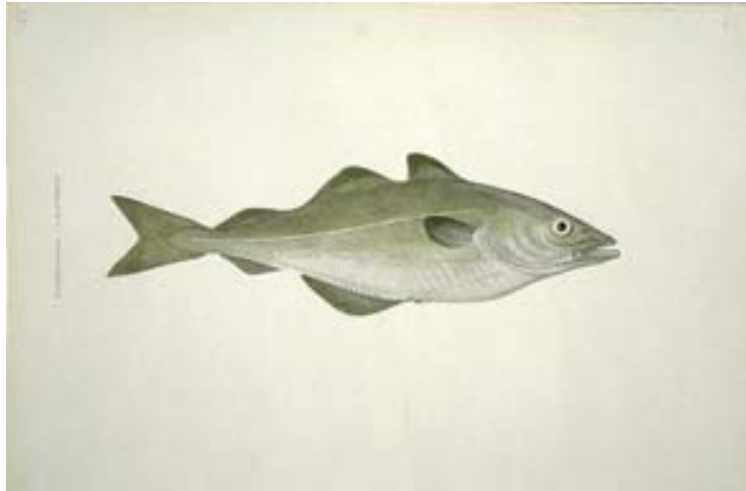


Figura 1.7 Abadejo (*Pollachius pollachius*)

NOMBRE COMÚN: Abadejo.

ORDEN: Gadiformes.

SUBORDEN: Gadoideos.

FAMILIA. Gadidae.

GENERO: *Pollachius*. **(33)**

Su medida más común son 75cm, aunque puede llegar a medir hasta 130cm de largo.

Se le encuentra en el Atlántico, rara vez en las Islas Faroe e Islandia. **(33)**

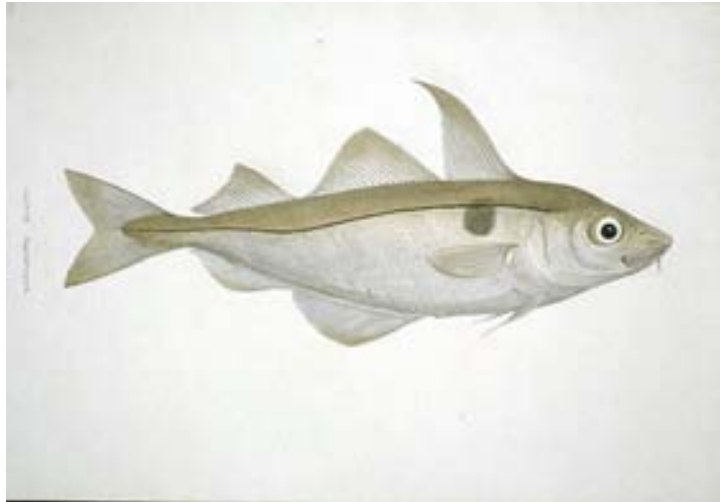


Figura 1.8 Eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*)

NOMBRE COMÚN: Eglefino.

ORDEN: Gadiformes.

SUBORDEN: Gadoideos.

FAMILIA. Gadidae.

GENERO: *Melanogrammus*. **(33)**

Raramente excede de un metro de largo. Se le encuentra en el este del Atlántico Norte de la Bahía de Biscat hasta Spitzbergen, en el Mar de Barents a Novaya; alrededor de Islandia, rara vez en el sur de Groenlandia. En el oeste del Atlántico Norte. **(69)**

1.8 Autenticación e importancia del etiquetado

En los últimos años, la concienciación y preocupación de los consumidores respecto a la calidad de la alimentación a dado lugar a un aumento en la información de los alimentos que consumimos. Esta demanda de los consumidores ha conducido a las diversas administraciones a adoptar la legislación necesaria para garantizar un etiquetado completo y veraz de los alimentos.

(66)

En el mundo se comercializan cerca de veinticinco mil especies de productos marinos e infinidad de alimentos cárnicos que carecen de control en cuanto a su denominación exacta y origen, lo que se presta a un etiquetado fraudulento. La falta de una normativa exhaustiva y, hasta hace algunos años, de un método científico de control que permitiese conocer exactamente qué ingredientes contenía cada alimento, ha dado lugar al fenómeno conocido como sustitución de especies; esto es, en la información al consumidor se le ofrece el nombre de pescados y carnes que les resulten más familiares aunque no sean los que contenga el alimento preparado, enlatado, congelado o transformado. **(71)**

El problema de una normativa de etiquetado engloba tanto la legislación correspondiente a cada país o mercado, como las herramientas analíticas necesarias para asegurar el cumplimiento de esta normativa, las exigencias de los productores y la prevención de riesgos potenciales para la salud, relacionados con el consumo de determinados alimentos no controlados. **(66)**

Además de responder a un imperativo legal, la autenticación de las especies que componen los alimentos es un asunto de vital importancia para el control de la calidad en la industria agroalimentaria. La sustitución de unas especies por otras de menor valor económico, durante la fabricación de cualquier tipo de producto, supone un fraude para el consumidor así como para las empresas distribuidoras.

La legislación española de 1984 y 1999 recoge la denominación comercial con la que deben ser etiquetados diversos productos provenientes de la pesca, sobre todo por lo que respecta a especies en fresco y a conservas de túnidos. Establece que el consumidor debe encontrar en el punto de venta el nombre científico y comercial del pescado fresco y cocido, la procedencia, el grado de frescura, la fecha de análisis y el tipo de procedencia (si se trata de un cultivo o una captura de pesca). **(77)**

El Consejo Europeo (EC) (1999) Regulación Nr 104/2000 de Diciembre 17, 1999, sobre la organización común de los mercados en productos pesqueros y de acuicultura, especifica que los productos de pesquería y acuicultura (incluyendo moluscos) no pueden ser ofrecidos para su venta a menudeo a menos que estén etiquetados con el nombre comercial de las especies, el método de producción y la zona de captura. Esta regulación también se pone en vigor en todos los estados miembros para hacer y publicar, antes del 1 de enero de 2002, una lista que incluye el nombre común y científico de antes del 1 de enero del 2002, una lista que incluye el nombre común y científico de todas las especies comercialmente disponibles. **(42)**

El problema para identificar especies se hace mayor cuánto mayor haya sido el grado de manipulación del producto. Así, se está tratando de elaborar una ley para congelados y resta establecer los parámetros para alimentos elaborados y transgénicos. **(75)**

Desde la UE (Union Europea), se intenta armonizar las leyes de los diferentes países y hacer una norma que pueda ser utilizable en todos sus estados miembros, algo difícil teniendo en cuenta que los hábitos alimenticios varían mucho de un país a otro. **(75)**

Mientras dirigentes y legisladores trabajan por establecer las pautas para regular el mercado de productos pesqueros, los científicos intentan desarrollar métodos que permitan llegar a saber con fiabilidad absoluta cuál es la especie que hay en cualquier producto alimenticio. **(75)**

Los ácidos nucleicos presentes en alimentos son de un valor no nutricional pero son característicos para varios componentes biológicos en productos complejos. Diferenciación de especies en materiales crudos para ser usados para la preparación industrial de alimentos y la detección de especies en plantas y animales en productos finales de alimentos es un importante pero difícil tarea para laboratorios de control en alimentos. Especialmente en el caso de productos cárnicos, los consumidores quieren ser protegidos de falsos etiquetados en alimentos que pueden contener desconocidos, exóticos, menos deseables o especies cárnicas inaceptables para razones económicas, religiosas o de salud. Personas susceptibles pueden sufrir de alergias causadas por el desconocimiento de ingredientes. **(46)**

En la UE y en la mayoría de los mercados internacionales las normas de etiquetado requieren la declaración de especies en la mayor parte de productos pesqueros y cárnicos. A la hora de declarar la especie en un producto concreto se pueden encontrar intereses contrapuestos: por ejemplo intereses de los consumidores e industriales, normas de la administración y aquellos aspectos que conciernen a la seguridad y al medio ambiente. **(75)**

Ejemplo de un modelo de etiquetado:

Deberán de llevar en el envase o embalaje correspondiente, y en lugar bien visible, una etiqueta, cuyas dimensiones mínimas han de ser de 14 centímetros de longitud por 4 centímetros de altura, en la que en caracteres legibles e indelebles se contemplen como mínimo las siguientes especificaciones:

- País de origen
- Categoría de calibre
- Categoría de frescura y fecha en que ésta se determine
- Peso neto, en kilogramos, para productos envasados.

-Nombre científico y comercial de la especie. -Forma de obtención.

-Modo de presentación y tratamiento.

-Expedidor, número de autorización oficial y domicilio.

Esta etiqueta ha de constar en el envase o embalaje en su primera puesta a la venta, teniendo que acompañar al producto en las diversas fases de comercialización desde dicha primera venta o puesta en el mercado hasta el consumidor final, incluyendo el transporte y distribución. **(43)**

MODELO DE ETIQUETADO

Producto de la Unión Europea

País de origen:	Calibre:	Frescura: Categoría Fecha E A B	
Producto:	Nombre científico Nombre comercial:		
Peso neto:	Forma de obtención	Modo de presentación/ Tratamiento	Expedidor: Nº. R. S.I.. Domicilio:

Fuente: GALLARDO M. C., S. Serrano, M. Villarejo, M. M. Murillo y M. Jodral. Seguridad Alimentaria: Normas Sanitarias Aplicables al pescado, Alimentaria, No. 327, Noviembre , 2001.

Productos procedentes de terceros países

País de origen:	Calibre:	Frescura: Categoría Fecha E A B	
Producto:	Nombre científico Nombre comercial:		
Peso neto:	Forma de obtención	Modo de presentación/ Tratamiento	Expedidor: Nombre y apellidos o dirección: Fecha de expedición y clasificación

Fuente: GALLARDO M. C., S. Serrano, M. Villarejo, M. M. Murillo y M. Jodral. Seguridad Alimentaria: Normas Sanitarias Aplicables al pescado, Alimentaria, No. 327, Noviembre, 2001.

Una legislación alimentaria debe contener definiciones generales sobre etiquetado con estipulaciones detalladas promulgadas por separado como mínimo, la ley debe prohibir las declaraciones falsas y erróneas y exigir un etiquetado descriptivo preciso. Algunas leyes son bastante explicativas y desarrolladas en sus disposiciones sobre etiquetado, mientras que otras son más generales. En cualquier caso, hacen falta reglamentos detallados. El objeto del etiquetado es ofrecer a los consumidores los datos que necesitan para escoger con conocimiento de causa en el mercado. **(44)**

En la norma mexicana NMX-F-506-2002-SE "Productos de la pesca - pescado seco-salado-especificaciones" muestra las siguiente especificaciones que deben contener los pescados en su etiquetado:

- a) Denominación específica del producto. El nombre debe indicar la verdadera naturaleza de producto y cumplir con la clasificación establecida en la norma.
- b) Nombre comercial o marca registrada.
- c) Nombre y dirección del envasador.
- d) Indicación del contenido neto.
- e) Fecha de elaboración y nota sobre el tiempo de conservación.
- f) La leyenda "HECHO EN MEXICO". En el caso de los productos de importación, el país de origen.
- g) Nombre y domicilio del importador.

Así mismo se deben anotar los datos necesarios para identificar el producto y todos aquellos que se juzguen convenientes, tales como las precauciones que deben tenerse en el manejo y uso de los embalajes.

Lo anterior lo muestra la norma de pescado en México, lo cierto es que en nuestro país no existe una ley que legisle el etiquetado de los productos alimenticios incluyendo al pescado, es por esto que tomamos como el ejemplo a la Comunidad Europea.

Capitulo 2. Aplicaciones biotecnológicas en la autenticación de alimentos. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.1 Métodos para la autenticación de alimentos

2.1.1 Métodos de identificación de especies de pescado

La identificación de especies de pescado atendiendo a criterios morfológicos es posible cuando éstas conservan intactas las características anatómicas esenciales. Sin embargo, es cada vez más frecuente que el pescado se procese antes de su venta al consumidor, lo que supone en la mayoría de los casos la eliminación de los caracteres que permitía su identificación. **(56)**

El problema principal para el desarrollo y aplicación de las técnicas de identificación de especies de pescado, es el gran número de especies diferentes que se comercializan en todo el mundo, así como la gran variedad de productos en que éstas se transforman. Esto dificulta en gran medida la puesta a punto de una sola técnica que se a válida en todos los casos. **(56)**

Las técnicas utilizadas en la identificación de especies de pescado, se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas basadas en el análisis de proteínas y las basadas en el análisis del ADN o técnicas genéticas. **(56)** A continuación se describen estos dos tipo de técnicas:

En años recientes, varias técnicas basadas en proteínas incluyendo métodos inmunológicos, electroforéticos y cromatográficos han sido usados para la identificación de

especies piscícolas. Entre éstas, las técnicas inmunológicas han ofrecido una alternativa significativa para la identificación de especies piscícolas y prueban ser convenientes para análisis de rutina de un largo número de muestras. Técnicas electroforéticas y métodos tales como cromatografía líquida y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) han sido reportadas, permitiendo identificar productos pesqueros procesados. Sin embargo, estos métodos son laboriosos y requieren substancial equipo y un largo banco de datos de varias especies marinas es necesario para ser efectivo un perfil de comparación de proteínas. **(30)**

Se han comparado tres métodos de análisis de proteínas usados para identificar productos pesqueros y encontraron que el enfoque isoeléctrico (IEF) dio una alta resolución pero fue costoso, alto tiempo consumido y requiere agentes tóxicos.

SDS-PAGE tiene una resolución más baja que IEF y no fue apropiado para productos enlatados.

El último método probado fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), fue costosa y solo una muestra pudo ser analizada por corrida. **(80, 81)**

<p>Métodos basados en el análisis de proteínas</p> <p style="text-align: center;">VENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> -Rapidez en el análisis de las muestras. -Menor coste de los reactivos. -Técnicas más sencillas de aprender. -Amplia disponibilidad de datos para muchas especies. -Técnicas en general más baratas. <p>Métodos genéticos</p> <p style="text-align: center;">VENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> -Se necesita muy poca cantidad de muestra (unos 100mg de tejido). - Se pueden analizar muestras conservadas 	<p style="text-align: center;">INCONVENIENTES</p> <ul style="list-style-type: none"> -Es imposible en ocasiones analizar muestras sometidas a procesados intensos a tratamientos a esterilización. -La conservación de las muestras ha de hacerse en buenas condiciones para obtener resultados reproducibles. -Se requiere gran cantidad de muestra. -El análisis de los perfiles obtenidos es bastante complejo. -Las proteínas varían (en cantidad y en tipo) dependiendo del tejido que se examine.
--	---

<p>en malas condiciones durante mucho tiempo. Es posible analizar muestras sometidas a intensos procesados, e incluso esterilizadas.</p> <p>-Se pueden detectar mutaciones silentes (imposibles de detectar mediante análisis de proteínas).</p> <p>-El ADN es el mismo en todos los tipos celulares de un organismo.</p>	<p style="text-align: center;">INCONVENIENTES</p> <p>- El análisis es relativamente lento y caro.</p> <p>-Técnicas más complejas , que necesitan por tanto de personal más especializado. - Existe menos información disponible.</p>
---	---

FUENTE. CÉSPEDES A., T. García, E. Carrera et al. Identificación de Especies de Pescado II. Técnicas genéticas. Alimentaria No. 306, Octubre, 1999.

Tabla 1.8 Comparación entre los métodos de análisis de proteínas y los métodos genéticos para identificación de especies de pescado.

A menudo, los ensayos basados en proteínas no son convenientes para la identificación de especies, especialmente en alimentos en conserva. De hecho, las proteínas pierden su actividad biológica pronto después de la muerte del pez, su presencia y características depende del tipo de células examinadas y muchas de ellas son lábiles al calor. Para la identificación de especies sería preferible analizar el DNA en lugar de proteínas. **(81)**

Desde un punto de vista práctico, las especies marinas consideradas en nuestro estudio, pueden ser fácilmente distinguibles si éstos se venden como pescados completos por medio de métodos tradicionales de clasificación Taxonómica. En el caso de productos transformados, son necesarias otras técnicas para la identificación para evitar fraudes a través de la sustitución de otras especies. **(39)**

Avances en tecnología de DNA han llevado al rápido desarrollo de métodos genéticos para identificar especies piscícolas. El DNAm^t ofrece ventajas sobre las proteínas, incluyendo estabilidad a altas temperaturas, presencia en todos los tipos de tejidos y gran variación con códigos genéticos. Pueden ser analizados usando técnicas como secuencia DNA-DNA hibridación y

la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica de PCR tiene un gran potencial por su rapidez, sensibilidad y especificidad. **(30)**

DNA mitocondrial es preferido del DNA nuclear por un número de razones: este es mucho más pequeño que el nDNA (aproximadamente 5 ordenes de magnitud), hay varias copias de mtDNA dentro de cada célula y los intrones están ausentes. **(81)**

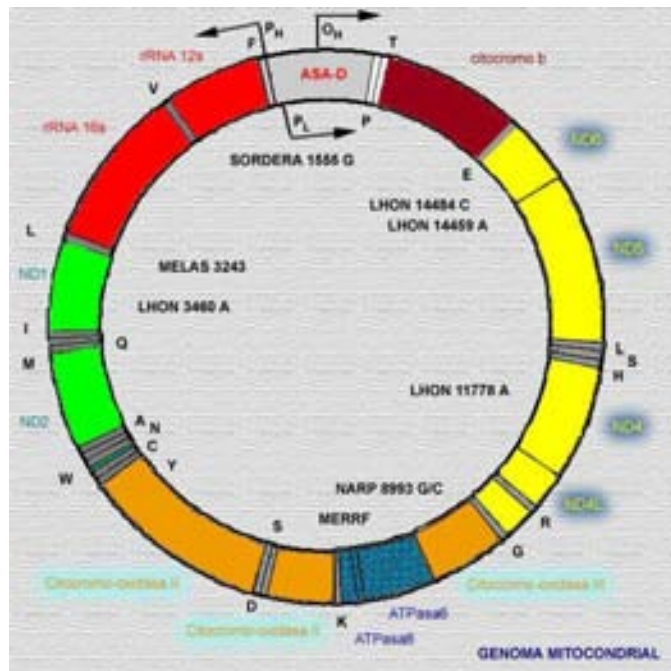


Figura 2.1 Representación del DNA mitocondrial (mtDNA)

El ADNmt de los animales comprende 13 genes que codifican proteínas, 2 genes que codifican ARNs ribosómicos (ARNr 12S y ARN16S), 22 genes que codifican ARNs de transferencia (ARNt) y una región no codificante, denominada región control en los vertebrados, que contiene los sitios de iniciación para la replicación y la transcripción (figura 1.9). Los genes mitocondriales

codifican distintas subunidades de enzimas que intervienen en la cadena transportadora de electrones: siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6), el citocromo b, tres subunidades de la citocromo c oxidasa (CO 1, II y III) y una o dos subunidades de sintetasa (ATPasa 6 y en ocasiones también la 8).

Aunque cada gen en particular tiene su propia tasa de evolución, los genes que codifican las distintas subunidades de la CO y el citocromo b son los que más varían. La región control, especialmente la zona denominada D-Loop, es la parte del ADNmt con mayor tasa de evolución. Esta mayor tasa de debe sobre todo a sustituciones, adiciones y detecciones, siendo la zona responsable de las variaciones en longitud que presenta el genoma mitocondrial de los distintos vertebrados. **(62)**

En el ADN mitocondrial de los peces" O_H y O_L , indican los orígenes de replicación de las cadenas H- y L- respectivamente. La mayoría de los genes del ARNt y todas las proteínas excepto la ND6, están codificados en la cadena H. Los genes codificados por la cadena L se muestran en la parte externa del círculo. **(62)**

2.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es el método más directo para identificar y autenticar especies. El propósito de la reacción es sintetizar millones de copias de un fragmento selecto (diana) de la molécula de DNA específica de la especie, que muestre diferencias en la secuencia de nucleótidos, incluso es especie cercanamente seleccionadas, y de esta forma pueda ser analizado. **(39)**

La replicación de una molécula ocurre mediante una reacción en la que un par de *primers* – que son pequeñas secuencias de nucleótidos sintéticos escogidos con secuencias

complementarias a los finales opuestos de las cadenas simples del fragmento de DNA seleccionado – dirigen la síntesis de millones de copias del fragmento objetivo, y esta reacción se realiza por la acción de la enzima DNA polimerasa. **(39)**

La enzima DNA polimerasa es requerida para la síntesis inicial y para la subsiguiente reacción en cadena, por medio de la cual se producen las copias del fragmento deseado. De esta forma se obtiene suficiente producto (amplificado) para hacer analizado más profundamente por otros métodos, o bien, para ser secuenciado. **(39)**

La reacción en cadena de la polimerasa tiene un alto potencial para la identificación de especies debido a su creciente sensibilidad y especificidad cuando se compara con los ensayos de proteínas e hibridación con sondas de DNA. **(50)**

En conclusión, los métodos basados en la identificación de una o varias proteínas dependientes de la especie a autenticar presentan una serie de desventajas debidas principalmente a la naturaleza y estabilidad de éstas. Por otro lado, los análisis de DNA se muestran mucho más fieles para la identificación de especies, sin embargo, el análisis de DNA por hibridación se ha destacado actualmente por su alto costo, lo que hace a la reacción en cadena de la polimerasa el método más adecuado para autenticación de especies, en especial a que esta puede ser utilizada como herramienta para una gran cantidad de análisis, que definen su alta fidelidad para dicho fin. **(50)**

2.1.3 Análisis de proteínas

El análisis de proteínas específicas de las especies se ha utilizado ampliamente bajo la necesidad de identificar a las especies o distinguir los orígenes del material para consumo

humano. Los ensayos se basan en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, tales como tamaño o carga, propiedades que pueden ser reveladas como diferencias en su movilidad electroforética, puntos isoeléctricos o tiempo de elusión cromatográfica. A partir de los resultados obtenidos tras las prueba, se puede comprobar la autenticidad de las especies cuando se compara con un perfil propio de la especie, es decir, la prueba se realiza utilizando a la especie auténtica. **(43)**

El metodo más utilizado para estas pruebas es la electforesis en geles de poliacrilamida, gales con gradientes de concentración y geles con gradiente de pH, los cuales muestran bandas características de acuerdo a la proteína detectada. **(50)**

Los métodos electroforéticos, sin embargo, están encaminados a la detección de proteínas en su estado natural, por lo que no es apropiado cuando se trata de productos que han sufrido tratamientos térmicos, como el ahumado o la esterilización, pues tras el tratamiento las proteínas se hallan desnaturalizadas, además de que la expresión de la proteína es dependiente del tejido, lo que implica que las proteínas no pueden ser detectadas adecuadamente en procesos a través de los cuales el tejido no está disponible. **(39)**

El análisis de proteínas también se ha utilizado en el área inmunológica para la identificación de especies utilizando anticuerpos que son producidos en contra de un grupo particular de proteínas (proteínas de diagnostico o antígenos) productos que han sufrido tratamientos térmicos, como el ahumado o la esterilización, pues tras el tratamiento las proteínas se hallan desnaturalizadas, además de que la expresión de la proteína es dependiente del tejido, lo que implica que las proteínas no puedan ser detectadas adecuadamente en procesos a través de los cuales el tejido no esta disponible. **(39)**

El análisis de proteínas también se ha utilizado en el área inmunologica para la identificación de especies utilizando anticuerpos que son producidos en contra de un grupo

particular de proteínas (proteínas de diagnóstico) siguiendo un procedimiento inmunológico estandar. en este caso anticuerpo producido es específico para el grupo de proteínas. Por ello, este ensayo inespecífico cuando se trata de localizar adulteraciones en los productos por la mezcla de especies no declaradas en la etiqueta. Así mismo, si la proteína ha sufrido desnaturalización. el anticuerpo no es capaz de actuar sobre aquella proteína para la cual fue producido. **(43)**

En México, actualmente se dispone de algunos métodos rápidos para la identificación de especie animal basados en la prueba de ELISA (enzyme linked immunosorbent assays). Tales ensayos consisten en la utilización de anticuerpos específicos para proteínas de músculo estables al calor: siempre que dicha unión pueda efectuarse por la presencia de las proteínas para las cuales los anticuerpos fueron cultivados, la prueba producirá una coloración específica. Como se puede notar estas pruebas ya han sido diseñadas para la autenticación de especies tratadas térmicamente. sin embargo tiene importantes desventajas en cuanto a especificidad en contraste con los ensayos de DNA, que se analizan posteriormente, por ejemplo, las pruebas, que se venden como kits, al estar diseñados para la detección de proteínas estables al calor pierden especificidad cuando se desea diferenciar especies cercanamente relacionadas ya que dichas proteínas pueden pertenecer al tejido de diversas especies de una misma familia, como es el caso de la carne de res y búfalo para cerdo, reacciona solo con especies porcinas, en el caso de las aves reacciona con una gran variedad de especies avícolas, presenta reacción variable con huevos y para el borrego reacciona con borrego y cabra. Las proteínas requeridas en este tipo de métodos son dependientes del músculo por ejemplo. No se han desarrollado kits de este tipo para la autenticación de otros de especies comestibles como el pescado. **(48)**

2.1.4 Análisis de DNA

La molécula de DNA es una molécula biológica extremadamente estable y de larga vida. Tiene la característica de ser específica de las especies, es decir, muestra variabilidad en su configuración inter e incluso, intra-específica para la simple mutación de una sola base. Esta característica es lo que hace que el análisis de esta molécula, lo mas adecuado para la búsqueda de autenticidad en los productos de alimentos procesados **(50)**

La molécula, además, está presente en la mayoría de las células de un organismo y todas aquellas contienen la información idéntica que puede ser obtenida de cualquier muestra de la misma fuente, apesar del tejido de origen. El DNA puede proveer potencialmente más información que una proteína, la molécula de DNA es más termoestable que muchas proteínas lo que implica que es muy posible su alteración por el procesamiento de alimentos. Aún cuando llegue a ser degradada durante el tratamiento termico, es posible obtener fragmentos con diferencias suficientes en la secuencia que permita diferenciar e identificar especies cercamente relacionadas. Si bien es cierto que la molécula de DNA tiende a ser muy estable a bajas temperaturas, cuando el tejido es sometido al proceso de esterilización se degrada rapidamente dejando disponible a la molécula de DNA en fragmentos pequeños. Algunas investigaciones señalan que se han obtenido fragmentos menores a 500 pb. En este sentido, el tipo de tratamiento al que se someten los alimentos a autenticar ha sido el principal parámetro para la selección del método adecuado de autenticación **(13,39,43)**

El análisis de DNA esta basado en la identificación de la molécula de DNA, para lo cual se han desarrollado dos métodos: 1) hibridación de DNA y 2) la reacción en cadena de la polimerasa. Ambos métodos de la purificación de la molécula de DNA para su análisis.

2.1.4.1 Hibridación de DNA

El método de hibridación del DNA esta basado en los procesos de desnaturalización – renaturalización de la cadena de DNA. Esta prueba se basa en la mezcla de hebras sencillas de ácido nucleico muestra, bajo condiciones experimentales que permitan el apareamiento entre bases complementarias. **(42)**

Esto requiere la desnaturalización previa de las hebras dúplex de DNA, lo que generalmente se lleva a cabo por calor, aunque también puede realizarse por agentes químicos. Una vez mezcladas, la sonda y la hebra diana, se permite la renaturalización, en la cual se espera que se forme híbridos sonda-diana, si la muestra fuera auténtica. **(42)**

La detección de los productos se puede llevar acabo de diversas formas, lo que depende de la técnica que se utilice para realizar el ensayo. En la autenticación de alimentos comúnmente se han utilizado los métodos de hibridación en soporte sólido (filtro de nylon o nitrocelulosa): dot-blot y slot-blot. El primero consiste en aplicar la muestra gota a gota y el segundo consiste en aplicar la muestra en manchas alargadas. Existen otras técnicas de hibridación, como Northern blot y Southern blot, que también se llevan a cabo en soporte sólido, y las técnicas de hibridación en líquido e in situ. Sin embargo, dichas técnicas no se han ensayado para la autenticación alimentos. **(42)**

2.2 Descripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Aun cuando existe un gran número de métodos para la clonación y secuenciación de DNA, la PCR es el método más viejo en teoría y el más versátil en práctica, es un método simple, rápido y flexible, al que pueden aplicarse un gran número de variaciones que dependen del propósito al que se aplica. **(42)**

2.2.1 Fundamento de la técnica de PCR

El fundamento se basa en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico de DNA delimitado por el apareamiento de dos moléculas cebadoras sintéticas (primers) con la molécula de DNA. La síntesis y copia del fragmento de DNA sucede por la acción de una DNA polimerasa, que une ácidos nucleicos sintéticos a la hebra simple de la molécula de DNA (que resulta de la desnaturalización de la cadena doble original), formando una cadena doble que posteriormente será sujeta de desnaturalización y plantilla de nuevas moléculas de DNA. **(42)**

2.2.2 Etapas de la reacción

Esta reacción no es precisamente una técnica, si no una metodología en la que se aplican tres conceptos fundamentales:

- 1) desnaturalización de la cadena doble de DNA.
- 2) hibridación de la hebra sencilla con un oligonucleótido.
- 3) replicación de las hebras sencillas de DNA por la acción de una DNA polimerasa a partir del oligonucleótido mencionado.

Todas las etapas de la reacción se definen especialmente por llevarse a cabo a temperaturas distintas la figura 2.1 representa el orden en que sucede la reacción partiendo de una sola cadena de DNA que en realidad es mucho más larga e, inicialmente, presenta su conformación helicoidal. **(42)**

2.2.2.1 Desnaturalización

La desnaturalización del DNA es estrictamente requerida para la obtención de hebras simples de la molécula de DNA.

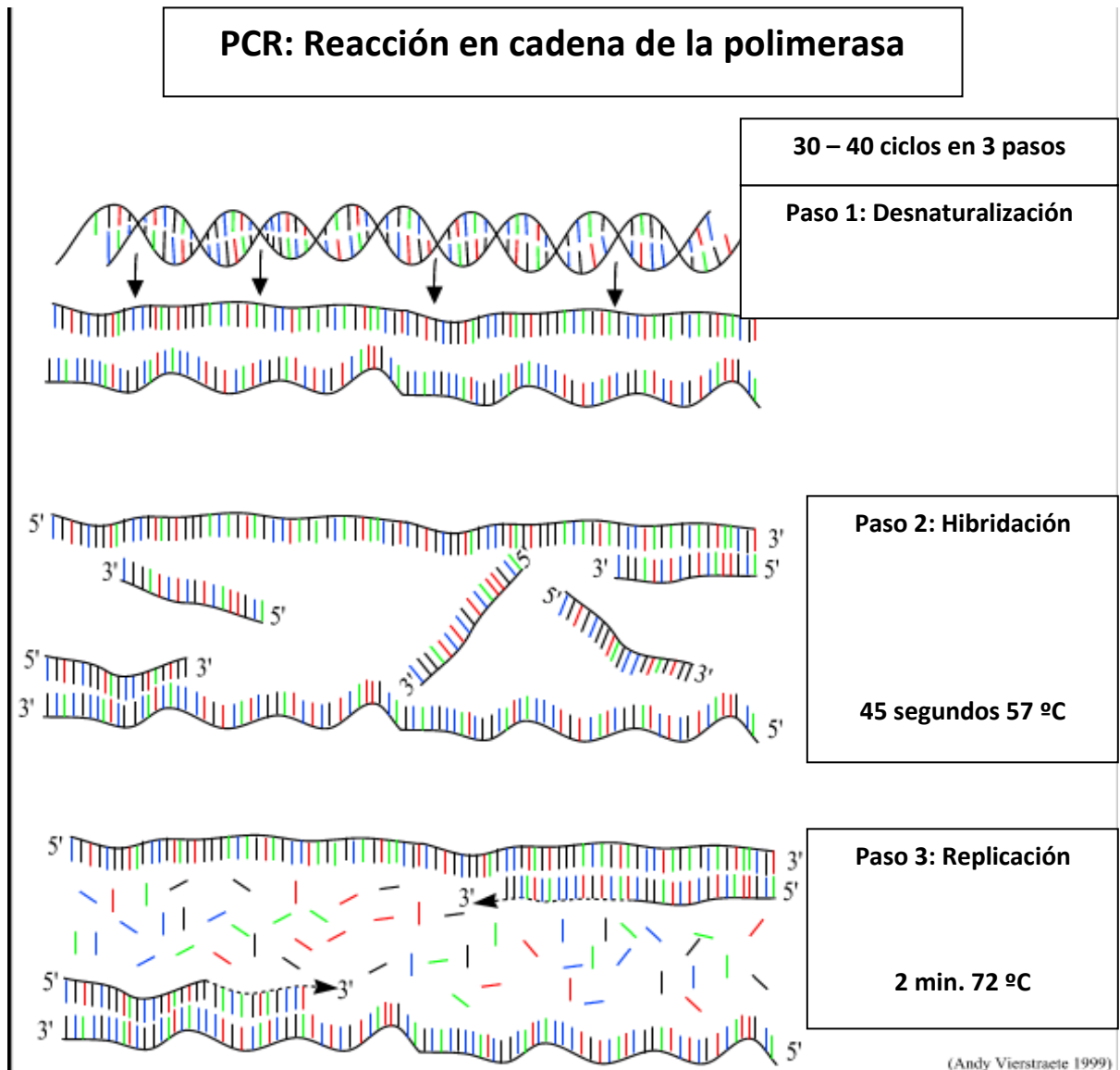


Figura 2.2 Representación del mecanismo de la PCR

La desnaturalización se debe tanto a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre pares de bases, como de las interacciones hidrofóbicas entre bases apiladas al desnaturalizarse. Las dos hebras del DNA se separa y pasan a una conformación al azar sin que se altere la estructura primaria, pues no hay ruptura de enlaces covalentes. La figura 2.1 representa este fenómeno, sin embargo, no puede visualizarse la ruptura de los enlaces hidrofóbicos entre las bases apiladas aunque si se entiende la separación y ruptura de los puentes de hidrogeno. **(42)**

La desnaturalización puede llevar a cabo por efecto de agentes químicos desnaturalizantes o por calentamiento, que es lo más adecuado para la técnica de PCR, generalmente a temperaturas mayores de 68°C y menores de 97°C. la temperatura de desnaturalización debe ser superior a la fusión T_m de la región de DNA que se desea amplificar **(42)**

2.2.2.2 Hibridación

Se llama así debido a que en esta las hebras sencillas se unen a los oligonucleótidos sintéticos. Esta etapa se asemeja en gran medida al método ya mencionado de hibridación de DNA, aunque en este caso, el DNA se une a una hebra corta (<30 nt) de nucleótidos sintéticos que servirán para iniciar la reacción **(42)**

Esta etapa también se denomina etapa de templado debido a la disminución de temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica; en ingles annealing. La figura 2.1 representa esta etapa. Los oligonucleótidos (representado por dos cadenas cortas de 3 nucleótidos) se unen a una región específica y complementaria del DNA en original en dirección 5'-3' **(42)**

Esta etapa requiere un enfriamiento rápido por debajo de la T_m (temperatura de fusión) de los oligonucleótidos de forma que suceda la hibridación. Las temperaturas usuales están en un rango de 37 y 65°C que se mantienen entre 10 y 20 segundos **(42)**

2.2.2.3 Elongación (Replicación)

Esta es la etapa de amplificación propiamente dicha, la DNA polimerasa se encarga de elongar los oligonucleótidos de acuerdo con la hebra sencilla de DNA que en este caso sirve de molde para generar una nueva cadena doble de DNA. El sustrato de la enzima son los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's). **(42)**

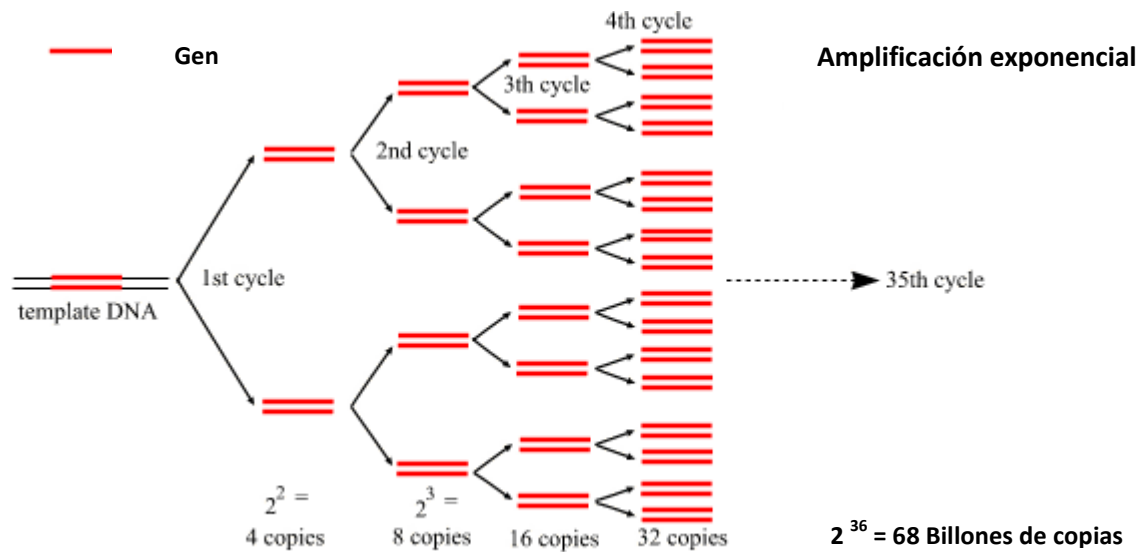
La replicación se lleva a cabo en la dirección 5'-3' a partir del extremo 3'OH de cada cebador, hasta terminar la lectura de la plantilla o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización. Esta etapa queda representada en la figura 2.1. La enzima DNA polimerasa no ha sido simbolizada, sin embargo se ha encargado de unir ya algunos dNTP's la cadena complementaria siguiendo la dirección 5'-3' a partir de los cebadores. **(42)**

Al finalizar esta etapa se obtiene cadenas dobles nuevamente, pero duplicado a las que existían al principio de la desnaturalización. Nótese que en un primer ciclo las cadenas nuevas no tienen un tamaño especial (figura 2.1), sin embargo, este se irá afinando conforme a los ciclos progresen. **(42)**

Complementariamente a las tres etapas repetidas cíclicamente, se añade una etapa inicial y una final. La inicial implica elevar la temperatura a un nivel superior a la etapa de desnaturalización, logrando la iniciativa de proteasas y nucleasas de la muestra y al, mismo tiempo, es posible asegurar la completa desnaturalización del DNA inicial. La etapa final consiste

en la prolongación de la última elongación a fin de permitir que se completen todos los fragmentos. **(42)**

Las tres etapas mencionadas se repiten cíclicamente. El número de ciclos puede variar en un rango de 20 y 40 ciclos. El comportamiento de las cadenas de DNA, resultantes de cada ciclo de representante en la figura 2.2. Nótese que los fragmentos no representan el tamaño esperado sino hasta el tercer ciclo (marcados en un recuadro). **(42)**



(Andy Vierstraete 1999)

Figura 2.3 DNA resultante en el transcurso de los ciclos

2.2.3 Componentes de la reacción

Después de describir las etapas de la reacción, es simple visualizar los componentes principales que requiere la reacción:

- 1) Un par oligonucleótidos o primers
- 2) dNTP's en exceso
- 3) La DNA polimerasa, y por supuesto
- 4) la plantilla de DNA a amplificar.

Cada uno de estos componentes tienen funciones específicas y, de acuerdo con el protocolo de amplificación, deben tener características específicas. **(42)**

2.2.3.1 Oligonucleótidos

De los tantos factores que influyen la eficiencia y especificidad de la reacción de amplificación, ninguno es más crucial que el diseño de los primers de oligonucleótidos. Estos son moléculas sintéticas de cadena sencilla y de secuencia corta (18 a 30 nt) cuyas secuencias deben ser complementarias al extremo 3' de cada una de las hebras sencillas del fragmento diana. De este modo, los oligonucleótidos funcionan como cebadores para la replicación del fragmento diana. De acuerdo con lo expuesto, estos oligos delimitan la longitud de la plantilla de DNA a amplificar. **(67,71)**

El éxito de la reacción como se expone anteriormente, recae principalmente en un buen diseño de primers, pues la carencia de una unión perfecta entre el DNA diana y el extremo 3' del primer puede conducir a un fallo en la PCR. La selección de primers requiere un diseño cuidadoso para la obtención de los productos deseados debido a que tales primers influyen fuertemente en el éxito o fracaso de la PCR, lo que implica el cumplimiento de características especiales que depende en gran medida de la secuencia diana por sí misma. Su selección adecuada reflejará el grado de especificidad de éstos ante la especie en cuestión e incluso desempeño durante la reacción **(67,71)**

El diseño y selección de primers deben girar en torno a los requerimientos que señala la tabla 2.1 (42)

Propiedad	Diseño optimo
Composición de las bases	El contenido de G + C debería estar entre un 40 y 60% en la secuencia. Las cuatro bases deberían estar distribuidas a lo largo de toda la secuencia.
Longitud	La región del primer complementaria a la plantilla de DNA debe ser de 18 a 25 nucleótidos de largo. Así pues, es recomendable que el par de primers sea de la misma longitud o, en todo caso, no rebase una diferencia de 3 nucleótidos.
Secuencias repetidas y complementarias a si mismas	No deben presentarse secuencias repetidas en la secuencia invertida (secuencia complementaria) o secuencias complementarias entre primers que sean mayores a 3 pares de base de longitud. Las secuencias de este tipo tienen a formar estructuras tipo horquilla las cuales si son estables bajo las condiciones de PCR. Pueden prevenir efectivamente el annealing del oligonucleótido con su plantilla.
Complementariedad entre los miembros de un par de primers	Las Secuencias terminales en 3' de un primer no deben ser capaces de unirse a cualquier sitio del otro primer. Debido a que los primers se presentan en altas concentraciones en PCR aún teniendo una débil complementariedad entre ellos permite la formación de híbridos y consecuentemente, la síntesis y la amplificación de dímeros de primers. Si se forman prematuramente en la PCR, pueden competir por la DNA polimerasa, primers y nucleótidos, por lo que pueden suprimir el amplificado de la plantilla de DNA.
Temperatura de fusión (Tm)	La temperatura de fusión (Tm) calculada para ambos miembros del par de primers no debe diferir en 5°C o más. La Tm del producto amplificado no debe diferir por más de 10°C con los valores de Tm del par de oligos. Esta propiedad asegura que el producto amplificado será eficientemente desnaturalizado durante cada ciclo de PCR.
Terminación en 3'	La naturaleza del final 3' de los primers es crucial. Si es posible, la base en 3' debe ser G o C. sin embargo, los primers con la secuencia NNGC o NNGC a su final 3' no son recomendados debido al inusual alto ΔG de las bases GC terminales, lo que propicia la formación de horquillas y puede generar dímeros de primers.
Localización en sitios de amplificación	Dependiendo del propósito del experimento, la localización de los sitios de amplificación puede estar encerrado por la localización de mutaciones, sitios de restricción, secuencias codificantes o microsatélites.

Tabla 2.1 Diseño de primers: propiedades de los Oligonucleótidos que influyen la eficiencia de amplificación

2.2.3.2 DNA polimerasa termoestable

La enzima DNA polimerasa se encarga de unir nucleótidos los dNTP's a la cadena complementaria a partir del cebador, formando una nueva cadena doble de DNA a partir de una cadena sencilla.

Debido a que las etapas de reacción involucran temperaturas variables, es requerida una enzima termoestable que igualmente, soporte temperaturas cercanas a los 100°C. Esta característica es la que le permite a la enzima actuar durante varios ciclos sin desactivarse. Aunque existe una gran variedad de enzimas, la enzima más empleada es la Taq polimerasa, cuyo nombre se debe a que es procedente de una bacteria llamada *Thermus aquaticus*. **(52)**

2.2.3.3 Desoxynucleotidos trifosfatos (dNTP's) en exceso

Son nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, es decir, son el sustrato de la enzima DNA Polimerasa y serán los componentes de miles de copias del fragmento diana al final de la reacción. Pueden denominarse como dATP's, dTTP's, dGTP's y dCTP's. **(52)**

2.2.3.4 Cationes divalentes

Todas las DNA Polimerasas Termoestables requieren de cationes divalentes libres para su actividad, usualmente Mg^{2+} , sin embargo, la presencia de éstos está más íntimamente ligada con la presencia de dNTP's y oligonucleótidos, debido a que son ellos los que se unen al catión. La concentración molar del catión, por lo tanto, debe exceder la concentración molar de los grupos fosfato que aportan los dNTP's más los primers., **(67)**

2.2.3.5 DNA diana

La adición de DNA a la reacción implica su previa extracción de la célula o del tejido y su solubilización en agua. En teoría se utilizan las condiciones óptimas en relación con los primers, el número de ciclos aplicados, concentración del resto de componentes y el volumen de la reacción. - de manera que trabaje al máximo- entonces debe ser suficiente la adición de una simple cadena de DNA al inicio de la reacción. Es requerida una concentración adecuada para lograr una amplificación adecuada. Si la concentración de DNA es menor, es probable que no se visualice una banda clara en un gel de agarosa, por otro lado, si la concentración es muy alta, la DNA polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de DNA. **(67)**

2.2.4 Análisis del producto de PCR

Los métodos disponibles para el análisis de los productos amplificados por PCR dependen directamente del diseño de la reacción y de los primers utilizados. En algunos casos será requerida más de una técnica secundaria para establecer la especie inequívocamente. **(30)**

Métodos simples (no requieren métodos complementarios para la identificación de especies)

- Primers específicos de las especies
- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Métodos complementarios a la PCR.

- Secuenciación
- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)

En este sentido, las técnicas para la identificación de especies pueden ser clasificadas de acuerdo a la naturaleza de los fragmentos diana a identificar primero, las técnicas cuyo DNA diana se localiza en múltiples genes simultáneamente para producir un patrón parecido a una huella digital, se utilizan los análisis RAPDs y, segundo, las técnicas cuyo DNA diana es simple o tiene muy pocas locaciones en genes, se utilizan los análisis RFLP o SSCP. La ventaja que distingue a las últimas técnicas no sólo es su habilidad para identificar especies provenientes de procesos duros y aún de muestras degradadas, sino también su habilidad para identificar fácilmente diversas especies dentro de un mismo producto. Las técnicas presentadas se mencionan a continuación.

(30)

2.2.4.1 Primers específicos en las especies

Cuando se refiere a la utilización de primers específicos de las especies se espera que los primers generen sólo un producto en la presencia de DNA a partir de las especies dadas, bajo condiciones estrictas e idóneas de reacción. La información de la secuencia completa permite predecir el tamaño del producto, de modo que la identificación se confirma si el amplificador se ve del tamaño apropiado en un gel, es decir, la presencia del producto de PCR es considerado como prueba de la identidad. La figura 2.3 muestra el perfil que presentaría una muestra amplificada correctamente por este método, en cuyo caso, el carril A muestra el marcador molecular, el carril B y C muestran productos de PCR con primers específicos de cierta especie que hubieran sido diseñados esperando la amplificación de un fragmento de ~750pb. El caso B no muestra amplificado puesto que el primer no habría apareado con la especie, siendo esta una especie extraña (diferente a la buscada), por el contrario el caso C presenta una banda correspondiente al tamaño esperado, lo que implica que representaría la presencia de la especie buscada **(39. 71)**

La utilización de este protocolo implica el desarrollo de características específicas

A la especie a analizar y, sobre todo, el conocimiento previo de la secuencia completa de la especie cuestionada para la selección y diseño de primers apropiados como se ha manejado anteriormente.

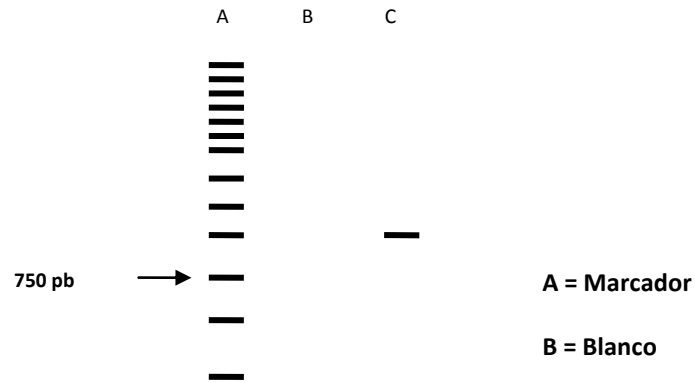


Figura 2.4 Análisis electroforético para productos de PCR que utilizaron primers específicos

2.2.4.2 RAPD (Random Amplified polymorphic DNA)

Para un análisis RAPD se requieren primers cortos de ~10 bases que forman híbridos al azar con muchas plantillas del DNA genómico. Los primers no están diseñados para amplificar un fragmento específico, por el contrario, forman híbridos dispersos a lo largo de todo el genoma. Dadas las condiciones apropiadas para la reacción PCR, la amplificación resultante resulta en un patrón electroforético que comprende bandas de distintos tamaños. Se ha comprobado que ciertos patrones son específicos de las especies. Diferentes pares de primers producirán diferentes patrones, de los cuales su uso es determinado empíricamente. **(39,71)**

2.2.4.3 Secuenciación de los productos de PCR

A este método se le conoce como FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequence). Este método representa el modo más directo para la identificación de especies, siempre que sea posible la comparación del DNA desconocido con las secuencias de especies en una base de datos de referencia. **(71)**

Aún cuando este método permite identificar especies, es comúnmente utilizado como herramienta para la aplicación de otros métodos, por ejemplo, la selección de enzimas de restricción para un análisis de polimorfismos de restricción, lo que permite predecir los perfiles esperados, o el diseño y selección de primers. **(71)**

2.2.4.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

En el análisis RFLP – conocido en español como análisis de polimorfismos de restricción-, se escogen grupos de enzimas (endonucleasas) tomando en cuenta su habilidad para reconocer y cortar secciones de secuencias de nucleótidos dentro de un fragmento particular del DNA. Estas secciones son separadas por tramos en un gel de electroforesis, resultando perfiles específicos de las especies. Esta técnica tiene la ventaja (incluso sobre SSCP) de tener la capacidad de diferenciar muestras con especies mezcladas. **(43)**

A partir de la secuenciación de los productos de amplificación por PCR es posible identificar diferencias en la secuencia de bases de los productos que quieren ser diferenciados. Estas secuencias de bases de los productos que quieren ser diferenciados. Estas secuencias son el blanco que emplearán las enzimas de restricción (endonucleasas) para cortar y separar el fragmento producto por la PCR, sin embargo, para lograrlo se precisa la selección de una enzima de restricción que sea capaz de reconocer la secuencia blanco y pueda cortarla. **(43)**

En primera instancia, la mayoría de las enzimas de restricción reconocen secuencias denominadas palíndromas, que son habitualmente de 4 ó 6 pb. Estas enzimas son capaces de reconocer en toda la longitud de DNA ciertas secuencias características, cortando a la cadena en tantos fragmentos como sitios de restricción sean encontrados. La tabla 2.2 muestra las secuencias de reconocimiento de algunas enzimas de restricción. **(43)**

Enzimas	Secuencia	Microorganismo
AccI	GT/(^A _C)(G)AC	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
AluI	AG/CT	<i>Anthrobacter luteus</i>
ApaI	GGGCC/C	<i>Acetobacter pasteurianis</i>
BamHI	G/GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
BstXI	CCE(N) ₃ /NTGG	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Clal (=Bsp106I)	AT/CGAT	<i>Caryophanon latum L (Bacillus sphaericus)</i>
Dar II (=Eco0109I)	Pug/GNCPpy	<i>Deinococcus radiophilus (Escherichia coli)</i>
EcoRI	G/AATTC	<i>Escherichia coli</i>
EcoRV	GAT/ATC	<i>Escherichia coli</i>
HaeIII	CG/CC	<i>Haemophilus aegyptus</i>
HincII (=HindII)	GTPy/PuAC	<i>Haemophilus influenzae serotype c. 1160 (Haemophilus influenzae R_d)</i>
HindIII	A/AGCTT	<i>Haemophilus influenzae R_d</i>
HpaII (=MspI)	C/CGG	<i>Haemophilus parainfluenzae (Moraxella species)</i>
KpnI	GGTAC/C	<i>Klebsiella pneumoniae OK8</i>
MstII	CC/TNAGG	<i>Microcoleus species (algae blue)</i>
NotI	GC/GGCCGC	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
PstI	CTGCA/G	<i>Providencia stuartii 164</i>
PvuI	CGAT/CG	<i>Proteus vulgaris</i>
SacII	CCGC/GG	<i>Streptomyces achromogenes</i>
SalI	G/TCGAC	<i>Streptomyces albus G</i>
Sau3A (=MboI)	/GATC	<i>Staphylococcus aureus 3^a (Moraxella Boris)</i>
SmaI	CCC/GGG	<i>Serratia macescens S_b</i>
SpeI	A/CTAGT	<i>Sphaerotilus species</i>
SphI	GCATG/C	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
SstI (=SacI)	GAGCT/C	<i>Streptomyces stanford (Streptomyces achromogenes)</i>
XbaI	T/CTAGA	<i>Xanthomonas baddrii</i>
XhoI	C/TCGAG	<i>Xanthomonas holcicola</i>
XmaI	C/CCGGG	<i>Xanthomonas Malvacearum</i>
XmaIII (=EagI)	C/GGCCG	<i>Xanthomonas Malvacearum (Enterobacter agglomerans)</i>

Fuente: Etienne, J. 2001. [10]

Tabla 2.2. Secuencias de conocimiento de algunas enzimas de restricción

Una vez que las enzimas han actuado sobre los fragmentos amplificados por PCR se analizan por electroforesis utilizando un marcador molecular. Esto implica que la secuencia de los productos de PCR sea conocida al igual que el tamaño de los fragmentos que producirán los cortes con las endonucleasas. La figura 2.4 muestra, el perfil electroforético que mostrarían los fragmentos resultantes, donde el carril A muestra el perfil que presentaría un marcador molecular de 1kb, el carril B muestra el perfil original del fragmento antes de la restricción cuya medida, para este ejemplo. Sería de ~900 pb, el carril C representa el caso de que la muestra hubiera sido sometida a la restricción, el carril D muestra la completa restricción del fragmento por la endonucleasa selectiva que ha cortado el fragmento de 900 pb en dos fragmentos más pequeños (para la circunstancia específica de que solo se halle un solo sitio de restricción), el primero de ~600 pb y el segundo de ~300 pb; el carril E representa el caso en que se hubiera encontrado sitios de restricción en algunas cadenas resultante de la amplificación, sin embargo, la presencia de banda correspondiente al tamaño original muestra que no todas las cadenas contenían el sitio de restricción buscando, por la que existe una mezcla de especies.

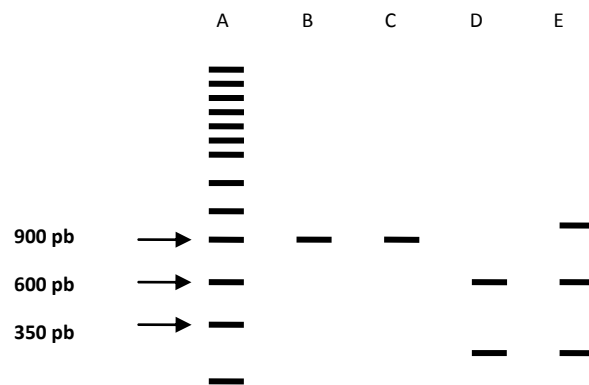


Figura 2.5. perfil electroforético de un gel con muestra digeridas utilizando enzimas de restricción.

La prueba RFLP muestra por lo tanto, su capacidad para diferenciar muestras que por la utilización de primers específicos (incluso cuando se han utilizado primers específicos para una especie) no han podido ser diferenciadas, pero sobre todo, su potencial para detectar contaminación por especies extrañas que, para la industria alimentaria, es de vital importancia.

Se ha demostrado la necesidad de ampliar zonas con un alto contenido en mutaciones, (Ej. la zona de citocromo b del DNA Mitocondrial), para hacer posible la localización de sitios de restricción específicos de la especie buscada, que a su vez no se repitan en otras especies. De este modo se encontraría un protocolo específico para la autenticación de dicha especie. **(13,14)**

A nivel comercial se han desarrollado algunos protocolos que utilizan este método para la identificación de especies animales en alimentos, principalmente cerdo, cordero, pollo y pavo e incluso pescados y mariscos. Los protocolos están disponibles en Europa, donde la Universidad Complutense de Madrid es uno de los principales proveedores de este tipo de protocolos ofreciendo la adaptación tecnológica y capacitación a los organismos interesados en este tipo de metodologías de autenticación. **(48)**

Los métodos están basados en la amplificación por PCR con primers universales y su posterior digestión con enzimas de restricción específicas de la especie, de acuerdo a los polimorfismos que presenten las secuencias a diferenciar. Por este medio se pueden identificar a la especie adulterante inequívocamente (en el caso de que existiera), sin embargo, este tipo de análisis pueden llegar a ser muy costosos cuando solo se quiere autenticar a la especie que cierto producto involucre, especialmente por los costos que pueden llegar a ser las enzimas de restricción. **(48)**

2.2.4.5 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)

Después de que la reacción es utilizada la misma región del DNA a partir de diferentes especies, generalmente una parte del gen citocromo b del DNA mitocondrial, se procede a una desnaturalización de las dobles cadenas producidas, que pueden llevarse a cabo utilizando un solvente desnaturalizador; las cadenas simples de DNA adoptan una estructura secundaria que es dependiente de su secuencia. Con electroforesis en gel de poliacrilamida, bajo condiciones apropiadas, los productos con diferentes estructuras secundarias expresan diferentes movilidades electroforéticas y se obtienen diferentes patrones con pequeñas diferencias en las secuencias de nucleótidos produce una migración diferente de las cadenas simples. **(39,43)**

La técnica es simple, rápida y suficientemente sensible para detectar el cambio de una base o algunas diferencias en fragmentos cortos de la secuencia del DNA. **(63)**

Los análisis SSCP y RFLP consumen menos tiempo y dinero que la secuenciación y son más convenientes para la identificación rutinaria de las especies. **(43)**

Capítulo 3. Metodología Experimental

3.1 Cuadro metodológico

Ver Figura 3.1 Cuadro metodológico pag. 53

3.1.1 Descripción del cuadro metodológico

El objetivo general del trabajo es establecer una metodología experimental para la autenticación de bacalao de distintos orígenes, aplicando la técnica de PCR, el cual se basa en la identificación y amplificación de regiones muy específicas de DNAMt para detectar adulteraciones en los productos.

La metodología del presente trabajo se divide en 5 partes, el primer objetivo pertenece a la extracción del DNA. Se planteó así, ya que el estudio inicia a partir del DNA ya extraído, además, dicha actividad, provee de muestras para las subsiguientes objetivos particulares.

La metodología experimental queda ordenada de la siguiente manera:

O.P.1 Extraer y cuantificar el DNA total de las muestras, para lograr soluciones de DNA listas para el análisis por medio de PCR.

Act. 1. Extracción de DNA a partir de todas las muestras requeridas.

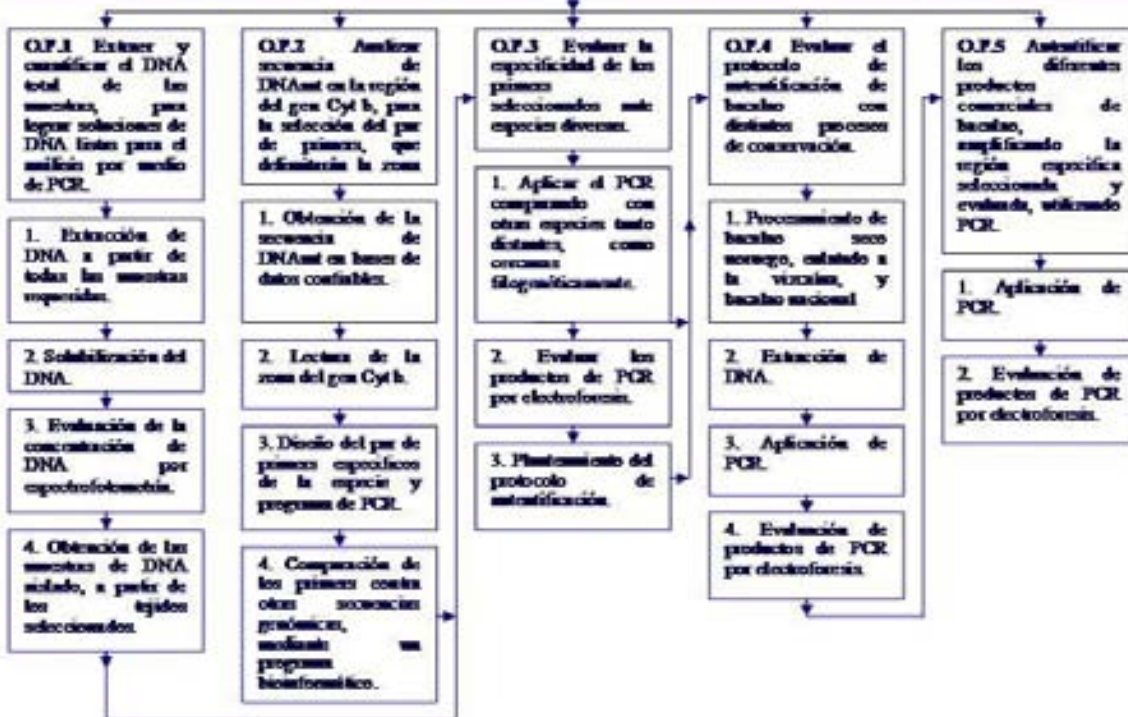
Act. 2. Solubilización del DNA.

Act. 3. Evaluación de la concentración de DNA por absorbancia.

Obtención de las muestras de DNA aislado, a partir de los tejidos seleccionados.

Figura 3.1 Cuadro metodológico

Objetivo General: Desarrollar un protocolo para identificar bacallos (*gadus maculatus*) de distintos productos de interés comercial en México por medio de la amplificación de regiones específicas del gen citocromo b, localizadas en el ADN mitocondrial, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



O.P.2 Analizar secuencia de DNAm^t en la región del gen Cyt b, para la selección del par de primers, que delimitarán la zona.

1. Obtención de la secuencia de DNAm^t en bases de datos confiables.
2. Lectura de la zona del gen Cyt b.
3. Selección del par de primers de acuerdo a criterios establecidos.
4. Comparación de los primers contra otras secuencias genómicas, mediante un programa bioinformático.

O.P.3 Evaluar la especificidad de los primers seleccionados ante especies diversas.

1. Aplicar el PCR comparando con otras especies tanto distantes, como cercanas filogenéticamente.

2. Evaluar los productos de PCR por electroforesis.

Planteamiento del protocolo de autenticación.

O.P.4 Evaluar el protocolo de autenticación de bacalao con distintos procesos de conservación.

1. Procesamiento de bacalao seco noruego, enlatado a la vizcaína, y bacalao nacional.

2. Extracción de DNA.

3. Aplicación de PCR.

4. Evaluación de productos de PCR por electroforesis.

O.P.5 Autenticar los diferentes productos comerciales de bacalao, amplificando la región específica seleccionada y evaluada, utilizando PCR.

1. Aplicación de PCR.

2. Evaluación de productos de PCR por electroforesis.

Finalmente esto puede continuar con un protocolo para distinguir entre especies con estrecha relación filogenética a partir de estudios de secuenciación y RFLP. Esto se tratará mas adelante en el capítulo 5 Conclusiones.

3.2 Materiales

3.2.1 Material biológico

De acuerdo a lo que se describe en el cuadro metodológico, las muestras objetivo requeridas fueron las siguientes:

Muestras en fresco	Muestras procesadas
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Bacalao seco noruego
Pollo (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Bacalao procesado noruego
Porcino (<i>Sus crofa domestica</i>)	Bacalao procesado español
Salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	
Romero (<i>Centrolabrus trutta</i>)	
Rubia (<i>Lutjanus inermis</i>)	
Bacalao fresco nacional	

Tabla 3.1 Muestras frescas y procesadas.

Bacalao procesado noruego

Tipo	Bacalao procesado a la criolla noruego
Marca	Campo mar
Presentación	Frasco en conserva de 925 g contenido neto.
Lote	061203 03:43
Caducidad	05/12/04
Origen	México
Elaborado por:	Productos exquisitos S.A. de C.V. pasillo 1 local 16-A, Central de abastos. CP. 09040, Del. Iztapalapa, México D.F. (Tel. 56-46-56-77)
Ingrediente	Salsa de jitomate, bacalao noruego seco, aceite de oliva, aceite vegetal

ntes	hidrogenado, aceitunas, chiles largos, especias, ácido citrico y ácido lactico como reguladores de pH.
Precio producto	\$100
Precio por Kg	\$108.11

Bacalao seco salado noruego

Tipo	Bacalao seco salado noruego
Marca	Centros selectos faro E
Presentación	Filetes secos salados de peso variable
Lote	0110
Caducidad	-
Origen	Madrid, España
Elaborado por:	Gaytán S.A. Ctra. Madrid – Erún 63. Apartado 46. (Tel. 947-34-72-58). Miranda de Ebro, Burgos, España.
Ingredientes	Bacalao seco noruego, sal.
Precio producto	\$120
Precio por Kg	\$240

Bacalao procesado

Tipo	Bacalao procesado a la vizcaina
Marca	Vigilante
Presentación	Enlatado, peso neto 115 g, peso escurrido 72 g
Lote	Liaba 11.03.5
Caducidad	Diciembre 2007
Origen	España
Elaborado por:	Justo Lopez Valcarcel, S.A. 36208 Vigo – España
Ingredientes	Bacalao, aceite vegetal, tomate, cebolla, especias, sal.
Precio producto	\$34.80
Precio por Kg	\$302.6

Tabla 3.2 Muestras Procesadas

De cada una de las muestras se extrajo un peso aproximado a 50 gramos, que fue molido y homogenizado. Las muestras así tratadas se mantuvieron en congelación por periodos no mayores a 15 días hasta llevar a cabo la extracción de DNA

3.2.2 Reactivos y productos biológicos

Los reactivos y productos biológicos que se muestran, a continuación se agrupan de acuerdo al método en el que fueron empleados:

Extracción de DNA:

- Agua desionizada o bidestilada con pH de 7.
- Solución de lisis (Tris base 50mM, pH = 8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%
- Enzima proteasa a concentración de 20mg/ml marca Qiagen
- Mezcla Fenol – Cloroformo – alcohol isoamilico, en proporción 25:24:1
- Etanol frío

Amplificación (PCR)

- Kit de PCR marca Promega que contiene:
- Agua libre de nucleasas.
- PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA Polimerasa, 400 μ M de cada dNTP y 3mM de MgCl₂).
- Pareja de Primers producidos por InvitroKen.

Primer BAC-F: CCC TCC AAT ATC TCA GTA TG

Primer BAC-R: GCT CCT CAG AAT GAT ATT TG

Electroforesis

- Agarosa marca Gibco ERL, Life Technologies.
- Tris Acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8.
- Bromuro de etidio en concentración de 10mg/ml.
- Marcador de peso molecular de 1kb marca Promega
- Tinte cargador azul/naranja 6X, marca Promega.

Purificación de DNA

- Mezcla de enzimas hidrolíticas Exo SAP-IT marca USB.

3.2.3 Equipo utilizado

- Agitador Vortex marca Lab-Line, modelo Super Mixer 1290.
- Balanza Analítica Electrónica Ohaus, modelo AS200
- Calentador para tubos eppendorf, modelo Multi-Blok, marca Lab-Line
- Espectrofotómetro marca WPA, modelo UV1101 Biotech Fotometer
- Microcentrifuga refrigerada marca Scrvall RMC 14
- Termociclador marca Perkin Elmer modelo Gene Amp PCR system 2400
- Juego de micropipetas marca Finnpiet de volúmenes desde 0.5µl hasta 1000µl
- Cámara de electroforesis horizontal pequeña de 16x4x6.5 cms (Largo x alto x ancho). con un área de soporte del gel de 7.5 x 5 cm, Largo x ancho).
- Cámara de electroforesis horizontal grande marca BRL, modelo Horizorn 11:14.
- Fuente de poder marca EC, modelo EC105
- Fuente de poder marca Biorad, modelo Power Pac 1000.
- Secuenciador automático modelo 3100 Genetic analyzer

- Horno de microondas marca Panasonic
- Transiluminador marca UVP modelo M-15E
- Transiluminador marca Cole Parmer, modelo 9814 series tables.
- Equipo de Fotografía para luz UV marca Kodak Digital .Science. (Cámara fotográfica DC40, software: Kodak. Digital Scierce 1D Versión 2.0.2.
- Autoclave

3.3 MÉTODOS

Es necesario contar previamente con un par de primers, que en este caso, es con los que se llevará a cabo la reacción, ya que de este paso depende el éxito de un buen amplificado.

En el presente trabajo se seleccionó un par de primers y fueron revisados en un programa bioinformático: Fasta 3 del European Bioinformatics Institute, mostrando una excelente afinidad con la especie de interés, para posteriormente ser secuenciados para la experimentación. Dicho primer fue retomado de la bibliografía y fue publicado por Kocher en 2001, aunque también existen otros trabajos para bacalao con distintos primers, éste resultó ser el más adecuado para este trabajo debido a su alta especificidad con la especie de estudio según el programa bioinformático.

3.3.1 Extracción de DNA total a partir de tejido muscular

Para la extracción de DNA de las muestras de alimentos se utilizó un protocolo a partir del protocolo clásico descrito por Sambrook, J. 2001 que está basado en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasas, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y la precipitación del DNA con etanol. El protocolo completo se describe a continuación: **(50)**

Disgregación del tejido:

Enjuagar el tejido con agua estéril y no tocarlo con las manos. usar guantes.

Congelar una porción de tejido (en nitrógeno líquido o en congelador normal)

Moler el fragmento de carne utilizando un mortero

Pesar 0.125 gr de carne en un tubo Eppendorf

Adicionar 1.25 ml de solución lisis

Agitar con vortex hasta que se visualicen pedazos más pequeños.

Adicionar 7µl de enzima proteasa previamente concentrada a 20 mg/ml

Incubar los tubos a 50°C en termoblok por 2 horas.

Desactivar la enzima manteniendo la temperatura del termoblok a 60°C por lo menos una hora.

Extracción de proteínas y polisacáridos:

1. Adicionar al tubo que contiene la muestra, 0.25 ml de la mezcla de fenolcloroformo-alcohol isoamílico.
2. Mezclar el tubo varias veces suavemente
3. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente.
 4. Separar las fases, recuperar la fase acuosa superior que contiene el DNA. Evitar recuperar cualquiera de las otras fases.
5. Trasladar la fase recuperada a 2 tubos eppendorff nuevos

Precipitación de DNA

1. Adicionar 1.5ml de etanol frío a cada tubo
2. Mezclar suavemente (puede aparecer turbidez y luego desaparecer)
3. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min.
4. Decantar el etanol y dejar secar el DNA en incubadora a 31°C colocando los tubos en forma horizontal. El DNA debe visualizarse pegado al tubo como una mancha blanca.
5. Una vez eliminado el etanol, se adiciona agua desionizada para resuspender DNA agitando suavemente el tubo hasta si completa disolución.
6. Cuando la solución presenta partículas insolubles, se reintenta la extracción de proteínas y polisacáridos con fer~á-cloroformo-alcohol isoamílico, y se vuelve a lavar con etanol.

3.3.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia a 260 nm

Este método es útil para preparaciones de ácidos nucleicos altamente puras, pues se detecta cualquier compuesto que absorbe la luz significativamente a 260 nm. lo cual incluye, por ejemplo. DNA. RNA. EDTA y fenol. La relación de absorbancia a 260 nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA y RNA con proteínas. puesto que los aminoácidos aromáticos absorber la luz a 280 nm. En este caso, solo un nivel significativo de proteína en, la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia de ambas longitudes de onda. **(67)**

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260 y 280 nm. La lectura de 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de densidad óptica corresponde a aprox. 50µg de DNA de doble hebra. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tienen valores de 1.8, mientras que valores de 2 muestran la existencia de preparaciones puras de RNA. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.8. entonces no puede cuantificar el DNA presente en la solución. **(67, 79)**

El protocolo utilizado se describe como sigue:

1. Tomar una muestra de 10µL de DNA y se adicionan 490µl de agua destilada, de modo que se conserve una proporción 1:50.
2. Realizar las mediciones de absorbancia a 260 y 280 para cada una de las muestras en el espectrofotómetro con emisión de luz UV utilizando celdas de 1 cm² y 500µl de volumen. Con los valores resultantes se obtiene:

$$\frac{Ab_{260}^s}{Ab_{280}^s} = 1.8 - 1.9$$

Sabiendo, por tanto, que una unidad de A_{260} corresponde a una concentración de $50 \mu\text{g} / \text{ml}$, la concentración de DNA se obtiene del siguiente modo:.

$$[\text{mg}/\text{ml}] = Abs_{200} \times \frac{50\text{mg}}{\text{ml}} \times \frac{\text{Vol. Final}}{\text{Vol. Inicial}} \times \frac{1\text{ml}}{100\text{ml}}$$

$$[\text{mg}/\text{ml}] = Abs_{200} \times 50\text{mg}/\text{ml} \times \text{Vol. Final}/\text{Vol. Inicial} \times 1\text{ml}/100\text{ml}$$

donde la concentración está dada en mg/ml y los términos involucren el valor dado de Abs a 260 nm, la concentración correspondiente a una unidad de absorbancia, la dilución, de la solución de DNA, que para el caso es $500\text{ml}/10\text{ml}$, y por último, el factor de conversión de ml a μl . **(67, 79)**

3.3.3 Ampliación de DNA

3.3.3.1 Preparación de la reacción

Para la preparación de la reacción ha sido fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes (Primers y DNA). Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 250mM , mientras que el DNA requiere una concentración relativamente baja puesto que, teóricamente, una sola copia de DNA debería ser suficiente para una adecuada

amplificación, sin embargo, la extracción del DNA implica la colecta de millones de cadenas originales. Experimentalmente se utilizó una solución de DNA de aprox. $3.5 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$. (42)

La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo que precisa Promega para el kit de PCR. Los componentes se prepararon en tubos de 25ml como se muestra en la tabla 3.1.

Componente	Volumen	Concentración final
Mezcla master mix (kit)	12.5 μl	1X
Primer 1	0.25 – 2.5 μl	0.1 – 1.0 mM
Primer 2	1.25 – 2.5 μl	0.1 – 1.0 mM
DNA	1 - 5 μl	<250 ng
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar 25 μl	N.A.

Tabla 3.3 Componentes de la PCR, preparación de los ensayos.

Cuando ya se ha ajustado la concentración de primers y DNA, el volumen aplicado para el adecuado cumplimiento de la reacción fue de 0.5ml de cada primer y 1ml de DNA.

3.3.3.2 Etapas y ciclos de reacción

La programación del termociclador se efectuó de acuerdo a la figura 3.2 las condiciones dadas están basadas en las recomendaciones de Promega para la utilización de la mezcla master mix para PCR. La etapa de hibridación se realiza a 57°C, pues debe coincidir con la Tm calculada para los primers. La etapa inicial funciona como una etapa de desnaturalización extendida, en la que se pretende desnaturalizar por completo a las cadenas originales, además se aplica para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra. La etapa final tiene como objetivo terminar de

extender las cadenas que aun estén incompletas. Nótese que la conservación del producto de PCR es a 4°C. A partir de este momento no es recomendable congelar las muestras para el posterior análisis, puesto que la formación de cristales de agua puede ocasionar daño a los fragmentos ya formados y, por tanto, una detección deficiente del producto. El programa tuvo una duración total de 1 hora 40 minutos, con 30 ciclos. **(42)**

Calculo de Tm

$$Tm = 4 (\#G + \#C) + 2 (\#A + \#T)$$

Primer	#G	#C	#A	#T	Sustitución		Tm (°C)
Tm ₁ = Bac - F	2	7	5	6	4(2+7) + 2(5+6)	36 + 22	58
Tm ₂ = Bac - R	4	4	5	7	4(4+4) + 2(5+7)	32 + 24	56

Tm recomendada para el programa en termociclador = 57°C

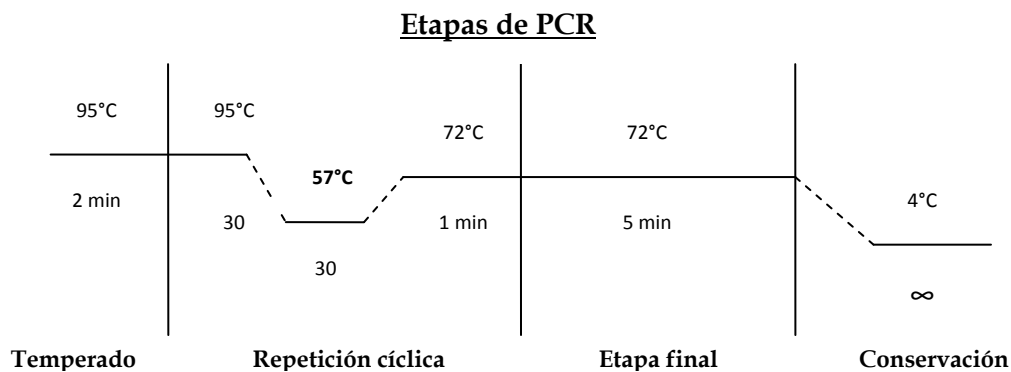


Figura 3.2 Esquematación del programa "Mario", utilizado en el termociclador

3.3.4 Analisis de productos.

3.3.4.1 preparación del gel de agarosa

Los componentes de un gel de agarosa al 2% adecuado para la electroforesis se mezclan como se presenta en la tabla 3.4

Componente	Cantidad (Gel pequeño)	Cantidad (Gel grande)
Agarosa	0.6 gr	2 gr
BrEt ¹³ en concentración de 10mg/ml	1 ml	3 ml
TAE 1X	29.4 ml	98 ml

Tabla 3.4 Componentes de un gel de agarosa para electroforesis

El método de preparación simplemente sigue el siguiente protocolo:

1. Se cierran las aperturas laterales del soporte del gel.
2. Se pesa la agarosa y adicionar el TAE 1X, es preferible que la mezcla se realice en un vaso de precipitado largo de 200 ml.
3. En este momento es preciso pesar la mezcla.
4. La mezcla es calentada en horno de microondas a potencia baja hasta que quede bien disuelta.
5. Nuevamente se pesa la mezcla y se añade agua hasta que se iguale el peso inicial de la mezcla.
6. Se añade el BrEt y se mezcla bien.

7. La mezcla se vierte en el soporte cuidando que no se formen burbujas, si se forman es preciso removerlas. Inmediatamente después se colocan los peines.
8. Se deja solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire.
9. Antes de cargar el gel con muestra, se retiran los y se coloca el soporte con el gel en la cámara de electroforesis; por último es indispensable adicionar TAE 1X a la cámara de modo que el gel quede cubierto.

El gel puede ser conservado a temperatura de refrigeración, siempre que se encuentre sumergido en buffer TAE 1X.

3.3.4.2 Electroforesis horizontal (carga y corrida del gel)

La técnica de electroforesis horizontal es capaz de separar fragmentos que no pueden ser separados por otros procedimientos. La utilización de agarosa para la separación de moléculas de DNA del tamaño esperado de este estudio, es fundamental pues, mientras que un gel de poliacrilamida puede diferenciar moléculas con un rango de desigualdad de tan sólo 1 pb, no es capaz de soportar moléculas mayores a 500 pb. La agarosa tiene un poder de resolución menor, sin embargo, tiene un mayor rango de separación (50 a 20,000 pb)

La resolución y el grado de migración, sin embargo, de los fragmentos de DNA en el gel, dependen en cierto grado, del voltaje aplicado. Para obtener la resolución máxima de los fragmentos de DNA >2 kb en tamaño, los geles de agarosa deben correr a no más de 5 a 8 V/cm.

(67)

La técnica se ha llevado a cabo, por tanto, a 70V en un gel de 7.5cm de largo. Los posillos del gel se cargaron de acuerdo a los volúmenes que se especifican en la tabla 3.5, siguiendo el protocolo contiguo.

COMPONENTE	VOLUMEN
BrEt 0.01 /ml	3 μ l
Blue Orangen 6x Loading Dye	4 μ l
Muestra o agua o marcador de peso molecular	5 μ l

Tabla 3.5 volumen de los componentes utilizados en la electroforesis

1. En el trozo de parafina se sitúa gotas de colorante (tinte cargador azul/naranja 6x) como numero de muestras + blanco + marcador de peso molecular, evitando incorporando burbujas de la gota.
2. Posteriormente se añaden las gotas de BrEt adjuntas a las gotas de colorante sin que se mezclen.
3. Finalmente se adicionan las gotas de muestra, o agua en el caso de blanco, o marcador de peso molecular. Una a una se mezclan con los siguientes componentes, se recojan y se depositan en el posillo correspondiente.
4. Cuando se ha terminado de cargar el gel, se cierra la cámara y se conecta a la fuente de poder (80V), el cátodo se conecta en el extremo cercano a los posillos de modelo que la molécula mire hacia el ánodo.
5. La corriente dura hasta que el colorante se visualice cerca del extremo contrario.

3.3.4.3 Fotografías de los geles

Las fotografías de los geles se tomaron utilizando una cámara Kodak DC40 especial para fotografía geles teñidos con bromuro de estudio e iluminados con luz UV. Estas condiciones son esenciales para el análisis para la detección del bromuro de etido intercalado en los fragmentos de DNA presentes en el gel, esto es debido a que la radiación UV es absorbida a 254 nm por el DNA y transmitida al colorante. El colorante unido por si mismo absorbe la luz a 302 nm y 366 nm. En ambos casos, la energía es re-emitida a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. (67)

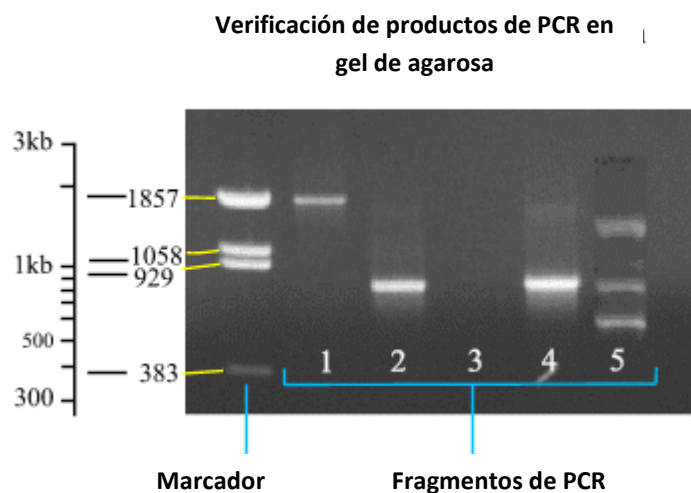


Figura 3.3 Fotografía de geles por iluminación UV

El gel se fotografía de acuerdo con la figura 3.3 y la imagen se envía a un ordenador que la procesa en el software adecuado (Kodak Digital Science 1D Versión 2.0.2).

3.3.5 Purificación de DNA

Para la purificación de DNA se utilizó ExoSAP-IT. El cual prepara los productos de la PCR para la secuenciación, eliminando los primers sobrantes y los dNTP's sobrantes directamente al producto PCR: las enzimas están activas en el buffer usado para PCR

1. A 5 μ l del producto de PCR, se añaden 2 μ l de ExoSAP-IT. La mezcla se efectúa en un tubo para PCR nuevo.
2. Se agita el tubo y se incuba a 37°C por 15 minutos en el termociclador.
3. ExoSAP-IT se inactiva elevando la temperatura a 80°C por 15 minutos en el termociclador.
4. El producto, una vez tratado, debe ser almacenado a -20°C hasta que se use en la secuenciación.

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Diseño y selección de primers

Pese a que se revisó en artículos y publicaciones de interés, no se encontró una gran variedad de primers utilizados y de especificidad para el presente trabajo, ya que se utilizaron en la mayoría de los trabajos primers universales. Uno de los pocos primers de utilidad para el presente trabajo fue publicado por Kocher (36). Después de ser revisado en un programa bioinformático, se da luz verde para su implementación en el presente, aunque cabe mencionar que solo distingue bacalao de otras especies, por lo cual si se desea distinguir entre variedades de bacalao, es necesario plantear un RFLP. (14,18, 30)

El genoma mitocondrial del bacalao *gadus morhua* se muestra en la figura 4.1. La zona de interés, corresponde al gen **cyt b** que comprende 359 pb localizados del 14412 al 14771.

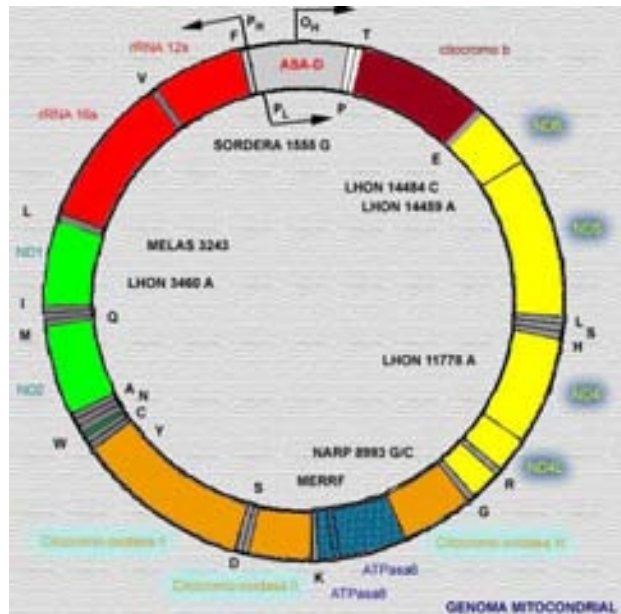


Figura 4.1 Ejemplo de genoma mitocondrial

Debido a la alta especificidad del gen *cyt b* se optó por trabajar con dicha zona, además de seguir las recomendaciones señaladas en el capítulo 2, así mismo en base a la secuencia obtenida en el National Center for Biotechnology Information (NCBI)

A continuación se muestra la tabla de selección y diseño de primers, con las características de los primers utilizados.

Nombre	BAC-F
Secuencia 5´ a 3´	CCC TCC AAT ATC TCA GTA TG
Posición en el genoma mitocondrial (<i>cyt b</i>)	14412 al 14432
Longitud	20 pb
Contenido de GC	45%
Contenido de AT	55%
Temperatura de fusión	58°C
Coefficiente de extinción mili molar (DO/μmol)	207.7

Nombre	BAC-R
Secuencia 5´ a 3´	GCT CCT CAG AAT GAT ATT TG
Posición en el genoma mitocondrial (<i>cyt b</i>)	14752 al 14771
Longitud	20 pb
Contenido de GC	40%
Contenido de AT	60%
Temperatura de fusión	56°C
Coefficiente de extinción mili molar (DO/μmol)	218.4

Tabla 4.1 Selección y diseño de primers

Seleccionados los primers, se espera amplificar una zona de aproximadamente 359 pb, dichos primers fueron analizados en un programa bioinformático (Fasta 3 del European Bioinformatics Institute), Donde se comparó con las distintas secuencias existentes en dicha base de datos. Las secuencias de los primers, mostraron afinidad con la especie de interés.

Para ambos casos (BAC- F y BAC-R), se encuentra una afinidad del 100% con gadus morhua. Por lo que se puede decir que son altamente específicos para el estudio en cuestión.

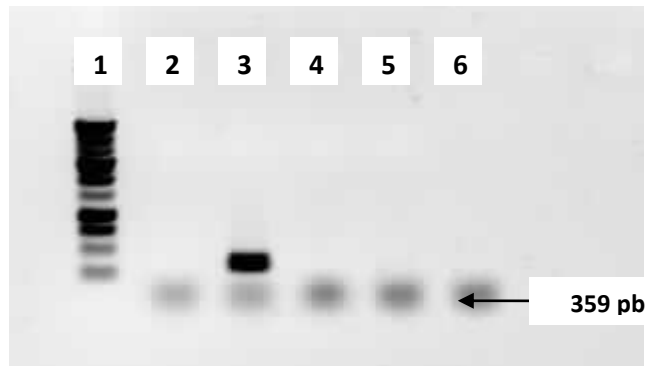
4.2 Evaluación experimental de los primers

Las corridas se acomodaron a manera de verificar la alta especificidad de los primers, primero se comparó con especies filogenéticamente distantes, segundo se corrió con especies marinas, relativamente distantes filogenéticamente y tercero con distintos tipos de bacalao comercial con diferentes procesos de conservación tales como seco y enlatado, donde radica el objetivo del presente trabajo.

Es necesario mencionar que los procesos termicos y los aditivos pueden influir en la coloración e intensidad del amplificado.

4.2.1 Grupo 1 Especies lejanas filogenéticamente.

La primer corrida del experimento se realizó con la finalidad de demostrar que los primers no amplifican con especies de interés alimentario, tales como cerdo, pollo y res. Tal como se muestra en la figura 4.2



**1: Marcador, 2: Blanco, 3 Bacalao, 4 Pollo,
5: Cerdo y 6 Res.**

Figura 4.2 Especies lejanas filogenéticamente

En la figura se puede ver la fotografía del gel de agarosa que lleva el producto de PCR con los primers BAC-F y BAC-R. En el carril 1 se muestra el marcador, en el carril 2 se encuentra el blanco, en el carril 3 se encuentra muestra de bacalao el cual se aprecia perfectamente que amplificó una banda esperada de entre 250 y 500 pb; a diferencia de los carriles 4, 5 y 6 los cuales contienen pollo, cerdo y res, respectivamente y como se esperaba, no amplificaron.

Así mismo se demuestra en primera instancia la especificidad de los primers, ya que no amplifica con especies filogenéticamente lejanas.

4.2.2 Grupo 2 Especies marinas lejanas filogenéticamente.

En esta segunda etapa el objetivo es comprobar que estos primers son específicos aun con especies marinas, las cuales a pesar que son de especies de diferentes familias a los gálidos, no son tan distantes como el cerdo, pollo o res. Cabe mencionar que algunas de estas especies pueden ser adulterantes dadas las circunstancias sustituyendo el bacalao de algún producto.

Como se muestra en la figura 4.3, la fotografía del gel de agarosa, en el carril 1 se encuentra el marcador, en el carril 2 se encuentra el blanco, en el carril 3 se encuentra muestra de bacalao y claramente se aprecia el amplificado esperado a diferencia de los carriles 4, 5 y 6 los cuales contienen muestra de romero, rubia y salmón, respectivamente; no cabe duda de la especificidad de los primers, ya que para ningún caso que no se contenga muestra de bacalao se aprecia amplificado.

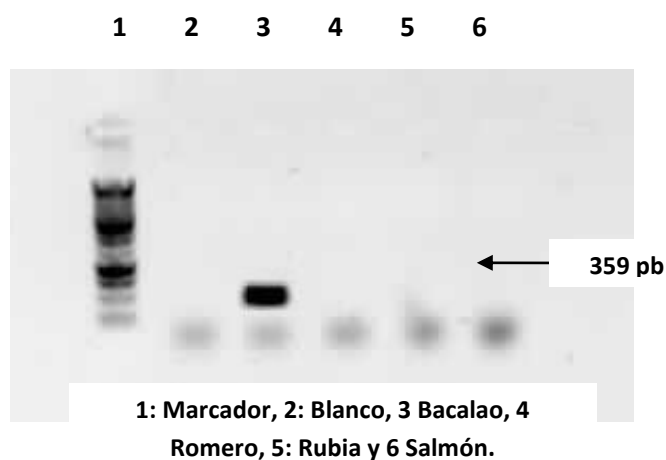


Figura 4.3 Especies marinas filogenéticamente distantes.

4.2.3 Grupo 3. Tipos distintos de bacalao comercial.

Este grupo se compone de variedades de bacalao tanto en productos como en origen, así mismo, se encontró en el mercado una muestra de bacalao “nacional”, aunque es bien sabido que el bacalao como tal no se produce en el país, pero si se encuentra una variedad de cazon con características organolépticas similares al bacalao noruego (sobre todo una vez, que se encuentra cocinado). Así mismo, como se muestra en la figura 4.4, se aprecia que para este caso no amplifica, lo cual demuestra que no se trata de alguna variedad de gadus morhua.

En la figura 4.4 se muestra en el carril 1 el marcador, en el carril 2 el blanco, en el carril 3 el tradicional bacalao seco noruego de gran importancia comercial en nuestro país, en el carril 4 contiene bacalao procesado noruego, el cual se encuentra en presentación de bacalao a la vizcaína, en el carril 5 se adicionó muestra de bacalao procesado de origen español, el cual se comercializa enlatado con salsa y por ultimo se encuentra el bacalao “nacional” el cual perfectamente se aprecia que no amplificó.

Para el caso de los bacalaos procesados (carriles 4 y 5), se nota que las bandas de amplificado son tenues a comparación con la banda de amplificado del bacalao seco, dicha diferencia en intensidad radica en el hecho de que al momento de someter la muestra a un tratamiento térmico, este degrada parte del DNA del bacalao, haciendo menos disponible en cantidad y por consecuente en intensidad la banda de amplificado. Así mismo, con esto se demuestra la efectividad de la técnica de PCR, ya que pese a un tratamiento térmico, se puede obtener un resultado, a diferencia de alguna técnica proteica las cuales necesitan condiciones menos adversas para llegar a un resultado confiable.

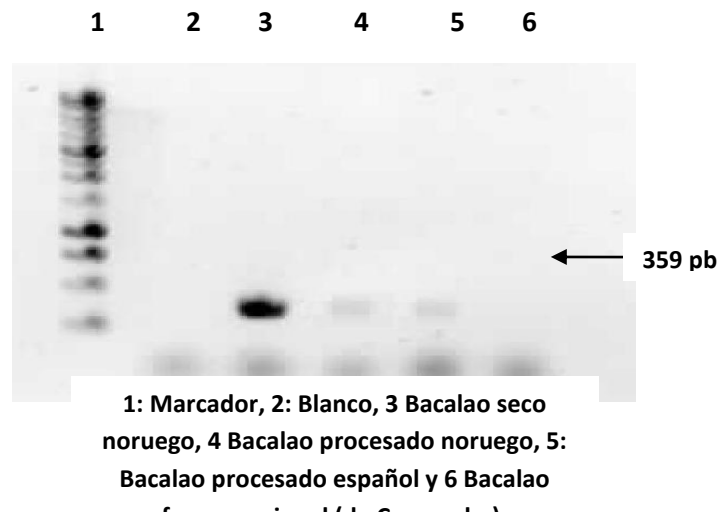


Figura 4.4 Tipos distintos de bacalao comercial (*gadus morhua*)

Después de apreciar las diferentes pruebas con diferentes variedades tanto lejanas como cercanas filogenéticamente, podemos llegar a lo siguiente:

1. Experimentalmente se demostró en primera instancia la especificidad de los primers con especies lejanas filogenéticamente y con alto interés comercial en México.
2. Así mismo fue para el caso de las diferentes especies marinas, que como ya se mencionó, son posibles adulterantes o en el peor de los casos sustitutos del bacalao.
3. La prueba de PCR funciona a pesar de tratamientos térmicos extremos y por lo tanto, lo hace una técnica con ventajas frente a otras.
4. Para el caso de los primers, se demostró que son altamente específicos lo cual es de importancia para algún estudio posterior.

4.3 Planteamiento del protocolo de autenticación

Una vez obtenidos los resultados experimentales, se puede plantear un protocolo para la autenticación de bacalao basado en la técnica de PCR, usando los componentes de la reacción de amplificación como a continuación se aprecia.

Primeramente se necesita una extracción de DNA, la cual se debe llevar a cabo como se menciona en el capítulo 3 (3.3.1 Extracción de DNA total a partir de tejido muscular). La reacción se debe preparar tal y como se menciona en el capítulo 3. En cuanto a los primers, deben ser los utilizados en la experimentación (BAC-F y BAC-R) mencionados en el apartado 4.1 diseño y selección de primers.

4.4 Autenticación de productos de bacalao

La autenticación de los productos de bacalao se llevo a cabo utilizando el protocolo ya planteado, donde se aprecia claramente el buen funcionamiento de los primers; aún en productos sometidos a tratamientos térmicos; la única condición para que amplifique es que sea bacalao (gadus morhua autentico). Entonces, puede decirse que las muestras de los productos utilizados para el presente trabajo, son autenticas, a excepción del bacalao “nacional”.

4.5 Desarrollo para protocolo de RFLP

Cabe mencionar que solo se puede proponer esta parte del trabajo, ya que por falta de disponibilidad de muestras, y costo, no se pudo concluir hasta llegar al desarrollo de una

secuenciación y posteriormente una selección de una enzima de restricción, mediante el análisis de los sitios de restricción.

Ya una vez obtenidos los productos del PCR del bacalao de distintos orígenes, es necesaria una secuenciación, ya que como se observó en la base de datos, existen diferencias ligeras entre variedades de la especie. Posteriormente se analizan los sitios de restricción mediante un programa bioinformático (Cromas pro 1.13 y Redasoft Visual Cloning 3.0) para seleccionar la enzima de restricción, y volver a hacer un PCR con su respectiva electroforesis y así visualizar las diferencias entre variedades de bacalao.

Propuesta de diseño de RFLP

El diseño del protocolo para la realización de RFLP es una propuesta a modo que permita diferenciar entre las especies mas susceptibles a la adulteración y por lo tanto, a la autenticación.

El diseño es simple y fácil de plantear siempre que se cuente con el apoyo de un programa bioinformático, como es el caso del ChromasPro versión 1.13 o Redasoft Visual Cloning 3.0

El software se encarga de encontrar los sitios de restricción que engloba el fragmento, por ello, ambas secuencias se analiza, en principios, para todas las enzimas de restricción. El mapa de sitios de restricción que muestra el software es la base para la búsqueda de la enzima de restricción adecuada.

La enzima más adecuada para el caso del bacalao, es la que:

- Es capaz de dividir los fragmentos en secciones más cortas cuyos tamaños puedan ser visualizados aun en un gel donde las muestras corren junto a un marcador de peso molecular de 1kb.
- Los fragmentos obtenidos deben diferir en por lo menos 50 pb de longitud, con el fin de que la diferencia pueda visualizarse en un gel de agarosa.
- Preferentemente, el numero de fragmentos a obtener debe ser diferente entre una y otra muestra.

Tomando tales condiciones, es necesario analizar uno a uno los sitios de restricción y fragmentos resultantes para cada una de las enzimas que mostraron afinidad por los fragmentos y elegir la más adaptada para esta distinción. **(14, 19, 59)**

Capítulo 5. Recomendaciones

Los alimentos pueden ser autenticados mediante diversas técnicas; para fines del presente trabajo se escogió trabajar con especies marinas de interés comercial en México, aplicando técnicas genéticas basadas en la amplificación de fragmentos de DNA mitocondrial, amplificadas por PCR, mediante el diseño y selección de primers específicos, ya que son altamente específicas de cada especie. Así mismo la técnica de PCR puede ser seguida por otras técnicas, como el análisis de polimorfismos de restricción con endonucleasa, para identificar resultados aún más específicos después de la aplicación de PCR.

Como principio de la autenticación del bacalao, se debe contar con un primer específico de la especie, es decir, que no amplifique con ninguna otra especie, ya sea lejana o cercana filogenéticamente. En primera instancia se revisó en artículos donde se ha trabajado previamente con el bacalao, encontrando diversos tipos de primers, para distintos fines. Después de haber sido analizados por un programa bioinformático, se obtiene que el más adecuado para este estudio fue utilizado por Kocher el cual además de ser específico para la especie, era de tamaño razonable para ser aplicado a la técnica de PCR. Cumpliendo con estas características teóricas, el primer fue secuenciado para ser probado experimentalmente.

Fueron varios los intentos para la extracción del DNA mitocondrial y diversas las técnicas, tales como el uso de un reactivo llamado DNAzol, el cual supuestamente extraía de manera directa el DNA para posteriormente ser medida la concentración del mismo mediante absorbancia; el resultado no fue satisfactorio. Finalmente se optó por ser extraído por medio enzimático comúnmente utilizando, el cual dio resultados aceptables.

Posteriormente se aplicó la técnica de PCR con los primers y con diversas especies, tanto lejanas como cercanas filogenéticamente, dando como resultado la amplificación únicamente con la especie de interés, distinguiendo entre especies.

Por falta de disponibilidad de muestras, solamente se trabajó con bacalao proveniente de Noruega, aunque existen diversas regiones donde se produce; a nuestro país solamente se le permite la importación de dicho origen.

Teóricamente podría distinguirse el origen de cada bacalao, ya que como se observó, existen diferencias ligeras, entre ejemplares de la misma especie, dependiendo de su origen, esto puede ser comprobado, mediante la utilización de otras técnicas adicionales, tales como el análisis de polimorfismos de restricción con endonucleasa.

Se puede decir que las técnicas genéticas, son de uso más fácil, para la autenticación de especies, de orígenes de especies, de calidad y/o aseguramiento de calidad de productos de diversas especies tanto frescas como procesadas. Sus aplicaciones serán cada vez menos costosas y sus usos cada vez más amplios.

La culminación de este proyecto, deja un planteamiento para un desarrollo de un protocolo, para la autenticación de bacalao de gran utilidad, para los productos que entran a nuestro país, ya que claro está; el bacalao es un producto de consumo en nuestro país, y el 100% es de importación. Dicho protocolo puede ser utilizado para el sector pesquero y de distribución, ya que puede ser una poderosa herramienta de auditoria.

Del mismo modo, se puede decir que se deja como aportación la modificación de los primers utilizados en otros trabajos, de tal modo que sea más fácil su utilización para el caso específico del bacalao.

REFERENCIAS CITADAS

- 1 ÁRNASON E. Petersen P.; Mithoncondrial cytochrome b DNA sequence variation of Atlantic cod from Iceland and Greenland No.56 Journal of fish biology, 2000 pp 409-430.

- 2 Allen, G. R. 1985. FishBase, Publicación electrónica en www.fishbase.org, versión (10/2003). Accesado en Noviembre de 2003.

- 3 ASENSIO Luis, Isabel González et al., PCR-SSCP: A simple meted for the Authentication of Grouper (*Epinephelus quaza*), Wreck Fish (*Polyprion americanus*), and Nile Perch (*Lates niloticus*) fillets. Vol.49 2001, Journal of Agricultura) and Food Chemistry, pp 1720-1723

- 4 ASTIASARAN, Iciar, Alimentos: Composición y Propiedades, Mc GrawHill, España, 2000.

- 5 Bannerman, A. y Horne, J. Recommendations for the preparation of smoked salmon. Ministry of Agriculture, Fisheries and food. FAO - SIFAR. 2001.

- 6 Bardach, J. E. et. al. Acuicultura, Crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. México, AGT, 1986. 741pp.

- 7 BELITZ, Química de los alimentos, 2a edición, Acribia, España, 1997

- 8 Bernales, S. O., et. al. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of chinook salmon, *oncorhyncus tshawytscha*. Sin publicar. Revisado y divulgado por NCBI. Julio, 2001 www.ncbi.nlm.nih.gov. Accesado en Junio de 2003.

- 9 BORGIO R. C. Souty-Grosset, D.Bouchon y L. Gomot, PCR-RFLP Análisis of Mitochondrial DNA for Identification of Snail Meat Species. Vol 61 No. 1 Journal of Food Science,pp 1-4

- 10 BOSSIER P. Authentication of Seafood Products by DNA patterns critica) Review. Vol 64 No 2 Journal of Food Science, 1999, pp189-193
- 11 Bratt, L. El tratamiento térmico. Enlatado de pescado y carne. España, Acribia, 1999. 336pp.
- 12 BURGESS, GHO., El pescado y las industrias derivadas de la pesca. Acribia, España, 1981.
- 13 Carrera, E. et. al. PCR - RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: A simple method for discrimination between Atlantic salmon (*salmo solar*) and rainbow trout (*oncorchichus mykiss*). Journal of the science of food and agriculture. 79, 1654 - 1658. 1999.
- 14 Carrera, E. et. al. Salmon and trout analysis by PCR - RFLP for identify authentication. Journal of food science. (64). 3, 410 - 413. 1999.
- 15 CESPEDES A., T. García, E. Carrera et al. Identificación de Especies de Pescado 1. Técnicas basadas en el análisis de proteínas. No. 306, Alimentaria, Octubre, 1999 pp.67-82
- 16 CESPEDES A., T. García, E. Carrera et al. Identificación de Especies de Pescado II. Técnicas genéticas. Alimentaria No. 306, Octubre, 1999 pp.67-82
- 17 CESPEDES A.,García T. Identificación of Flatfish Species Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification and Restriction Analysis of the Cytochrome b gene. Vol 63 No.2 1998. Journal or food science, pp 206-209.
- 18 Chavez, M.C. La nutrición y alimentación en la agricultura de América latina y el caribe. México, centro regional de investigación pesquera. Instituto nacional de la pesca, México FAO. Julio. 1993.

- 19 COCOLIN L., E. D'Agaro M. Manzano et al., Rapid PCR-RFLP Method for the Identification of Marine Fish Fillets (Seabass, Seabream, Umbrine and Dentex), Vol. 65, No. 8, Journal of Food Science, 2000, pp 1315-1317
- 20 Dossier, P. Authentication of seafood products by DNA patterns. Journal of food science. (64), 2. 189 - 193. 1999.
- 21 Étienne, J. Bioquímica genética, Biología molecular. 3a Edición. España, Masson. 2001 . 491pp.
- 22 FAO Fisheries department, Fishery information. Data and statistics unit. www.fao.org. Accesado en Octubre de 2003.
- 23 FERNÁNDEZ A., T. García, L. Asensio et al, PCR-RFLP Analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) Region for Identification of 3 Clam Species Vol. 66, No. 5, Journal Of Food Science, 2001, pp.657-661
- 24 GALLARDO M. C., S. Serrano, M. Villarejo, M. M. Murillo y M. Jodral. Seguridad Alimentaria: Normas Sanitarias Aplicables al pescado, No. 327, Alimentaria, Noviembre, 2001, pp75-83
- 25 Gomon, M. F. y P. Forsyth. 1990. Publicación electrónica en www.fishbase.org versión (10/2003) Accesado en Noviembre de 2003.
- 26 GONZALO Claros M., Concepción Ávila et. Al. Bioquímica aplicada: Diseño Experimental y análisis de datos, SEPTEM ediciones, España, 2001
- 27 Haard, N. The role of enzymes in determining seafood color, flavor and texture. Safety and quality issues in fish processing. Inglaterra. CRC Press, 2002.

- 28 HALL, G. M. Tecnología del Procesado del Pescado, Acribia, España, 2001.
- 29 Hargin, K. D. Measurement of the fish content in fish products. Seafoods - Quality, technology and nutraceuticals applications. UK, Springer, 2002 .224pp.
- 30 Hold, G. L. et. al. Development of a DNA based method aimed at identifying the fish species present in food products. Journal of food chemistry. (49), 3, 1175 - 1179. 2001.
- 31 Horner, W. F. A. Conservación del pescado mediante curado (secado salazón y ahumado). Tecnología del procesado de pescado. España, Acribia. 2001. 35 - 77.
- 32 Hurst, C. D. et. Al. The complete mitochondrial DNA sequence of the atlantic salmon, *Salmo solar*. Gene. 239, 237 - 242. 1999.
- 33 IGFA, 2001. Publicación electrónica en www.fishbase.org. Versión (10/2003). Accesado en Noviembre de 2003.
- 34 JAQUES Monod y Jacob Francois , Biología Molecular décimo segunda edición Editorial Ciencia y Desarrollo, México, 1996.
- 35 Kietzman, U. Inspección veterinaria de pescados. España, Acribia. 1974, 326pp.
- 36 Kocher T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Eduards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 86, 6196-6200.
- 37 Ladish, et. Al. Molecular cell biology 4a Edición. Media connected, EUA, 2002 332 - 337.

- 38 LISKER Rubén y Salvador Armendares, Introducción a la Genética Humana, primera edición Editorial El Manual Moderno México, 2000.
- 39 Lockley, A. K. y Bardsley, R. G. DNA Based methods for food authentication. Trends in food science and technology. 11, 67 - 77. 2000.
- 40 LUDORFF W., El pescado y los productos de la pesca, 2a edición, Acribia, España, 1988
- 41 LUNA Martínez M.V. El papel del envase y el etiquetado en la protección del consumidor. No. 298, Alimentaria, Diciembre 1998, pp19-21
- 42 Luque, J. y Herraes, A. Biología celular e ingeniería genética. Madrid, España, Harcourt, 2001.
- 43 Mackie, I. M. et. Al. Challenges in the identification of species of Cannes fish. Trends in food science and technology. 10, 99 - 114. 1999.
- 44 Mackie, I. M. Métodos de identificación de especies de pescado fresco y procesado. Tecnología del procesado del pescado. España, Acribia, 2001. pp 169 - 208.
- 45 MADRID, A. Tecnología del Pescado y Productos derivados, Mundiprensa. España, 1994
- 46 Martinez S. et. Al. Alternativas de diseño de una granja de truchas. Volumen de producción y número de lotes anuales con dos perfiles de temperaturas. AquaTIC, 19, Diciembre 2003.
- 47 MATHEWS Christopher, Bioquímica, 2a edición McGraw Hill España, 1999

48 Métodos de identificación de especies animales en alimentos. Universidad complutense de Madrid. www.ucm.es/info/complutecno/fichas

49 MEYER Rolf y Urs Candrian, PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components, Academic-Press 1996, pp1-9

50 Meyer, R. y Candrian, U. PCR - based DNA analysis for the identification and characterization of food components. Lebensmittel - wissenschaft und- technologie, 29, 1 - 9. 1996.

51 Miler, K. B. M. y Sikorski, Z. E. Ahumado. Tecnología de los productos del mar: Recursos, composición nutritiva y conservación. España, Acribia, 223 - 245. 1994.

52 Montiel, J. F. et. Al. Detection of pork meta and fat meta products by PCR amplification of mitochondrial DNA. Journal of agricultural and food chemistry. 7, 2829 - 2832. 2000.

53 Montiel, J. F. Variabilidad genética del clado mitocondrial y astenozoospermia humana. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España, 2002. 193 pp.

54 Naczk, M. et. Al. Enlatado. Tecnología de los productos del mar: recursos, composición nutritiva y conservación. España, Acribia, 1994. 249 - 270.

55 Page, L. M. y B. M. Burr. 1991. Publicación electrónica en www.fishbase.org. versión (10/2003).

56 Popping, B. The application of biotechnological methods in authenticity testing. Journal of biotechnology. 98. 107 - 112. 2002.

57 PRESCOTT Lasing M. Y Harley Johon P., Microbiología, 4a edición Editorial Mc-Graw Hill, Madrid España, 1999

- 58 PRIMO Yúfera, Química Agrícola III, Alhambra, España, 1997
- 59 Quintero. J et. al. Use of mtDNA direct PCR sequencing and PCR - Restriction Fragment Polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. Journal of Agricultural and food chemistry. 46, 1662 - 1669. 1998.
- 60 Ram J. L and M. (1996)authentication of Canned Tuna and Bonito by Sequence and Restriction Site Analysis of polymerase chain reactiona products of mitochondrial DNA. Vol.44 No.8 J. Agric.Food Chem. Pp. 2460-2467
- 61 REHBEIN HARTMUT, Gabriele Kress y Thomas Schmidt, Application of PCR-SSCP to Species Identification of Fishery Products, Vol. 74, 1997 Journal Science and food Agricultura) pp 35-41
- 62 Rehbein, H. et. al. Application of PCR - SSCP to species identification of fishery products. Journal of the science of food and agriculture. 74. 35- 41. 1997.
- 63 Rehbein, H. et. al. Fish species identification in canned tuna by PCR - SSCP: Validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA patterns. Food chemistry. 64. 263 - 268. 1999.
- 64 Rehbronn, E. y Rutkowsky, F. Ahumado de pescados. España, Acribia, 1989. 134 pp.
- 65 Russell, V. J. et. Al. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. Journal of agricultural and food chemistry. 48, 2148 - 2188. 2000.
- 66 Salmón ahumado. Norma mexicana NMX-497-1994-SCFI. www.economia.gob.mx

67 Sambrook, J. y Russel, D. Molecular cloning. A laboratory manual. EUA. Cold spring harbor laboratory press. 2001.

68 SEBASTIO Paola, Paola Zanelli y Tauro Maria Neri., Identification of Anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt Sardine (*Sardinella aurita*) by Polymerase Chain Reaction, Séquense of Their Mitochondrial Cytochrome b Gene, and Restriction Analysys of Polymerase Chain Reaction Products in Semipreserves. 2001 No. 49, J. Agric. Food Chem, pp 1194-1199

69 Senser, F. Scherz, H. Tablas de composición de alimentos 2a Edición. España, Acribia, 1999. pp 202 - 204.

70 Sikorsky, Z. E. et. Al. Composición nutritiva de los principales grupos de organismos alimenticios marinos. Tecnología de los productos del mar: Recursos, composición nutritiva y conservación. España, Acribia, 1994. 330 pp.

71 Sotelo, C. G. y Perez - Martin, R. I. species identification in processed seafoods. Stafety and quality issues in fish processing. Inglaterra, woodhead publishing limited. 2002. pp. 450 - 474.

72 STANSBY. Maurice E., Tecnología de la Industria pesquera, Acribia. España.1978.

73 Svetovidov, A. N. 1984. Publicación electrónica en www.fishbase.org versión (10/2003).

74 Taylor M.I., Fox C., Rico C. Species-specific TagMan probes for simultaneous identification of (*Gadus morhua* L.),haddock(*Melanogrammus aeglefinus* L.) and whiting(*Mer/angius merlanpus* L.) 2002, No.2 Molecular Ecology Notes, pp599-601

75 Trucha ahumada. Norma mexicana NMX-F-548-1996. www.economia.gob.mx

76 Unidad de patología infecciosa y epidemiología, España. Especies piscícolas. www.infecipi.unizar.es/pages/piscis.

77 Universidad de Colombia. Especies piscícolas.
www.virtual.unal.edu.com/cursos/agronomia/2006228/teoria/fundam/p5.htm

78 Wegrzyn, D. Ortubay, S. Nuestros salmónidos. Edición 1991. Ministerio de recursos naturales. Provincia de Río Negro, Dirección de pesca. Argentina. 120 pp.

79 Widmer, F. y Beffa, R. Diccionario de bioquímica y biología molecular, España, Acribia, 2000. 247 pp.

80 Wolf, C. et al. PCR - RFLP Analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. Journal of Agriculture and food chemistry. 47, 1350 - 1355. 1999.

81 Wolf, C. et. Al. PCR - RFLP analysis of mitochondrial DNA: Differentiation of fish species food science and technology. (3), 2, 144 - 150. 2000.

82 Yonker, W. V. Las pesquerías de salmón. Tecnología de la industria pesquera. España, Acribia, 1969. 443 pp.

ANEXOS

Normas

Codex

Código de Prácticas para el Pescado Fresco

CAC/RCP 9-1976

Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado en Conserva

CAC/RCP 10-1976

CODIGO INTERNACIONAL RECOMENDADO DE PRACTICAS PARA LA

ELABORACION Y MANIPULACION DE LOS ALIMENTOS

CONGELADOS RAPIDAMENTE

CAC/RCP 8-1976

NORMA DEL CODEX PARA BLOQUES DE FILETES DE PESCADO, CARNE DE PESCADO

PICADA Y MEZCLAS DE FILETES Y DE CARNE DE PESCADO PICADA

CONGELADOS RÁPIDAMENTE

CODEX STAN 165-1989, Rev. 1-1995

NORMA DEL CODEX PARA FILETES DE PESCADO CONGELADOS RÁPIDAMENTE

CODEX STAN 190-1995

NORMA DEL CODEX PARA PESCADO SALADO Y PESCADO SECO SALADO

DE LA FAMILIA GADIDAE

CODEX STAN 167-1989, Rev. 1-1995

NORMA DEL CODEX PARA PESCADOS EN CONSERVA

CODEX STAN 119-1981, Rev. 1-1995

NORMA DEL CODEX PARA PESCADOS NO EVISCERADOS Y EVISCERADOS

CONGELADOS RÁPIDAMENTE

CODEX STAN 36-1981, Rev. 1-1995

Código de Prácticas Internacional Recomendado para el Pescado Congelado

CAC/RCP 16-1978

Código Internacional Recomendado de Prácticas para Elpescado Picado Preparado por

Seperación Mecanica

CAC/RCP 27-1983

Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado Salado

CAC/RCP 26-1979

NOM

Bacalao a la Vizcaina

NOM-F-386-1994

Pescado Seco Salado

NOM-F-506-1993

Pescados en Conserva

NOM-028-SSA-1993

NOM-FF-5S-1982

NORMA Oficial Mexicana **NOM-129-SSA1-1995**, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.-
Secretaría de Salud.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-129-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS.
PRODUCTOS DE LA PESCA: SECOS-SALADOS, AHUMADOS, MOLUSCOS

CEFALOPODOS Y GASTEROPODOS FRESCOS-REFRIGERADOS Y
CONGELADOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

NOM-F-361-S-1981

NOM-F-359-S-1980

NOM-F-362-S-1980

NOM-F-541-1996

NOM-F-546-1996

NOM-F-547-1996

NOM-FF-005-C-S-1982

Citocromo *b* de *Gadus morhua* X99772.

(14,344 - 15,504)

14341 ttaatggcca gccttcggaa aacctatcca atcctaaaa
ttgctaatag cgcattagtt

14401 gatctccccg cccctccaa tatctcagta tgaatgaaatt ttggctctct tctaggcctt

14461 tgcttaatta ctcaacttct aacaggacta tttctagcca taactatac ctacagacac

14521 gagacagcct tctcatccgt agtccacatc tgtcgtgatg taaactacgg ctgactaatt

14581 cggaatatac atgctaattg tgctcttttc tttttcattt gtctttatat gcacattgcc

14641 cgaggtctct attatggttc ctatcttttt gtagagacat gaaacatcgg ggttgtcctt

14701 ttctttttag taataataac ctctttogta ggttatgtcc tccctgagg acaaatatca

14761 ttctgaggag ctaccgtaat tacgaattta atatctactg ttcttatgt aggtgatgcc

14821 ttagttcaat ggatctgagg aggtttctca gtagataatg ctaccctaac tcggtttttt

14881 gcattccatt tcttattccc ctttgttggt gctgctttta caatactcca cctacttttt

14941 ctccatgaaa caggctcaaa taatcccaca ggaatcaatt caaatgcaga caaaattcca

15001 ttocacccat atttcaocta caaagaactg cttggctttg ctgtgatgct tctgggctta

15061 accgcoctcg cctctctcgc acctaattha ctoggagatc cagataattt caccctgct

15121 aaccccatcg ttaccccacc tcatgttaag ccggaatgat atttcttggt tgctatgcc

15181 atcttagct ctattcaaa taagctaggt ggcgtacttg cactcctatt ctcgattcta
15241 gtctcatgg ttgtaccctt tctccatag tcaaaacaac gaggtttaac attcgcct
15301 cttaccocaa tactattctg agtcctcgtt gcagatatac tagttcttac atgaattgga
15361 ggcgtacctg tagaacacc cttcattatc atcggacaag tggcatcagt actatatttc
15421 tcctcttcc tagttttatt ccccttgca ggaataactg aaaataaggc ccttgaatga
15481 aactgcocca gtagctcagt atagagcgc gcccttgtaa gccggaggcc gggggctaaa

ANEXOS

CORRIDA EN PROGRAMA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Corrida con distintos primers (los mejores de la anterior selección con FASTA) con distintas especies de interés para la industria de los alimentos.

Gadus morhua: Bacalao

Bos taurus: Bovino

Ovis aries: Ovino

Sus crofa domestica: Porcino

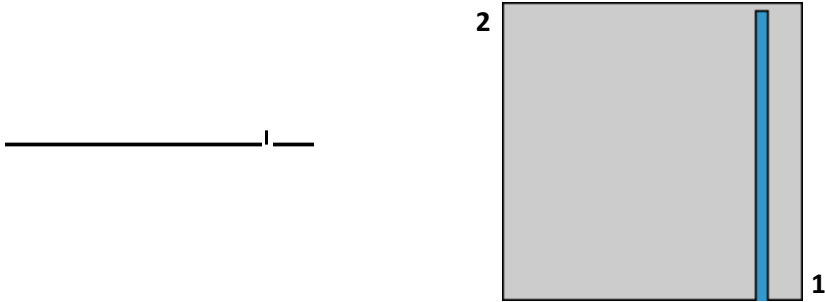
Capra hircus: Caprino

Primer 2) ccctccaatatctcagtatgatgaaa

Gadus morhua: GI:5835806. 100%

Sequence	gi	Gadus morhua mitochondrion, complete	Length 16696	(1 ..
1	5835806	genome		16696)

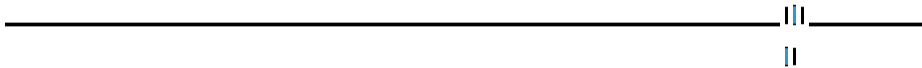
Sequence	lcl seq_2	Length 26	(1 .. 26)
2			



NOTE:The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 50.7 bits (26), Expect = 0.11
 Identities = 26/26 (100%)
 Strand = Plus / Plus



```
Query: 14413 ccctccaatatctcagtatgatgaaa 14438
          |||
Sbjct: 1      ccctccaatatctcagtatgatgaaa 26
CPU time:    0.05 user secs.      0.04 sys. secs      0.09 total secs.
```

```
Lambda      K      H
          1.33   0.621  1.12
```

```
Gapped
Lambda      K      H
          1.33   0.621  1.12
```

Bos taurus: gi:5834939. **No significant similarity was found**

Ovis aries: gi:5835554. **No significant similarity was found**

Sus crofa domestica: gi:5835862. **No significant similarity was found**

Capra hircus: gi:33150920. **No significant similarity was found**

Primer 3) cgtaggttatgtcctccc

Gadus morhua: GI:5835806 **No significant similarity was found**

Bos taurus: gi:5834939 **No significant similarity was found**

Ovis aries: gi:5835554 **No significant similarity was found**

Sus crofa domestica: gi:5835862 **No significant similarity was found**

Capra hircus: gi:33150920 **No significant similarity was found**

Primer 4) attttgctctcttagg

Gadus morhua: GI:5835806 **No significant similarity was found**

Bos taurus: gi:5834939 **No significant similarity was found**

Ovis aries: gi:5835554 **No significant similarity was found**

Sus crofa domestica: gi:5835862 **No significant similarity was found**

Capra hircus: gi:33150920 **No significant similarity was found**

COMPARACION ENTRE VARIETADES DE GADUS MORHUA

Gadus morhua vs Gadus morhua NC1

Sequence	gi 525249	G.morhua (NC1) mitochondria tRNA(Glu), tRNA(Thr), tRNA(Pro) and apocytochrome b genes.	Length 1429	(1 .. 1429)
1				

Sequence	gi 5835806	Gadus morhua mitochondrion, complete genome	Length 16696	(1 .. 16696)
2				

Score = 2748 bits (1429), Expect = 0.0
Identities = 1429/1429 (**100%**)

No hay variación.

Gadus morhua vs Gadus morhua AN1

Sequence	gi 525247	G.morhua (AN1) mitochondria tRNA(Glu), tRNA(Thr), tRNA(Pro) and apocytochrome b genes.	Length 1429	(1 .. 1429)
1				

Sequence	gi	Gadus morhua mitochondrion, complete genome	Length 16696	(1 .. 16696)
2	5835806			

Score = 2707 bits (1408), Expect = 0.0
Identities = 1422/1429 (**99%**)
Strand = Plus / Plus

Hay una ligeras variaciones.

Variación 1.

Antes de la variación

G. morhua AN1. Posición: 868 5' caccctgctaaccatcggtaccccg 3'

G. morhua. Posición: 15138 5' caccctgctaaccatcggtacccca 3'

Después de la variación.

G. morhua AN1. 5' gcctcatgtaagcccgaatgatatttctgtt 3' 900

G. morhua. 5' acctcatgtaagcccgaatgatatttctgtt 3' 15170

Variación 2.

Antes de la variación

G. morhua AN1. Posición: 934 5' tgcctatgcatcttacgctctattccaaataa 3'

G. morhua. Posición: 15204 5' tgcctatgcatcttacgctctattccaaataag 3'

Después de la variación.

G. morhua AN1. 5' actagtgccgtacttgactcctatt 3' 960

G. morhua. 5' gctagtgccgtacttgactcctatt 3' 15230

Variación 3.

Antes de la variación

G. morhua AN1. Posición: 986 5' ctgattctagcctcatggttg 3'

G. morhua. Posición: 15256 5' ctgattctagcctcatggttga 3'

Después de la variación.

G. morhua AN1. 5' gccctttctccatacgtcaaaacaacgaggtttaac 3' 1020

G. morhua. 5' accctttctccatacgtcaaaacaacgaggtttaac 3' 15290

Variación 4.

Antes de la variación

G. morhua AN1. Posición: 1208 5' atgaattggaggcgtacctgtagaacat 3'

G. morhua. Posición: 15378 5' atgaattggaggcgtacctgtagaacac 3'

Después de la variación.

G. morhua AN1. 5' tcccttcattatcatcggacaagtggcatcagt 3' 1140

G. morhua. 5' ccccttcattatcatcggacaagtggcatcagt 3' 15410

Variación 5.

Antes de la variación

G. morhua AN1. Posición: 1171 5' actatatttctccctcttcttagttttatt 3'

G. morhua. Posición: 15441 5' actatatttctccctcttcttagttttattc 3'

Después de la variación.

G. morhua AN1. 5' tccccttcaggaataactgaaaataaggc 3' 1200

G. morhua. 5' cccccttcaggaataactgaaaataaggc 3' 15470

Variación 6.

Antes de la variación

G. morhua AN1. Posición: 1303 5' gggggctaaattcctccctagtgctacatctaattattaccggg 3'

G. morhua. Posición: 15573 5' gggggctaaattcctccctagtgctacatctaattattaccgga 3'

Después de la variación.

G. morhua AN1. 5' gggacgccccataattc 3' 1320

G. morhua. 5' aggacgccccataattc 3' 15590

Variación 7.

Antes de la variación

G. morhua AN1. Posición: 1352 5' atcatccaccggaggctgccccatggatcaag 3'

G. morhua. Posición: 15622 5' atcatccaccggaggctgccccatggatcaa 3'

Después de la variación.

G. morhua AN1. 5' gataccactcagaggaagagattttaac 3' 1380

G. morhua. 5' aataccactcagaggaagagattttaac 3' 15650

COMPARACION ENTRE GADUS MORHUA Y OTRAS ESPECIES DE INTERES ALIMENTARIO.

Gadus morhua vs Bos taurus

Sequence gi Gadus morhua mitochondrion, complete
1 5835806 genome **Length** 16696 (1 .. 16696)

Sequence gi Bos taurus mitochondrion, complete genome
2 5834939 **Length** 16338 (1 .. 16338)

Score = 931 bits (484), Expect = 0.0
Identities = 1135/1458 (**77%**), Gaps = 1/1458 (0%)

Gadus morhua vs Ovis aries

Sequence gi Gadus morhua mitochondrion, complete
1 5835806 genome **Length** 16696 (1 .. 16696)

Sequence gi
2 5835554 **Length** 16616 (1 .. 16616)

Score = 1054 bits (548), Expect = 0.0
Identities = 1214/1547 (**78%**)

Gadus morhua vs Sus crofa domestica

Sequence gi Gadus morhua mitochondrion, complete
1 [5835806](#) genome **Length** 16696 (1 .. 16696)

Sequence gi
2 [5835862](#) **Length** 16613 (1 .. 16613)

Score = 910 bits (473), Expect = 0.0
Identities = 1220/1591 (**76%**), Gaps = 1/1591 (0%)

Gadus morhua vs Capra hircus

Sequence gi Gadus morhua mitochondrion, complete
1 [5835806](#) genome **Length** 16696 (1 .. 16696)

Sequence gi Capra hircus mitochondrion, complete genome **Length** 16640 (1 .. 16640)
2 [33150920](#)

Score = 1029 bits (535), Expect = 0.0
Identities = 1256/1614 (**77%**), Gaps = 1/1614 (0%)

ANEXO Tabla con distintos primers probados con programa bio-informático

Numero de PRIMER	Autor o articulo de referencia	Inicio (posición en el ADN mitocondrial en la región del citocromo b)	Fin (posición en el ADN mitocondrial en la región del citocromo b)	Primer posición (1-3) Dirección 5'-3'	Primer posición (4-4) Dirección 5'-3'	Primer posición (7-9) Dirección 5'-3'	Primer posición (10-12) Dirección 5'-3'	Primer posición (13-15) Dirección 5'-3'	Primer posición (16-18) Dirección 5'-3'	Primer posición (19-21) Dirección 5'-3'	Primer posición (22-24) Dirección 5'-3'	Primer posición (25-) Dirección 5'-3'
1)	Kocher Et. AL	14,746	14,771	tga	gga	caa	ata	tca	ttc	tga	gga	g
2)	Kocher Et. AL	14,413	14,438	ccc	tcc	aat	atc	tca	gta	tga	tga	aa
3)	Johansen & Bakke	14,727	14,744	cgt	agg	tta	tgt	cct	ccc			
4)	Johansen & Bakke	14,438	14,457	att	ttg	gct	ctc	ttc	tag	g		
5)	Arzooze**	14,459	14,708									
6)	A.Céspedes, T. García	*	*	cca	tcc	aac	alc	tca	gca	tga	tga	aa
7)	A.Céspedes, T. García	*	*	ccc	ctc	aga	atg	ata	ttt	gtc	cta	a
8)												

* Primer propuesto directamente sin ubicación en el cytb. **Cadena con demasiados pares de bases para ser escrita en la tabla

Tabla con resultados de % de afinidad con los primers probados

Numero de PRIMER	% de afinidad con <i>Godus morhua</i>	Otras especies o variedades con alto % (mayor al 95%) de afinidad con los PRIMERS revisados Nombres científicos	Otras especies o variedades con alto % (mayor al 95%) de afinidad con los PRIMERS revisados Nombres comunes	Comentarios
1)	Sin resultados	Sin resultados	Sin resultados	Sin resultados
2)	<i>Godus morhua</i> complete mitochon 100%	<i>Aleocephalus tenebrosus</i> mit <i>Theragra chalcogramma</i> mitoch <i>Enedrias crassispina</i> mitoch <i>Antigonia capros</i> mitochondri <i>Emmelichthys struhsakeri</i> mit <i>Pterocassis tile</i> mitochondri	California stickhead Alaska pollock Enedrias crassispina deepbody boarfish <i>Emmelichthys struhsakeri</i> dark-banded hussler	Solo la especie de interés obtuvo el 100% de afinidad.
3)	<i>Godus morhua</i> complete mitochon <i>G. morhua</i> (AN1) mitochondria t <i>G. morhua</i> (NC1) mitochondria SR 100%	<i>Struthio camelus</i> mitochondri <i>Struthio camelus</i> complete mit <i>Carassius auratus langsdorfi</i>	Ostrich Ostrich goldfish	<i>Godus morhua</i> en sus 3 diferentes formas y las 3 especies descritas, también tienen el 100% de afinidad.

4)	Gadus morhua complete mitochon G.morhua (AN1) mitochondria 1 G.morhua (NC1) mitochondria TR 100%	Colisa chuna isolate 899 cyt Boreogadus saida mitochondri Gadus macrocephalus mitochon M. us. cervicolor cytochrome b Protandrus guatemalensis a Rattus rattus mitochondrial Rattus tanezumi cytochrome b Petromyscus collinus Poo535 Anguilla anguilla cytochrome Anguilla rostrata cytochrome Anguilla rostrata mitochondr Anguilla anguilla mitochondr Anguilla rostrata cytochrome Rattus tanezumi mitochondria Anguilla anguilla cytochrome Anguilla rostrata cytochrome Anguilla rostrata cytochrome Anguilla rostrata cytochrome Anguilla rostrata cytochrome Anguilla rostrata cytochrome Anguilla rostrata cytochrome Astylosternus dadematus cyt	Colisa chuna Boreogadus saida Gadus macrocephalus fawn-colored mouse Guatemalan killifish black rat Tanezumi rat pygmy rock mouse European eel American eel American eel European eel American eel Tanezumi rat European eel American eel American eel American eel American eel American eel American eel Victoria night frog	Todos las especies, tienen el 100% de afinidad, por lo que el primer amplifica con demasiosas especies. Pocos especifico. Al parecer, estas especies no son de interés para la experimentación.
5)	Por verificar	Por verificar	Por verificar	Por verificar
6)	Incompatible con Gadus morhua	Incompatible con Gadus morhua	Incompatible con Gadus morhua	Incompatible con Gadus morhua
7)	Sin resultados	Sin resultados	Sin resultados	Sin resultados

Tabla comparativa del diseño de diferentes primers, probados con el programa bio-informático. (Selección del primer)

Autor o articulo de referencia	Inicio (posición en el ADN mitocondrial en la región del citocromo b)	Fin (posición en el ADN mitocondrial en la región del citocromo b)	% de afinidad con Gadus morhua	Primer posición (1-3) Dirección 5'-3'	Primer posición (4-6) Dirección 5'-3'	Primer posición (7-9) Dirección 5'-3'	Primer posición (10-12) Dirección 5'-3'	Primer posición (13-15) Dirección 5'-3'	Primer posición (16-18) Dirección 5'-3'	Primer posición (19-21) Dirección 5'-3'	Primer posición (22-24) Dirección 5'-3'	Primer posición (25-) Dirección 5'-3'
1) Kocher Et. Al	14,746	14,771		tga	gga	caa	ata	tca	ttc	tga	gga	g
2) Kocher Et. Al	14,413	14,438	100%	ccc	tcc	aat	atc	tca	gta	tga	tga	aa
3) Johansen & Bakke	14,727	14,744	Gadus morhua complete mitochon 100% G.morhua (AN1) mitochondria 1 100% G.morhua (NC1) mitochondria TR 100%	cgt	agg	tta	tgt	oct	ccc			

4) Johansen & Bakke	14,438	14,457	Gadus morhua complete mitochon 100% G.morhua (AN1) mitochontri a t: 100% G.morhua (NC1) mitochontri a R: 100% Gadus macrocephalus mitochon 100%	att	tig	gct	ctc	ttc	tag	g		
5) Amason**	14,459	14,708										
6) A. Cespedes, T. Garcia	*	*		cca	tcc	aac	atc	tca	gca	tga	tga	aa
7) A. Cespedes, T. Garcia	*	*		ccc	ctc	aga	atg	ata	ttt	gtc	cta	a

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi DNA-Organismos Resultado interactivo.

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Especial/alignment_of_2_sequences

* Primer propuesto directamente sin ubicación en el cyt b.

**Cadena con demasiados pares de bases para ser escrita en la tabla

RESULTADOS.

Primer 1) Sin resultados

Primer 2)

Alignment	DB ID	Source	Length	Identify%	Mismatch%	Overlap	Eij
1	EM_OR_QM MITGEN	Gadus morhua complete mitochon	16696	100.000	100.000	28	3.4
2	EM_OR_AP004190	Alepocephalus tenebrosus mit	16644	96.154	96.154	26	8.9
3	EM_OR_AB182303	Theragra chalcogramma mitoch	16572	96.154	96.154	26	8.9
4	EM_OR_AB182302	Theragra chalcogramma mitoch	16572	96.154	96.154	26	8.9
5	EM_OR_AB094051	Theragra chalcogramma mitoch	16571	96.154	96.154	26	8.9
6	EM_OR_AB182306	Theragra chalcogramma mitoch	16571	96.154	96.154	26	8.9
7	EM_OR_AB182305	Theragra chalcogramma mitoch	16571	96.154	96.154	26	8.9
8	EM_OR_AB182307	Theragra chalcogramma mitoch	16571	96.154	96.154	26	8.9
9	EM_OR_AB182308	Theragra chalcogramma mitoch	16570	96.154	96.154	26	8.9
10	EM_OR_AB182304	Theragra chalcogramma mitoch	16570	96.154	96.154	26	8.9
11	EM_OR_AB182300	Theragra chalcogramma mitoch	16569	96.154	96.154	26	8.9
12	EM_OR_AB182301	Theragra chalcogramma mitoch	16568	96.154	96.154	26	8.9
13	EM_OR_AP004449	Enedrias crassispina mitoch	16522	96.154	96.154	26	8.9
14	EM_OR_AP002943	Arifgonia capros mitochontri	16508	96.154	96.154	26	8.9

15	EM_OR:AP004446	Emmelichthys struhsakeri mit	16502	96.154	96.154	26	8.9
16	EM_OR:AP004447	Pterocaesio tile mitochondri	16496	96.154	96.154	26	8.9

Primer 3)

Alignment	DB ID	Source	Length	Identify%	Unaligned%	Overlap	ED
1	EM_OR:GMMITGEN	Gadus morhua complete mitochon	16596	100.000	100.000	16	1.5
2	EM_OR:AF336715	Struthio camelus mitochondri	16595	100.000	100.000	17	3.7
3	EM_OR:SCMITOGEN	Struthio camelus complete mit	16591	100.000	100.000	17	3.7
4	EM_OR:AB006952	Carassius auratus langsdorfi	16578	100.000	100.000	17	3.7
5	EM_OR:MTRACQMP.L	Rhea americana complete mito c	16714	94.444	94.444	18	7.4
6	EM_OR:AF336711	Dromaius novaehollandiae mit	16711	94.444	94.444	18	7.4
7	EM_OR:IG0278511	Iguana iguana complete mito	16633	94.444	94.444	18	7.4
8	EM_OR:AP004422	Gambusia affinis mitochondri	16614	94.444	94.444	18	7.4
9	EM_OR:AB0060274	Shinisaurus crocodilurus mit	16583	94.444	94.444	18	7.4
10	EM_OR:AY676201	Chinemys reevesi mitochondri	16576	94.444	94.444	18	7.4
11	EM_OR:AF381988	Homo sapiens haplotype L1a m	16567	94.444	94.444	18	7.4
12	EM_OR:AY195780	Homo sapiens haplotype A2L1	16567	94.444	94.444	18	7.4
13	EM_OR:AF346985	Homo sapiens mitochondrion,	16567	94.444	94.444	18	7.4
14	EM_OR:AF346999	Homo sapiens mitochondrion,	16562	94.444	94.444	18	7.4

15	EM_OR:AF346998	Homo sapiens mitochondrion,	16561	94.444	94.444	18	7.4
16	EM_OR:MH15A	Homo sapiens mitochondrial DNA, c	16559	94.444	94.444	18	7.4
17	EM_OR:MICLGENOM	Crossostoma lacustre complete	16558	94.444	94.444	18	7.4
18	EM_OR:AB054134	Gonorynchus greyi mitochondr	16536	94.444	94.444	18	7.4
19	EM_OR:AP004432	Sargocentron rubrum mitochon	16526	94.444	94.444	18	7.4
20	EM_OR:AP002935	Paromitra oscitans mitochond	16387	94.444	94.444	18	7.5
21	EM_OR:MM0554062	Monodon monoceros complete	16383	94.444	94.444	18	7.5
22	EM_OR:AP002922	Mycophum affine mitochondri	16239	94.444	94.444	18	7.5
23	EM_OR:MIPMMU118	Petromyzon marinus mitochondr	16201	94.444	94.444	18	7.5
24	EM_OR:AP004438	Indostomus paradoxus mitoch	16152	94.444	94.444	18	7.5
25	EM_OR:AF534380	Sphenodon punctatus mitochon	15161	94.444	94.444	18	7.9
26	EM_OR:AY016014	Dromaius novaehollandiae mit	12280	94.444	94.444	18	9.2
27	EM_OR:AY016010	Apteryx mantelli mitochondri	12269	94.444	94.444	18	9.3
28	EM_OR:MIGMTRNAP	G. morhua (AI 1) mitochondria t	1429	100.000	100.000	18	9.6
29	EM_OR:MIGMTRNG	G. morhua (IC 1) mitochondria tR	1429	100.000	100.000	18	9.6

Primer 4)

Alignment	DB ID	Source	Length	Identify%	Unaligned%	Overlap	ED
1	EM_OR:GMMITGEN	Gadus morhua complete mitochon	16696	100.000	100.000	19	2.4

2	EM_OR:MIGMTRNAP	G. morhua (AN 1) mitochondria 1	1429	100.000	100.000	19	8.2
3	EM_OR:MIGMTRNG	G. morhua (NC 1) mitochondria 1R	1429	100.000	100.000	19	8.2
4	EM_OR:AF519696	Colisa chuna isolate B99 cyt	1167	100.000	100.000	19	9.1
5	EM_OR:AB091097	Boreogadus saida mitochondri	1161	100.000	100.000	19	9.1
6	EM_OR:AB076152	Gadus macrocephalus mitochon	1161	100.000	100.000	19	9.1
7	EM_OR:AY057811	Mus cervicolor cytochrome b	1145	100.000	100.000	19	9.2
8	EM_OR:AY166568	Profundulus guatemalensis is	1140	100.000	100.000	19	9.2
9	EM_OR:AB033782	Rattus rattus mitochondrial	1140	100.000	100.000	19	9.2
10	EM_OR:AY263617	Rattus tanezumi cytochrome b	1140	100.000	100.000	19	9.2
11	EM_OR:AF160601	Petromyscus collinus Pool535	1140	100.000	100.000	19	9.2
12	EM_OR:AF006714	Anguilla anguilla cytochrome	1140	100.000	100.000	19	9.2
13	EM_OR:AF006717	Anguilla rostrata cytochrome	1140	100.000	100.000	19	9.2
14	EM_OR:AB021767	Anguilla rostrata mitochondr	1140	100.000	100.000	19	9.2
15	EM_OR:AB021776	Anguilla anguilla mitochondr	1140	100.000	100.000	19	9.2
16	EM_OR:AF006716	Anguilla rostrata cytochrome	1140	100.000	100.000	19	9.2
17	EM_OR:AB096841	Rattus tanezumi mitochondria	1140	100.000	100.000	19	9.2
18	EM_OR:AF006715	Anguilla anguilla cytochrome	1140	100.000	100.000	19	9.2

19	EM_OR:AF485272	Anguilla rostrata cytochrome	1039	100.000	100.000	19	9.6
20	EM_OR:AF485271	Anguilla rostrata cytochrome	1039	100.000	100.000	19	9.6
21	EM_OR:AF485276	Anguilla rostrata cytochrome	1039	100.000	100.000	19	9.6
22	EM_OR:AF485275	Anguilla rostrata cytochrome	1039	100.000	100.000	19	9.6
23	EM_OR:AF485274	Anguilla rostrata cytochrome	1039	100.000	100.000	19	9.6
24	EM_OR:AF485273	Anguilla rostrata cytochrome	1039	100.000	100.000	19	9.6
25	EM_OR:AY241735	Astylosternus diadematus cyt	969	100.000	100.000	19	9.9

Primer 5) Pendiente, para verificación, ya que al parecer el artículo describe el fragmento amplificado y no los primers.

Primer 6)

Alignment	DB ID	Source	Length	Identify%	Unassigned%	Coverage	EI
1	EM_OR:MFCCCG	Cyprinus carpio complete mitocho	16575	100.000	100.000	26	4.2
2	EM_OR:AF303110	Ursus arctos mitochondrion,	17020	96.154	96.154	26	10
3	EM_OR:AF303111	Ursus maritimus mitochondrio	17017	96.154	96.154	26	10
4	EM_OR:MFCCU207	Felis catus mitochondrion, co	17009	96.154	96.154	26	10

Primer 7) Sin resultados

