



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Desarrollo de un protocolo para identificar la presencia de carne de pollo (*Gallus gallus domesticus*), cerdo (*Sus scrofa domestica*) y soya (*Glycine max*) en hamburguesas comerciales, mediante la aplicación de la técnica de PCR múltiplex”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

SÁNCHEZ MENDOZA ANA ELVIA

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Desarrollo de un protocolo para identificar la presencia de carne de pollo
(Gallus gallus domesticus), Cerdo (Sus scrofa domestica), y Soya (Glycine max)
en hamburguesas comerciales, mediante la aplicación de la técnica de PCR
múltiple.

Que presenta la pasante Ana Elvia Sánchez Mendoza

Con número de cuenta: 406016964 para obtener el título de:
Ingeniera en Alimentos.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 18 de noviembre del 2010.

PRESIDENTE Dr. José Francisco Montiel Sosa

VOCAL Dra. Susana Patricia Miranda Castro

SECRETARIO Dra. Adriana Ilorente Bousquets

1er SUPLENTE QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz

2º SUPLENTE Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández



Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.

(Albert Einstein)



DEDICATORIAS

A mis papas Lidia Mendoza y Carlos Sánchez por creer en mi, por apoyarme, escucharme, por estar siempre conmigo incluso antes de llegar a este mundo, por ser el máximo ejemplo en mi vida, por enseñarme las cosas realmente importantes, por jamás dejarme darme por vencida aun en los momentos mas difíciles, por concederme la gran fortuna de crecer en una familia que para mi no dista mucho de ser perfecta. Mamá, Papá; espero algún día llegar a ser la mitad de lo grandes y extraordinarias personas que ustedes son para mi... Los amo.

A mi hermana Olga Lidia, por ser un ejemplo a seguir siempre, por apoyarme e impulsarme a ser mejor cada día.

A mi hermano Carlos Adrián, por cuidarme, por estar conmigo, por enseñarme a creer en lo imposible y mantener el buen sentido del humor siempre.

A mi hermana Alma Victoria, por ser mi compañera, cómplice y amiga durante todo este tiempo, por sus palabras de aliento.

A mi hermanita Daniela, por su cariño, por llenar mi vida de alegría y por ser la chispa de la familia.

A mis tías, Rosa Maria, Esperanza, Raquel y a mi tío Rosendo: por sus palabras de aliento y por la confianza que siempre han tenido en mí.

A la familia González Romero: por abrirme las puertas de su hogar, por darme su confianza y apoyo siempre.

A mi mejor amiga Themis González por estar conmigo cuando mas la necesitaba, por compartir y vivir juntas momentos extraordinarios y por formar parte de mi vida de ahora en adelante.

A mis amigos de la escuela: Juanita, Margarita, Sandra, Ivon, Aiko, Karla, Claudia y a mis compañeros de la generación 30, de quienes aprendí cosas invaluable y compartí momentos irrepetibles y quienes siempre estarán presentes a lo largo de mi trayecto

A.E.S.M



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Montiel Sosa, por el apoyo y asesoría para la realización de este proyecto y por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

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

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por su invaluable asesoría, tiempo y apoyo técnico, con lo cual siempre pude contar durante la realización de este trabajo y que sin ello, esto hubiera sido mas complicado.

A la Q.F.B Angélica Saldaña Martínez por compartir su experiencia y conocimiento en esta área lo que me permitió obtener buenos resultados en esta tesis.

A los compañeros del área de biología molecular (Eli, Raúl, Alejandro, Karla) por los consejos y ayuda para llevar a buen termino este trabajo.

A la UNAM, la máxima casa de estudios y referencia innegable en todos los aspectos de la vida nacional; agradezco la gran oportunidad de formar parte de esta gran institución, en donde no solo se me brindo conocimiento académico, si no que se me inculco conciencia social para contribuir al desarrollo de nuestro país, con la consigna siempre de que por mi raza hablara el espíritu.



ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
TERMINOLOGÍA.....	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1: GENERALIDADES DE LOS CÁRNICOS.	3
1.1 CLASIFICACIÓN DE LA CARNE	3
1.2 APOORTE NUTRIMENTAL	4
1.2.1 Proteínas.....	4
1.2.2 Lípidos.....	5
1.2.3 Carbohidratos	6
1.2.4 Vitaminas.	6
1.3 TÉCNICAS DEL PROCESADO DE LA CARNE.	7
1.3.1 Curado	7
1.3.2 Ahumado.....	8
1.3.3 Picado o trituración	8
1.3.4 Mezclado.....	8
1.3.5 Emulsificado.....	9
1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS CARNICOS.	9
1.5 ADULTERACIONES EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.	11
1.5.1 Especies de interés en la elaboración de productos cárnicos.....	12
1.5.1.1 Carne de res.....	12
1.5.1.2 Carne de cerdo.....	12
1.5.1.3 Carne de pollo.....	13
1.5.1.4 Extensores (soya).....	13
1.6 ADULTERACIÓN EN HAMBURGUESAS	14
1.6.1 Elaboración de carne para hamburguesas.	15
CAPÍTULO 2: TÉCNICAS PARA DETERMINAR LA AUTENTICIDAD DE LA CARNE Y LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.	17
2.1 TÉCNICAS BASADAS EN PROTEÍNAS.	17
2.2 TÉCNICAS BASADAS EN ÁCIDOS NUCLEÍCOS	18
2.2.1. Hibridación de DNA	19
2.2.2 DNA mitocondrial.....	19
2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
2.2.3.1 Fundamento de la PCR.....	22



2.2.3.2 Descripción de la PCR	22
2.2.3.2.1 Etapas de la reacción.....	22
2.2.3.2.2 Componentes de la reacción.....	24
2.2.3.2.3. Ventajas y desventajas de la PCR	26
2.2.3.2.4. Contaminación de las reacciones de PCR.....	27
2.2.3.2.5. Análisis del producto de una PCR.....	27
2.2.3.2.6 Aplicaciones de la PCR	28
2.2.3.2.7. PCR múltiplex.....	29
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	31
3.1 CUADRO METODOLÓGICO.....	31
3.2 DESCRIPCIÓN DEL CUADRO METODOLOGICO	32
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.3.1 Material biológico.....	34
3.3.2 Extracción de DNA total a partir de tejido.....	34
3.3.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia	36
3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	38
3.3.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	41
3.3.5 Análisis de los resultados de electroforesis.....	43
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXO	71



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de diferentes especies de animales de basto de carne.....	7
Tabla 2: Composición química de harina de soya	14
Tabla 3: Componentes de PCR	40
Tabla 4: Cuantificación de DNA para muestras de vacuno, pollo, cerdo y soya sin diluir.....	45
Tabla 5: Cuantificación de DNA para muestras de vacuno, pollo, cerdo y soya diluidas.....	45
Tabla 6: Mezclas de DNA y primers para llevar a cabo la reacción de PCR multiplex.....	52
Tabla 7: Concentraciones de DNA y relación 260/280 obtenidas para las diferentes muestras comerciales de hamburguesas trabajadas. S/P = muestra sin procesar, P= muestra procesada.....	58
Tabla 8: Concentraciones de DNA diluidas y relación 260/280 obtenidas para las diferentes muestras comerciales de hamburguesas trabajadas. S/P = muestra sin procesar, P= muestra procesada	59



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de proceso para la elaboración de carne para hamburguesas	15
Figura 2: Estructura del mtDNA humano	20
Figura 3: Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa	24
Figura 4: Cuadro metodológico	31
Figura 5: Espectrofotómetro para cuantificar concentración de DNA	37
Figura 6: Etapas y condiciones programadas en el termociclador para especies animales (Vaca, Cerdo, Pollo).....	40
Figura 7: Etapas y condiciones programadas en el termociclador para Soya.....	41
Figura 8: Presentación del artículo publicado por Matsunaga y col.	44
Figura 9: Diseño de los primers específicos para las especies animales (vaca, pollo y cerdo) y primer universal.....	47
Figura 10: Evaluación de la especificidad de los primers para especies animales. 1) Marcador de peso molecular, 2) Blanco, 3) C+ humano, 4) Vacuno, 5) Pollo, 6) Cerdo, 7) soya.	48
Figura 11: Prueba 1 para determinar las concentraciones adecuadas de primers para PCR multiplex. 1) Marcador de peso, 2) Blanco, 3) C+ (Cerdo), 4) Mezcla de DNA (vaca, pollo, cerdo)..	50
Figura 12: Prueba 2 para determinar las concentraciones adecuadas de primers para PCR multiplex.1) Marcador de peso, 2) Blanco, 3) C+ (Cerdo), 4) Mezcla de DNA (vaca, pollo, cerdo).	50
Figura 13: Prueba 3 para determinar las concentraciones adecuadas de primers para PCR multiplex. 1) Marcador de peso, 2) Blanco, 3) M 1, 4) M 2, 5) M 3, 6) M4.....	52
Figura 14: Evaluación electroforética para confirmar las concentraciones de primers a emplear 1) Marcador de peso, 2) Blanco, 3) C+ vaca, 4) Mezcla de DNA de vaca y cerdo	54



Figura 15: Evaluación electroforética de PCR simple para soya; 1) Marcador de peso molecular, 2) Blanco, 3) C+ Soya, 4) Vacuno, 5) Pollo, 6) Cerdo, 7) soya.....55

Figura 16: Evaluación electroforética de PCR simple para soya en productos comerciales; 1) Marcador de peso molecular 2) blanco, 3) C+ humano, 4) M1, 5) M2, 6) M3, 7) M4, 8) M5, 9) M6, 10) M7, 11) M8, 12) C-60

Figura 17: Evaluación electroforética de PCR multiplex en Hamburguesas. MP= marcador de peso molecular, B= Blanco, C+P= control positivo de Pollo, C+C= control positivo Cerdo, M1...4= Numero de muestra, P= evaluación para pollo, CV= evaluación para Cerdo y vaca62

Figura 18: Continuación de evaluación electroforética de PCR multiplex en Hamburguesas. MP= marcador de peso molecular, M5...8= Número de muestra, P= evaluación para pollo, CV= evaluación para Cerdo y vaca, C+V= control positivo de vaca.....63



TERMINOLOGÍA

Adulteración	Falsificación, alteración de la calidad o pureza de algo, por la adición de una sustancia extraña.
Amplificado	Producto resultante de la PCR. Fragmentos específicos de DNA multiplicados durante la reacción.
Antigenicidad	Capacidad de producir una respuesta inmune específica.
Autenticidad	Calidad y carácter de verdadero o autorizado.
Bret	Bromuro de etidio.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNA molde	DNA diana, plantilla, template. Fragmento al que se dirige la PCR, delimitado por primers.
dNTPs	Desoxirribonucleosidos trifosfato.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
Pb	Pares de bases.
PCR	" <i>Polymerase Chain Reaction</i> " Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR Multiplex	Variante de la técnica de PCR donde se emplean dos o más pares de primers con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN.
Primers	Cebadores, oligonucleótidos complementarios a una de las dos hebras del ADN. Los cuales son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción.
RNA	Ácido ribonucleico.
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal.
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia.



RESUMEN

El presente trabajo de tesis se realizó con el objetivo de evidenciar la presencia de adulteraciones en productos cárnicos comerciales, de manera específica en hamburguesas, cuyo etiquetado declara ser un producto elaborado únicamente por carne de vacuno.

Debido a que las principales adulteraciones registradas en este producto, se realizan con la sustitución de la carne de vacuno por especies de menor valor económico, como el pollo, cerdo y soya texturizada, estas son las especies que se detectaron en ocho muestras comerciales trabajadas durante este estudio.

La detección de estas adulteraciones se llevó a cabo por medio de la técnica de PCR, debido a que esta es una técnica que posee gran sensibilidad y es cien por ciento específica, lo cual garantiza que los resultados obtenidos son confiables. Para el caso de la detección de soya, se empleó el uso de PCR simple, mientras que para la detección de las especies animales se optó por emplear PCR multiplex, una variación a la técnica, la cual permite detectar varias especies simultáneamente, lo cual representa un ahorro significativo de tiempo e insumos al realizar este estudio.

Los primers empleados, las condiciones de temperaturas y ciclos para realizar las detecciones correspondientes fueron tomados de artículos en donde estos fueron probados y se reportan resultados satisfactorios, sin embargo las condiciones empleadas para ese trabajo tuvieron que ser adecuadas para poder obtener un protocolo eficiente para la detección de adulteraciones en hamburguesas.



INTRODUCCIÓN

La determinación del origen de la especie de la carne es una parte integral de la regulación de los alimentos con respecto a la regulación económica, los productos de carne ya preparados son un blanco para el etiquetado fraudulento debido a la diferencia de precios entre la especie original usada para el producto y otras de menor calidad. [7]

Además de que las prácticas fraudulentas causen posibles pérdidas económicas, la correcta identificación de las especies es importante para los consumidores por otras razones como; requerimientos médicos de individuos con alergias específicas a algunas especies, o debido a prácticas religiosas. [26]

La adulteración de la carne y los productos cárnicos, pueden ocurrir tanto en producto fresco como en procesado y esta puede llevarse a cabo por medio de la adición de o sustitución de ingredientes, una práctica común es la adición de soya y se ha encontrado que muchas veces la carne es sustituida por carne de menor valor económico proveniente de otras especies. [13]

Es por ello que la autenticidad se centra en la identificación de la especie, ya que existen grandes diferencias de precio de acuerdo a esto, Sin embargo la identificación de especies de carne no siempre es posible de identificar mediante un examen de rutina o por métodos analíticos convencionales.[12] Es por esto que se han desarrollado métodos para la identificación de las especies, siendo los más confiables aquellos basados en el análisis de DNA, debido a que esta molécula posee una alta estabilidad y su estructura se mantiene bien conservada en el individuo. [20, 21]

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es uno de los métodos basados en el DNA mayormente empleado, el cual consiste en la amplificación de un fragmento específico de DNA, para ello se emplean primers sintéticos y específicos de la especie, los cuales se unen a las hebras complementarias de DNA y para así dirigir la síntesis de millones de copias del fragmento de DNA. Los



productos obtenidos de esta reacción son analizados y a través de ello se puede identificar la especie con exactitud [11, 23, 32]. Sin embargo para lograr la identificación de la presencia de varias especies simultáneamente en productos cárnicos es necesario implementar una variación al método convencional de PCR, el cual es conocido como PCR múltiplex, en el cual se emplean varios cebadores juntos para la amplificación de regiones múltiples. [23]

En consecuencia, el objetivo de este trabajo de investigación, es el desarrollo y aplicación de una técnica de PCR múltiplex, para la identificación de presencia de diferentes especies de carne y soya en productos comerciales.



CAPÍTULO 1: GENERALIDADES DE LOS CÁRNICOS.

Posiblemente no exista ningún grupo de alimentos, cuyo consumo esté tan condicionado por factores no nutricionales, como las carnes. Son muy relevantes los factores religiosos, ya que no hay religión, ni secta religiosa, que no haya establecido preceptos en materia de consumo de carne. Por ejemplo, la religión musulmana prohíbe el consumo de cerdo y exige el consumo ritual de cordero. La religión judía además, exige que los animales sean sacrificados en una forma especial, desangrados. La cristiana limita el consumo de carne en determinados días del año. El budismo impone el vegetarianismo casi estricto. [26, 42]

Pero podemos decir que la incorporación de la carne a la dieta habitual es un hecho relativamente reciente y hasta hace sólo unas décadas era un privilegio de las clases más pudientes. En los últimos años el consumo de carne se ha incrementado. Al contrario que en otros tiempos, no muy lejanos, hoy es raro que en la dieta diaria no entre algún plato a base de carne. [42]

1.1 CLASIFICACIÓN DE LA CARNE

Se denomina carne a la de animales domésticos, estos incluyen el ganado vacuno, cerdos, ovejas y cabras [4]. Siguiendo un criterio bastante amplio, la clasificación más relevante de la carne, se da de la siguiente manera:

- Carnes rojas, las más comunes de este tipo son las provenientes de vacuno, cerdo y lanar, sin embargo, en muchos países se consumen también las procedentes de équidos, cabras, antílopes, llamas y conejos. [9]
- Carne de aves, es la procedente de la musculatura de las aves domésticas que comprenden gallinas, pavos, gansos y gallinas de guinea. [9]
- Carne de animales marinos, los peces constituyen la mayor parte de esta carne en el consumo humano. No obstante la carne de mejillones, almejas,



langostas, ostras, cangrejos y muchas otras especies también se incluyen en esta categoría. [9]

- Carne de Caza, es la que procede de de los animales silvestres o no domesticados. [9]

Aparte de la especie del animal, de la que depende el contenido de hemoglobina que dará a la carne un color más o menos rojo, la alimentación también influye en la coloración de las carnes. [42]

El aporte nutrimental y la calidad de la carne durante la producción se verán afectados principalmente por la especie, edad, sexo, alimentación, sanidad. [16]

1.2 APOORTE NUTRIMENTAL

Desde el punto de vista nutritivo, la carne es una fuente muy buena de proteínas y, en grado mucho menor, de determinados minerales. Aunque también están presentes vitaminas y ácidos grasos esenciales, la carne normalmente no se incluye por tales componentes en una dieta equilibrada. A pesar de que este aceptado el valor nutritivo de la carne, sin embargo, existen diferencias en los contenidos de aminoácidos libres, ácidos grasos y de otras varias sustancias, así como en sus características en las diferentes especies de donde se obtiene la carne para consumo. [16]

El creciente desarrollo de los procesos a los que se somete la carne para su consumo como el deshuesado mecánico, y la inclusión de la carne recuperada mecánicamente en los productos alimenticios, ha hecho que la determinación tanto de su origen como de su valor nutricional sea de suma importancia. [16]

1.2.1 Proteínas

Las proteínas de la carne son en gran parte las de los tejidos muscular y conectivo, la mayor proporción de proteínas musculares totales la constituyen las



de miofibrillas; les siguen en importancia cuantitativa las proteínas sarcoplásmicas, formadas del tejido conectivo, constituidas fundamentalmente por colágeno y algo de elastina. Aunque el músculo contiene aproximadamente del 18% al 22% de proteínas, tal cantidad varía bastante en muchos productos cárnicos y de acuerdo a la especie de la cual se trate, y lo hace inversamente con la cantidad de grasa presente. Los productos cárnicos proporcionan generalmente la mayor parte del aporte proteico recomendado con la dieta. [9]

Además de su contenido proteico la carne muscular proporciona una proteína de alta calidad biológica. La proteína de alta calidad es la que contiene todos los aminoácidos esenciales en cantidades equivalentes a las necesidades del cuerpo humano, es altamente digestible y fácilmente absorbible. [9]

Además de proteínas la carne contiene también algunos compuestos nitrogenados no proteicos, tales como aminoácidos libres, péptidos sencillos, aminos y creatina. Aunque estos compuestos no contribuyen significativamente al valor nutritivo, constituye una fuente potencial de nitrógeno que puede emplearse en la síntesis de aminoácidos y proteínas. [9]

1.2.2 Lípidos

El contenido lipídico de la carne es su componente más variable. La cantidad de lípidos depende del corte de la carne y de la cantidad de grasas que se dejó en el mismo durante el despiecé y el recortado. Los componentes lipídicos de mayor interés, desde el punto de vista nutritivo, son los triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y vitaminas liposolubles. El valor calórico de los lípidos de la carne procede de los ácidos grasos de los triglicéridos y fosfolípidos de los que aquellos constituyen la mayor parte. [9,16]

Los ácidos grasos que forman parte de los triglicéridos de la carne están relativamente saturados, especialmente si se comparan con las grasas vegetales. En la grasa de la carne el ácido graso insaturado más abundante es el oleico, los



otros ácidos grasos, presentes en grandes cantidades, son saturados y se trata de los ácidos palmítico y esteárico. Por lo tanto, las grasas de la carne se describen generalmente como grasa saturadas. [9] La grasa de la carne contiene cantidades notables de ácidos grasos esenciales para la dieta del hombre. Puesto que la necesidad diaria de tales ácidos grasos indispensables es relativamente pequeña, la ración diaria aceptable se cubre fácilmente con la grasa intramuscular, incluso cuando se desecha la mayor parte de la grasa externa. [9]

1.2.3 Carbohidratos

Los carbohidratos suponen menos del 1% del peso de la carne, la mayoría de los cuales la componen el glucógeno y el ácido láctico. Dado que el hígado constituye el lugar principal de almacenamiento de glucógeno, la mayoría de los carbohidratos del organismo animal se presentan en dicho órgano. De aquí que la mayor parte de los cortes de carne constituyan fuentes pobres de carbohidratos, salvo en aquellos productos (tales como las carnes curadas) a los que se adicionan azúcares o carbohidratos. [9]

1.2.4 Vitaminas.

La carne es una excelente fuente de vitaminas hidrosolubles del complejo B, pero es pobre en vitamina C, también hidrosoluble, mientras que las vitaminas liposolubles A, D, E, K, están en la grasa del organismo. En la carne se encuentran todas las vitaminas del complejo B, siendo las más abundantes la tiamina, la riboflavina y la niacina. La carne es una fuente muy pobre de vitamina C, salvo cuando se adiciona ascorbato a los productos cárnicos procesados. [9]

La tabla 1 ilustra las diferencias que existen en el aporte nutritivo entre las tres especies más importantes (Vacuno, Cerdo y Pollo) de donde se obtiene la carne para el consumo.



Tabla 1: Composición química de diferentes especies de animales de baste de carne. (Forrest, 1979)

Procedencia de la carne y estado físico	Porcentajes				Calorías por 100 gramos
	Proteína	Humedad	Grasas	Cenizas	
<i>Vacuno</i>					
<i>Cruda</i>	21.5	69.5	8.0	1.0	160
<i>Cocinada</i>	30.0	58.0	10.0	1.4	230
<i>Pollo</i>					
<i>Cruda</i>	23.4	73.7	1.9	1.0	117
<i>Cocinada</i>	31.6	63.8	3.4	1.2	166
<i>Cerdo</i>					
<i>Cruda</i>	19.5	69.5	9.5	1.0	170
<i>Cocinada</i>	27.0	57.0	12.0	1.3	230

1.3 TÉCNICAS DEL PROCESADO DE LA CARNE.

Los productos procesados cárnicos se definen como aquellos, en los que se han modificado las propiedades de la carne fresca mediante el empleo de una o más técnicas, tales como el picado o trituración, adición de condimentos, modificación del color o tratamiento térmico. [9]

1.3.1 Curado

El curado de las carnes se limita a las de vacuno y cerdo, tanto picadas como cortadas en piezas (como jamones, ancas, cabeza, costillas, lomos y panceta del cerdo y pierna y pecho del vacuno). Originalmente, el curado se practicaba para conservar las carnes saladas sin refrigeración, más actualmente la mayoría de las carnes curadas llevan además otros ingredientes y se conservan refrigeradas, y muchas se ahúman, por lo que son también, hasta cierto punto desecadas. Los agentes del curado permitido son: cloruro de sodio, azúcar, nitrato sódico, y vinagre, pero suelen usarse en general los cuatro primeros. Las funciones que tales productos cumplen son las siguientes: El cloruro de sodio o sal común se usa preferentemente como conservador y agente que contribuye al sabor. La salmuera en que se introduce la carne durante el curado suele tener una concentración de cloruro sódico del 15%, en contraste con la que se le inyecta, que tienen mayor concentración, aproximadamente al 24 %. Su principal objetivo es disminuir la actividad de agua (a_w). [5]



El nitrato sódico actúa indirectamente como fijador del color y es ligeramente bacteriostático en solución ácida, especialmente contra los anaerobios. Sirve también como material de reserva a partir del cual las bacterias reductoras pueden originar nitritos durante un curado largo. [5]

1.3.2 Ahumado

En los métodos antiguos de ahumado, cuando se usaban grandes concentraciones de sal durante el curado y cuando la desecación y la incorporación a la carne de principios conservadores del humo eran mayores, los productos obtenidos (jamones, cecina, etc.) podían conservarse sin refrigeración. Sin embargo muchos de los métodos modernos originan un producto alterable que debe conservarse refrigerado. Los jamones precocidos y los embutidos de alto contenido de humedad son ejemplos de este tipo. [5]

1.3.3 Picado o trituración

El proceso en virtud del cual se reduce el tamaño de la carne para incorporarla a productos tales como embutidos se denomina picado o triturado. El grado de triturado (o tamaño de la partícula) difiere mucho en los distintos productos elaborados y frecuentemente constituye una característica particular de cada producto; algunos se componen de carne picada groseramente, mientras que en otros el picado, es tan fino que constituye una emulsión cárnica. Todos los procesos de picado presentan dos ventajas: una mejor uniformidad del producto, y un aumento en el ablandamiento de la carne al subdividirla en partículas más pequeñas. [9]

1.3.4 Mezclado

El mezclado se aplica a una fase del procesado en la que los productos picados se someten a un proceso adicional de mezcla, antes de sufrir otras fases del procesado. La misión de un mezclado separado es asegurar una distribución de los ingredientes, especialmente de las sales del curado y condimentos, mas uniforme que la que podría conseguirse mediante una simple trituración. Los



embutidos triturados bastante se mezclan antes de introducirlos en las tripas. Una fase previa a la emulsificación consiste en la mezcla de la carne, especias y otros ingredientes. [9]

1.3.5 Emulsificado

Una emulsión es un sistema que consiste en una fase dispersa y una continua. Para que este sistema sea estable, es necesario un emulsificante en la interface. En las emulsiones cárnicas la fase continúa está constituida por agua, proteínas hidrosolubles y otros compuestos, mientras que la fase dispersa son glóbulos de grasa. La teoría de emulsión clásica, aplicada a sistemas de carne finamente triturada, declara que las proteínas de la carne, particularmente actina y miosina, estabilizan la grasa la desdoblarse y circular a los glóbulos de grasa con una capa de proteína. En un sentido estricto, las emulsiones cárnicas no son tales, ya que una emulsión debe tener un tamaño máximo de los glóbulos de grasa, en la fase dispersa, de 5 micras, en tanto la fase dispersa de la emulsión cárnica tiene diámetros de partículas mayores. Sin embargo, un sistema de emulsión es lo más cercano a este sistema disperso. El paté y el pastel de pollo son ejemplos de emulsiones cárnicas. [17]

1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS CARNICOS.

Existen varias clasificaciones para los productos cárnicos, sin embargo la más adecuada y aceptable es la establecida por la norma oficial mexicana-213, productos y servicios. Productos cárnicos procesados.

- *Productos cárnicos crudos.* Son aquellos elaborados con carne, vísceras o sus mezclas, que pueden ser o no curados o madurados, y que no son sometidos a algún tratamiento térmico incluyen hamburguesas, salamis, chorizos, pastas, entre otros. [8,28]



- *Productos cárnicos cocidos.* Los elaborados con carne, vísceras, sangre o sus mezclas, curados o no, que son sometidos a proceso térmico. Pueden presentarse enteros, en cortes, emulsionados o troceados. [8,28]
- *Productos cárnicos curados.* Son a los que se agregan por vía húmeda o seca, sal o azúcares, nitratos o nitritos, independientemente de que sean sometidos a algún tratamiento térmico, a maduración o se manejen crudos. [28]
- *Productos cárnicos desecados, secos o salados.* Comprende a productos sometidos a reducción de la humedad por medio de aire, calor o sal hasta llegar a un valor no mayor de 25%. [28]
- *Productos cárnicos empanados o rebozados congelados:* Son los elaborados con carne molida o picada o en piezas, con adición o no de tejido graso, subproductos y aditivos, que pueden recibir un tratamiento térmico durante su elaboración, pero que necesitan ser cocinados para consumirlos. [28]
- *Productos cárnicos fritos.* Se refiere a los productos elaborados a partir de carne o piel y que son sometidos a freído en aceite o grasa, con o sin sal, curados o no. [28]
- *Productos cárnicos madurados.* Son los que son sometidos a deshidratación parcial, pudiendo ser ahumados o no, sometidos durante cierto tiempo a la acción de cultivos microbianos o enzimas o microorganismos propios de la carne y su acción sobre azúcares añadidos o no. Pueden ser en cortes enteros o troceados. [28]
- *Productos cárnicos marinados o en salmuera.* Son los adicionados de sal u otros aditivos por vía seca o húmeda, excepto nitratos o nitritos, pudiendo ser cocidos o no. [28]



- *Productos cárnicos procesados.* Son los elaborados a partir de carne, vísceras, estructuras anatómicas, sangre o sus mezclas, provenientes de mamíferos o aves, que pueden someterse a ahumado, cocción, curación, desecación, maduración, salado, entre otros. [28]

1.5 ADULTERACIONES EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.

La adulteración, es decir, sustitución de carne con las alternativas más baratas, es un tipo de fraude que puede implicar problemas de salud y religiosos a los consumidores. Por ello, los comerciantes y consumidores necesitan asegurarse que cuando adquieren un producto específico, reciban exactamente lo que pagan y no un material adulterado. [22]

La determinación del origen de la especie animal en carne es una tarea importante en la inspección de alimentos, no sólo en el caso de carne cruda, sino también en el caso de la utilización de carnes de bajo costo por la industria, para la preparación de productos cárnicos. Por medio del análisis de alimentos se puede comprobar las sustituciones fraudulentas de carnes de alto valor económico, por ejemplo la carne de res por carnes baratas; la identificación de especies, son un pre-requisito en el control de calidad de los alimentos [10]. Por lo que la implementación de técnicas para la identificación de la especie en los productos cárnicos es de suma importancia tanto para la industria alimentaría como para los consumidores.

Una de las más apreciadas y consumidas a nivel mundial es la carne de res (vacuno), que incluye la de ternera, de vaca y del buey. Sin embargo en productos procesados derivados de esta especie es fácil adulterarla con carne de otras especies, con vísceras o despojos (hígado, riñón, pellejos) o con proteínas de origen vegetal (soya texturizada) que son más baratas. [22]



1.5.1 Especies de interés en la elaboración de productos cárnicos.

1.5.1.1 Carne de res

La carne de res (*Bos taurus*) es la más aceptada en todo el mundo. A esta especie animal pertenecen los ejemplares más grandes y voluminosos de los llamados animales de abasto, es decir, los que se utilizan habitualmente en el consumo humano. [42]

La carne de vacuno es un alimento altamente nutritivo, es una fuente importante de proteína de alta calidad, vitaminas del grupo B y minerales. Las proteínas de la carne de res contienen todos los aminoácidos esenciales para la nutrición balanceada. [4]

La carne de vacuno es menos grasa que la del cordero y el cerdo, y por eso, se le denomina 'carne magra', junto con la del pollo y el conejo. La carne magra contiene menos del 10% de la materia grasa. También es menos grasa y tiene más agua que la carne de ternera. [4]

No obstante, el valor varía según se trate de piezas pertenecientes al músculo aislado o con otro tipo de tejido unido a él, como la grasa por ejemplo, o dependiendo de que la res sea joven o vieja. Además, según la pieza que se trate, el contenido en grasa y en colesterol es muy variable. [9]

1.5.1.2 Carne de cerdo

La carne de cerdo (*Sus scrofa domestica*) proviene del animal de la familia *Suidae*. Todas las partes del cuerpo son comestibles, unos trozos se destinan a la charcutería, y otros se consumen frescos. Su grasa, adherida a la piel, se llama tocino, fundida, proporciona la manteca. El pelo muy duro (cerdas), se utiliza en la fabricación de cepillos. [4]



En el mercado normalmente se presentan como productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes, despojos, grasas y subproductos comestibles procedentes de cerdo u otras especies autorizadas, y en su caso otros ingredientes de origen vegetal o animal. [1]

1.5.1.3 Carne de pollo

El pollo (*Gallus gallus domesticus*) es el ave gallinácea de cría, macho o hembra, sacrificada con una edad máxima de 20 semanas (5 meses) y un peso que oscila entre 1 y 3 kilos. En la actualidad, el pollo se cría de manera intensiva en las granjas y en unos dos meses alcanzan los 1,5 kilos de peso. [42]

La carne de pollo tiene entre sus cualidades más importantes para el consumidor que es una carne económica y que sus fibras cárnicas son suaves a la mordida y fáciles de digerir. Entre sus ventajas se destacan que es un tipo de carne que rinde mucho, se encoje poco durante la cocción. [1]

La carne de pollo tiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados que las carnes rojas, pero menos que los aceites de origen vegetal, por eso tiene tendencia a enranciarse. Se ha reportado que la carne de pollo es fuente importante de niacina y una fuente moderada de riboflavina, tiamina y ácido ascórbico (vitamina C). [1]

1.5.1.4 Extensores (soya)

La soya (*Glycine max*) es la principal fuente vegetal de proteínas debido a su alto contenido proteico y a la relativa facilidad de su extracción, además de que es de fácil acceso económico para la población. [31]

A partir del Poroto de Soya, que es la semilla de la planta leguminosa, se realiza la extracción del Aceite de Soya, obteniendo así una harina desgrasada (procesada y secada), de textura esponjosa similar a la de la carne de origen animal. [31]



Debido al alto contenido proteico y sus propiedades funcionales los asilados proteicos de soya son adicionados para remplazar porciones de la proteína de la carne soluble en sal en sistemas de carne procesadas, por absorber y retener agua, formar y estabilizar emulsiones, absorber grasa, formar geles, proporcionar sustituto de carne o producir a partir de ella análogos de productos cárnicos después de la cocción. [31]

Tabla 2: composición química de harina de soya. (Potter, 1999)

Harina de Soya						
<i>Proteína (%) N x 5.7</i>	<i>Grasa (%)</i>	<i>Fibra (%)</i>	<i>Cenizas (%)</i>	Aislado proteico		
				<i>Rendimiento (g/100g de harina)</i>	<i>Nitrógeno (%)</i>	<i>Rendimiento (g/100g de Proteína)</i>
39.7	23.1	2.2	4.8	36.6	15.0	78.9

1.6 ADULTERACIÓN EN HAMBURGUESAS

Las hamburguesas se clasifican como un producto cárnico crudo elaboradas con carne molida cruda y sin embutir. [8]

La materia prima principal empleada para prepara este producto es la carne molida de res, ya que esta es de las más solicitadas por el consumidor, y por su naturaleza es fácil adulterarla con carne de otras especies (caballo, cerdo, pollo), con vísceras o despojos o con proteínas de origen vegetal (soya texturizada) que son más baratas. [22]

Es importante identificar adulteraciones en la carne molida de res y los productos que se elaboran con ella por ser un problema en la industria alimentaría al ser sustituida por materiales más baratos. De esta manera, la adulteración de la carne molida de res empleada para la elaboración de hamburguesas, además de considerarse una acción fraudulenta por los beneficios económicos que obtienen las personas que realizan esta actividad, representa un peligro a la salud de algunos consumidores. [22]



1.6.1 Elaboración de carne para hamburguesas.

La elaboración de la carne empleada para hamburguesas se lleva a cabo bajo el siguiente diagrama de bloques:

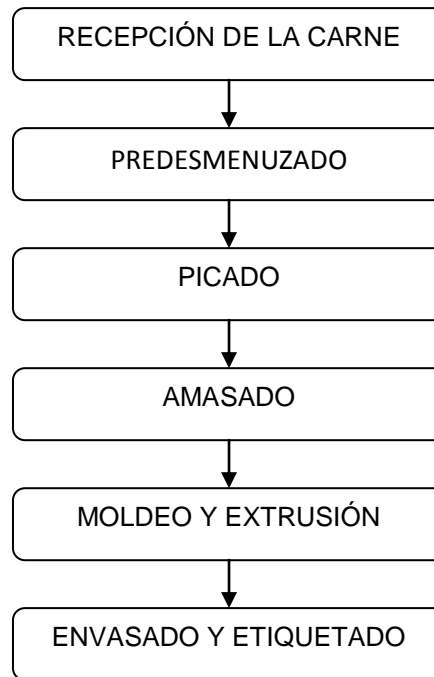


Figura 1: Diagrama de proceso para la elaboración de carne para hamburguesas (www.sectorcarnico.com)

RECEPCIÓN DE LA CARNE

La carne utilizada puede ser refrigerada o congelada y está obligada a cumplir los requisitos que garantizan la calidad de la carne, como estar libre de microorganismos dañinos. [43]

PREDESMENUZADO

El objetivo de esta operación es conseguir la primera reducción de tamaño de las piezas a unas dimensiones adecuadas para alimentar la picadora. Esta reducción se hace manualmente con cuchillos o mecánicamente con máquinas troceadoras.

[43]



PICADO

Este proceso es muy importante porque determina en gran medida la textura final del producto. En la elaboración de la hamburguesa el picado será grueso para conseguir una textura fibrosa y desmenuzable. Con carnes fibrosas se suelen utilizar picadoras separadoras, que separan las fibras de la carne magra. [43]

AMASADO

Con el amasado se normaliza la composición de la masa de carne y se distribuye de forma uniforme la sal y los demás ingredientes. Esta operación se realiza normalmente en amasadoras de forma de tambor, las de brazo amasador, las de aletas y las de hélice o eje espiral. [43]

MOLDEO Y EXTRUSIÓN

El moldeo y la extrusión proporcionan a la carne amasada la forma, el tamaño y la textura adecuados.

La carne picada se introduce en un cilindro del extrusor, donde es comprimida, amasada e impulsada por un orificio circular al dispositivo de moldeado y/o corte. Es importante controlar la temperatura, presión, el diámetro del orificio y la velocidad de las cizallas. [43]

ENVASADO Y ETIQUETADO

El envase utilizado para las hamburguesas suele ser la bandeja de poliestireno, con plásticos entre las piezas para evitar la adhesión entre ellas.

En el etiquetado es obligatorio poner la fecha de envasado y la de caducidad a demás de las consideraciones y especificaciones establecidas por las normas NOM-051-SCFI-1994^[27] y NOM-213-SSA1-2002^[28]. Las hamburguesas se comercializan refrigeradas o congeladas. [43]



CAPÍTULO 2: TÉCNICAS PARA DETERMINAR LA AUTENTICIDAD DE LA CARNE Y LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.

Se han desarrollado diferentes métodos analíticos para la identificación de especies en carne fresca y procesada con la finalidad de proteger al consumidor de posibles adulteraciones [37]. Actualmente existe una gran variedad de técnicas analíticas basadas en proteínas, y más recientemente se han empleado técnicas basadas en ácidos nucleicos, las cuales han logrado resultados más precisos y confiables. [23]

2.1 TÉCNICAS BASADAS EN PROTEÍNAS

Las técnicas basadas en proteínas son las que predominan como análisis para la determinar la autenticidad de la carne, sin embargo, la mayoría de las proteínas se desnaturalizan en los alimentos procesados térmicamente, dando como resultando cambios de la movilidad electroforética y antigenicidad de las mismas. Las técnicas electroforéticas e inmunológicas a menudo fallan en la detección de especies en productos procesados térmicamente, y en alimentos de composición compleja, ya que las altas temperaturas causan cambios de la conformación de las proteínas y otros componentes. [2, 24]

En el caso de las técnicas inmunológicas, los anticuerpos que se emplean pueden presentar reacciones cruzadas, sobre todo en las proteínas de especies estrechamente ligadas; esto es, cuando las proteínas se desnaturalizan durante el procesamiento, sucede que los anticuerpos diseñados para reconocer las diferentes especies, no reconocen sus antígenos específicos, llegando a dar resultados erróneos. [14, 40]

Otra de las principales desventajas de los inmunoensayos, es que su precisión puede verse afectada cuando se analizan alimentos procesados ya que estos son matrices complejas de proteínas y otros componentes. [18]



En México, la NOM-023-ZOO-1995 [32] para la identificación de especie animal, utiliza la prueba de inmunodifusión pasiva en gel. Sin embargo, esta técnica presenta actividad cruzada con las diferentes especies animales, ya que los anticuerpos utilizados son antisuero y no anticuerpos antimúsculo. Este es un protocolo que requiere de aproximadamente 24 horas para obtener resultados [3, 24]

De igual forma, con los métodos que utilizan electroforesis con isoelectroenfoque, no es posible determinar la autenticidad de productos cárnicos procesados, debido a que las altas temperaturas empleadas para este método degradan las proteínas solubles del músculo. [13]

Por todo lo anterior, que la detección de las sustitución fraudulenta de especies en productos cárnicos procesados y frescos requiere de métodos específicos y confiables para la autenticación de los mismos.

2.2 TÉCNICAS BASADAS EN ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Las técnicas basadas en ácidos nucleicos son consideradas metodologías de las más novedosas para la detección de la adulteración en productos cárnicos procesados. Estas consisten en técnicas basadas en el estudio de secuencias específicas de DNA de cada especie, las principales técnicas de este tipo son; la hibridación del DNA, la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y la amplificación polimórfica del DNA en forma aleatoria (RAPD). La principal ventaja de estas técnicas, es que debido a que el DNA es una molécula que se encuentra en todo tipo de células de un mismo individuo y contiene la misma información genética no importa el origen de la muestra. La información contenida en el DNA es mayor que en la encontrada en las proteínas, debido a que esta molécula es relativamente termoestable, por lo que es menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos, y aun degradado parcialmente permite identificar diferencias. [13]



2.2.1. Hibridación de DNA

El método de hibridación de DNA está 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, no marcado (hebras diana) con una sonda de secuencia conocida marcada bajo condiciones experimentales que permitan el apareamiento entre bases complementarias. [29]

Esto requiere la desnaturalización previa de las hebras dúplex de DNA, lo que generalmente se lleva 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 formen híbridos sonda-diana, si la muestra fuera auténtica. [19]

La detección de los productos se puede llevar a cabo 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 lleva a cabo en soporte sólido y las técnicas de hibridación en líquido in situ. Sin embargo dichas técnicas no se han ensayado para la autenticación de alimentos. [19]

2.2.2 DNA mitocondrial.

Las mitocondrias son orgánulos presentes en el citoplasma de las células eucariotas. Contienen esencialmente, las proteínas de la cadena respiratoria implicada en la síntesis del ATP. [6]

Las proteínas de la mitocondria tienen un doble origen. La mayor parte son codificadas por el DNA del núcleo, sintetizadas en el citoplasma y transportadas a las mitocondrias. Pero algunas de ellas son codificadas por el DNA mitocondrial



(mtDNA), pues la mitocondria posee su propia maquinaria para sintetizar proteínas.

[6]

Los genes de muchas de las proteínas y enzimas estructurales que se encuentran en las mitocondrias realmente son codificados por el DNA nuclear, son transmitidos en los ribosomas del citoplasma y luego son transportados a las mitocondrias; el genoma mitocondrial solo codifica algunas moléculas de rRNA y tRNA necesarias para la síntesis de proteínas mitocondriales. La organización de estos genes mitocondriales y cómo la forma en que se expresan es sumamente diversos entre organismos diferentes. [30]

El DNA de las mitocondrias humanas; está formado por dos hebras, es circular cerrado (16 569 pdb), codifica los rRNA (ácido ribonucleico ribosómico), tRNA y mRNA mitocondriales, una de las dos hebras contiene la mayoría de los genes. No contiene intrones, la herencia del mtDNA es citoplasmática es decir un embrión hereda el DNA del núcleo del espermatozoide y del núcleo del ovulo, pero también el mtDNA del citoplasma del ovulo, las mitocondrias son, por lo tanto, transmitidas sólo por la madre y en el caso en que el DNA materno contenga mutaciones, la cadena respiratoria puede estar perturbada lo cual puede manifestarse en enfermedades de origen mitocondrial transmitidas por la madre. la estructura y conformación del DNA mitocondrial se puede apreciar en la figura que se muestra a continuación. [6]

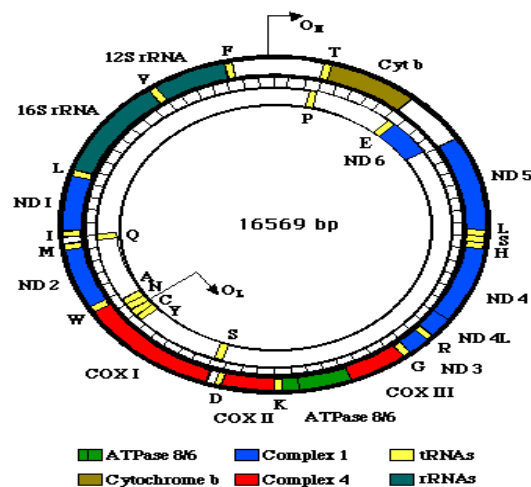


Figura 2: estructura del mtDNA humano



El uso del DNA mitocondrial (mtDNA) para llevar a cabo la identificación de especies por PCR ofrece una serie de ventajas sobre el DAN nuclear. Primero los genes están presentes en miles de copias por cada célula. Este hecho aumenta la posibilidad de amplificar moléculas de la muestra de tamaño adecuado de los fragmentos de DNA provocado por la desnaturalización de las hebras. Segundo el inmenso conocimiento de la organización genética del DNA animal, así como la disponibilidad de las secuencias informadas de muchas especies, hace posible una selección fácil de primers específicos para la amplificación. Tercero, la gran variabilidad del DNA permite llevar a cabo una identificación fiable de especies precisas en mezclas alimenticias. [25]

2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es un método poderoso para amplificar segmentos específicos de DNA, este método es diferente de la clonación y la propagación dentro de una célula hospedera [35]. Este procedimiento consiste en la síntesis enzimática in vitro de millones de copias de un segmento específico de DNA de la especie de interés, que muestre diferencias en la secuencia de nucleótidos, incluso en especies relacionadas y de esta forma pueda ser analizado. [34]

La replicación de una molécula ocurre mediante una reacción en la que un par de primers (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 de interés. [34,35]

Para que esto suceda, es necesaria la presencia de una enzima: la DNA-polimerasa, misma que se encarga de catalizar la replicación del DNA mediante la adición de nucleótidos complementarios de la hebra molde del DNA a un extremo 3' libre de la hebra naciente. Esta enzima requiere además de DNA molde, el cual se denomina primer o cebador, es decir un fragmento de DNA monocatenario que



hibride con el DNA molde, y que suministre el extremo 3' libre a partir del cual ocurre la polimerización. [13]

2.2.3.1 Fundamento de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa implica un conjunto de tratamientos desarrollados in vitro sobre una región sobre una región de DNA para su amplificación selectiva. El proceso requiere el conocimiento previo de la secuencia de dos regiones cortas que flanqueen a la que se pretende amplificar; estas regiones son utilizadas, para lo cual es necesario previamente conseguir su asociación al DNA molde desnaturalizada. [27]

2.2.3.2 Descripción de la PCR

Aun cuando actualmente existen un gran número de métodos para la clonación y secuenciación de DNA, sin embargo, la PCR es una técnica altamente confiable y específica, que se ha convertido en una de las herramientas por excelencia para la identificación de especies y clonación, convirtiéndose así en la base de una metodología analítica insustituible. [27]

2.2.3.2.1 Etapas de la reacción

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos de temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura ($> 90^{\circ}\text{C}$), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros [34]. Las tres etapas que se repiten durante los ciclos son:

Desnaturalización

La desnaturalización de la doble hebra de DNA es determinante para la obtención de hebras simple a partir de la molécula de DNA.



La desnaturalización se debe tanto a la ruptura de los puentes de hidrogeno entre pares de bases, como de las interacciones hidrofobicas entre bases apiladas al desnaturalizarse. Las dos hebras del DNA se separan y pasan a una conformación al azar sin que se altere la estructura primaria, ya que no hay ruptura de enlaces covalentes. [27]

Ese paso se lleva a cabo sometiendo a la muestra a altas temperaturas (94-95°C), La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la hebra, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización. [34]

Hibridación

Durante esta etapa el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada. [34]

Elongación

En esta etapa actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'- hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80°C



(comúnmente 72°C). El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. [27, 34]

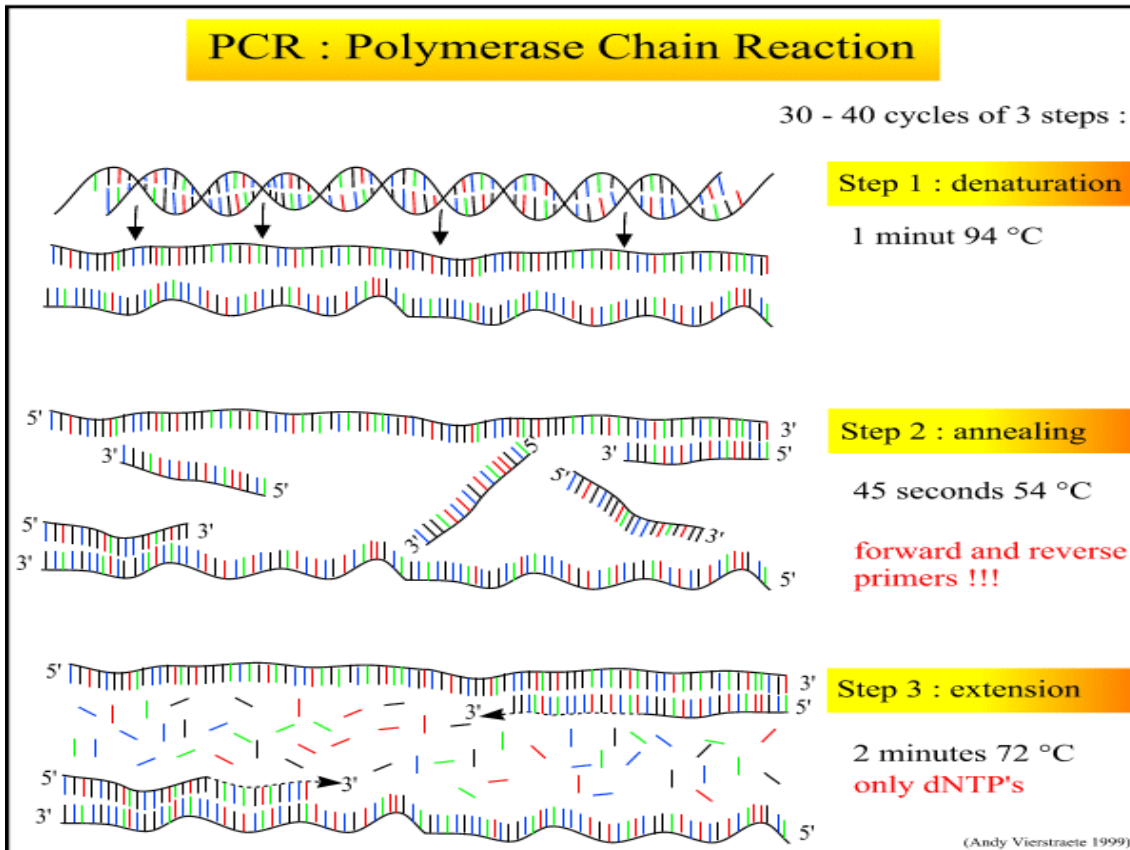


Figura 3: Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa

2.2.3.2.2 Componentes de la reacción

Para poder llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa se requiere de los siguientes componentes esenciales:

- **DNA polimerasa termoestable**

Inicialmente se empleó la DNA polimerasa de *Escherichia coli*, como enzima polimerizadora, pero debido a su inestabilidad térmica era necesario agregarla a cada ciclo, haciendo muy costosa la prueba. Tomando en cuenta los problemas que producía el empleo de esta enzima, se purificó una enzima termoestable a partir de bacterias *Thermus aquaticus* que actualmente se conoce como Taq polimerasa. Esta enzima tiene un peso



molecular cercano a los 93.910 Da y su temperatura óptima, en que se observa su actividad máxima, es entre 75 y 80°C; su tasa de incorporación de nucleótidos, es de unos 150 nucleótidos/seg/enzima. [29]

- **Oligonucleótidos sintéticos (Primers)**

De todos los factores que influyen sobre la eficiencia y especificidad de la reacción de amplificación, el más crucial es el diseño de los primers, en donde es muy importante atender diversos factores:

- La longitud de los oligonucleótidos utilizados para cebar la reacción de PCR deberá de ser de secuencia corta (15 a 30). Cuando mayor sea su tamaño, mayor es la posibilidad de que se asocien a secuencias no perfectamente complementarias y conduzcan a la amplificación de productos no específicos. [29]
- La composición de bases de los cebadores es importante por el efecto que tiene sobre la estabilidad del híbrido; lo ideal es que tengan 50% de GC. Si el porcentaje es menor, interesa que tenga mayor longitud, para evitar una baja temperatura de fusión. [29]
- Deben evitarse secuencias con bases repetidas (más de 3 o 4 seguidas), para dificultar uniones no correctas. [29]

Los cebadores han de estar presentes en la reacción a una concentración adecuada. Su ausencia detiene el proceso de amplificación, pero una cantidad excesiva puede provocar su unión inespecífica y la amplificación de secuencias no deseadas. [29]

Para la amplificación de secuencias específicas y determinadas, se utilizan cebadores también específicos, derivados de regiones conocidas que flanquean la secuencia de interés. [29]



- **Desoxynucleosidos trifosfatos (dNTPs) en exceso.**

Son Desoxinucleotidos con dos átomos de fósforo mas, que suelen agregarse en concentraciones superiores a lo establecido ya que se gastan en la reacción rápidamente, la concentración de dNTP y el $MgCl_2$ va relacionada. Ya que la enzima necesita de Mg para poder incorporar a los dNTP. [34]

Para una concentración de 200 μM de cada dNTP suele añadir a una concentración de 1.5 mM. [29]

- **Cationes divalentes**

Todas las DNA polimerasa termoestables requieren de cationes divalentes libres para su actividad, usualmente Mg^{2+} , sin embargo, la presencia de estos está más ligada a la presencia de dNTPs y oligonucleótidos, debido a que son ellos los que se unen al catión. La concentración molar del catión, debe exceder la concentración molar de los grupos fosfato que aportan dNTPs más los primers. [34]

2.2.3.2.3. Ventajas y desventajas de la PCR

Ventajas

- ✓ Es un método de replicación del ADN que no depende de la maquinaria de la célula ni de vectores
- ✓ Hace posible la amplificación de una sola o de pocas copias de un fragmento de ADN, generando millones de copias del mismo.
- ✓ Amplifica eficientemente fragmentos desde menos de 100 bases hasta de 35 kb
- ✓ Es un proceso muy específico cuyo objetivo es solamente el ADN que se desea copiar.
- ✓ Es una técnica muy versátil, pueden ser analizadas muchos tipos de muestras



- ✓ Es un proceso de alta fidelidad, sus errores están en niveles tan bajos como 1/10 000 y 1/100 000.
- ✓ Puede combinarse con otras técnicas, ejemplo con ELISA.
- ✓ La principal ventaja es la habilidad de utilizar muestras minúsculas para producir un alto rendimiento del ADN objetivo amplificado, la especificidad de la reacción, la flexibilidad del método y la simplicidad y velocidad de procedimiento automático. [6,34,41]

Desventajas

- ✓ Costos de la técnica
- ✓ Capacitación del personal
- ✓ Conocimiento de secuencias específicas
- ✓ Control de la contaminación
- ✓ Inhibidores de la PCR [6,34,341]

2.2.3.2.4. Contaminación de las reacciones de PCR

Debido a que la PCR puede generar trillones de copias de DNA de la secuencia molde, la contaminación de las reacciones de amplificación con productos de una reacción previa, ya sea con DNA exógeno o con otro material celular, puede crear problemas tanto en la investigación como en la aplicación diagnóstica. [36]

En general, la tención debe ser muy cuidadosa en el procedimiento del laboratorio, además, se debe tener a la mano un sin número de controles negativos para monitorear y revelar los contaminantes. [36]

2.2.3.2.5. Análisis del producto de una PCR

Después de la amplificación, al finalizar la reacción, el DNA de interés puede ser colocado en un gel de agarosa, realizar el corrimiento electroforético, teñirlo y observar en luz ultravioleta el producto de la PCR. [36]



El análisis fino y la caracterización se realizan empleando metodologías adecuadas para cada caso en particular, como lo es el análisis electroforético en geles de poliacrilamida, digestiones con enzimas de restricción, hibridación con detectores específicos (genes clonados) o secuenciación nucleotídica, por mencionar solo algunas. [36]

2.2.3.2.6 Aplicaciones de la PCR

Actualmente las aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa son numerosas, debido a que esta técnica ha resultado ser una herramienta de gran ayuda, debido a su alta especificidad y confiabilidad. Algunas de sus aplicaciones más importantes son:

Clonación: en el campo de la biología molecular, la PCR se utiliza para la clonación molecular de genes y su secuenciación nucleotídica. La PCR favorece la clonación si se incorporan regiones de restricción. [36]

Diagnostico clínico: en este campo, la PCR se usa en la genética médica para el diagnostico de enfermedades hereditarias y de algunas cromosomopatías comunes; en el campo de la inmunología se emplea para determinar asociaciones entre el complejo mayor de histocompatibilidad y la predisposición genética para el desarrollo de enfermedades autoinmunes; en el campo de la oncología, para probar mutaciones activadoras de oncogenes o supresoras de antioncogenes, para detectar arreglos cromosómicos presentes en procesos neoplásticos y para la detección de virus, entre otros muchos aspectos. [36]

Proceso evolutivo: en este ámbito la PCR se ha aplicado a estudios de secuencias conservadas del DNA, acelerando la reconstrucción de árboles filogenéticos y se ha convertido en el instrumento más accesible para el análisis de especies en vías de extinción. [36]



Alimentos: recientemente, debido a la necesidad que se tiene con respecto a la seguridad del consumidor, y los alimentos que llegan hasta el, en cuanto a la autenticidad de los alimentos procesados y su calidad, se han tenido que desarrollar técnicas eficaces para asegurar estos aspectos en los alimentos. Para llevar a cabo dicha práctica se hace uso de manera exitosa de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa ya que esta permite confirmar con fiabilidad y rapidez la calidad y pureza de los alimentos y productos alimenticios, lo que constituye un asunto de vital importancia para las empresas del sector alimentario y la seguridad del propio consumidor. [36]

2.2.3.2.7. PCR múltiplex

La PCR múltiplex es una variación de la PCR convencional, en la cual más de un par de primers es usado en la reacción en cadena de la polimerasa. El objetivo de esta técnica es amplificar diferentes segmentos del DNA de interés, empleando una única muestra del DNA objetivo, en poco tiempo y minimizando costos. [23]

El rendimiento de cada uno de los productos amplificados es reducido en proporción al número de primers que se incluyan en la reacción. Sin embargo como una regla general, más de ocho pares de primers empleados simultáneamente en la reacción pueden ocasionar un bajo rendimiento en la amplificación de los productos hasta el punto de causar la invisibilidad de estos en el posterior análisis de los productos en un gel de agarosa. [34]

Para obtener resultados favorables en la reacción múltiple, se debe tener especial cuidado en que todos los primer empleados posean aproximadamente la misma temperatura de desnaturalización, estos cebadores deberán garantizar que no presentaran interacciones entre si, salvo con la pareja específica de cada uno de ellos, los productos obtenidos podrán ser analizados por electroforesis en gel. [34]

Para optimizar la reacción Múltiplex, deberá tomarse en consideración lo siguiente:

- Comprobar que los primers seleccionados amplifican eficazmente por separado, utilizando el mismo programa de PCR. [34]



- Determinar la cantidad adecuada de cada pareja de primers para logra la máxima amplificación de estos, en reacciones separadas bajo el mismo programa de PCR y las mismas condiciones de reacción. [34]
- Equilibrar la cantidad de cada par de primer incluidos en la reacción múltiplex para lograr una amplificación aceptable de todas las regiones designadas de interés. [34]

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 CUADRO METODOLÓGICO

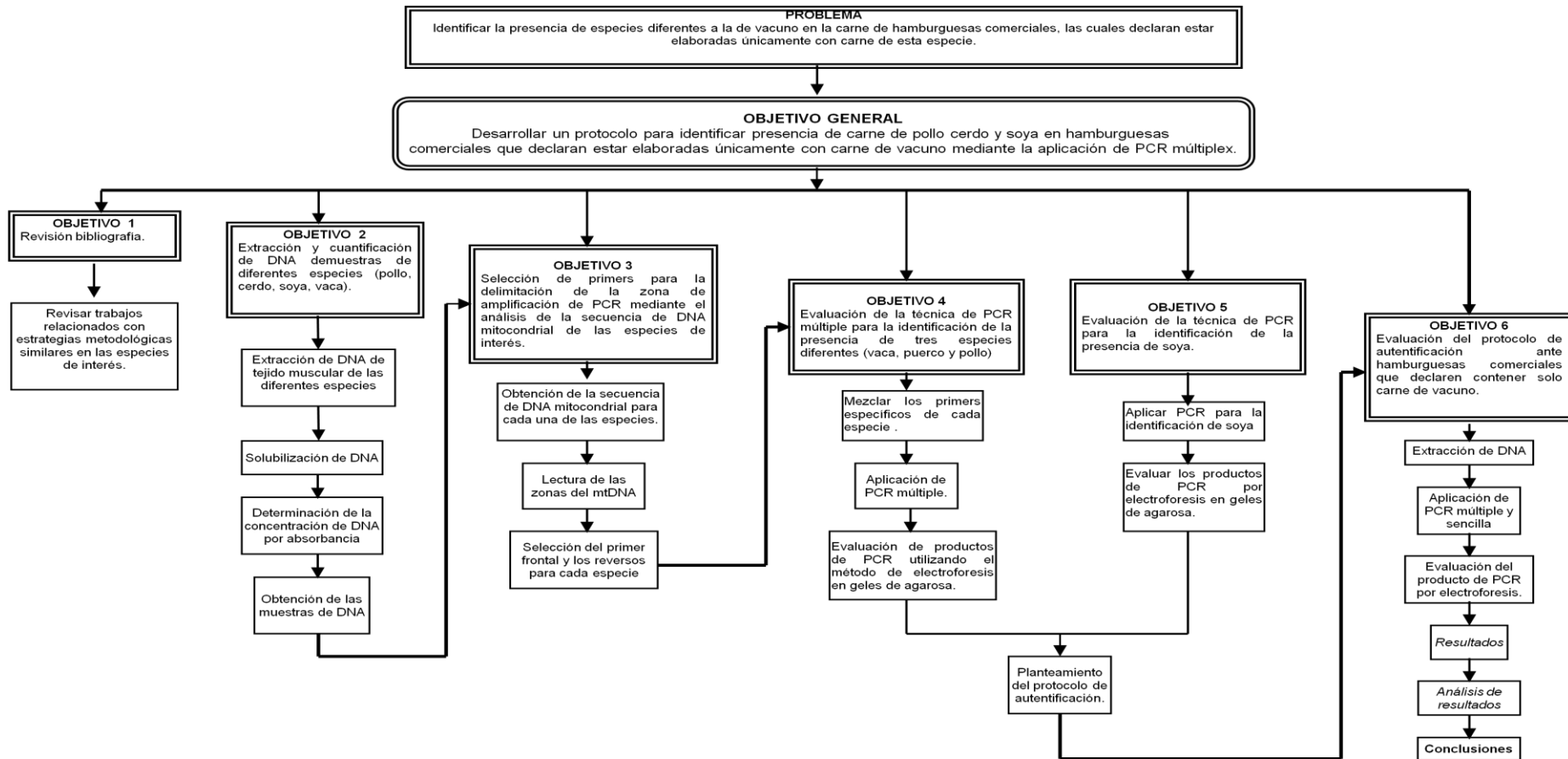


Figura 4: Cuadro metodológico



3.2 DESCRIPCIÓN DEL CUADRO METODOLOGICO

PROBLEMA

Identificar la presencia de especies diferentes a la de vacuno en la carne de hamburguesas comerciales, las cuales declaran estar elaboradas únicamente con carne de esta especie.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo para identificar presencia de de pollo, cerdo y soya en hamburguesas comerciales que declaran estar elaboradas únicamente con carne de vacuno mediante la aplicación de PCR múltiplex.

Objetivo particular 1

Revisión bibliográfica

- Revisar trabajos relacionados con estrategias metodológicas similares en las especies de interés.

Objetivo particular 2

Extracción y cuantificación de DNA de muestras de las diferentes especies (pollo, cerdo, soya, vaca).

- Extracción de DNA de tejido muscular o vegetal de las diferentes especies en estudio.
- Solubilización de DNA.
- Determinación de la concentración de DNA por absorbancia a 260nm

Objetivo particular 3

Selección de primers para la delimitación de la zona de amplificación de PCR mediante el análisis de la secuencia de DNA mitocondrial de cada una de las especies de interés.

- Obtención de la secuencia de DNA mitocondrial para cada una de las especies.
- Lectura de las zonas del mtDNA de las diferentes especies.



- Selección del primer frontal y los reversos para cada especie.

Objetivo particular 4

Evaluación de la técnica de PCR múltiplex para la identificación de la presencia de tres especies animales diferentes (vaca, cerdo y pollo).

- Mezclar los primers específicos de cada especie.
- Aplicación de PCR múltiplex.
- Evaluación de productos de PCR utilizando el método de electroforesis en geles de agarosa.

Objetivo particular 5

Evaluación de la técnica de PCR para la identificación de la presencia de soya.

- Aplicar PCR para la identificación de soya.
- Evaluar los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa.
- Planteamiento del protocolo de autenticación.

Objetivo particular 6

Evaluación del protocolo de autenticación ante hamburguesas comerciales que declaren contener solo carne de vacuno.

- Extracción de DNA de productos comerciales.
- Aplicación de PCR múltiplex, para especies animales (cerdo, vaca y pollo).
- Aplicación de PCR simple para la especie vegetal (soya).
- Evaluación del producto de PCR por electroforesis.
- Resultados.
- Análisis de resultados.
- Conclusiones.



3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Material biológico

De acuerdo con lo que se pretende realizar durante el desarrollo del presente proyecto, las muestras requeridas fueron las siguientes:

Muestras en fresco:

- Bovino (Bos taurus)
- Pollo (Gallus gallus domestica)
- Porcino (Sus scrofa)
- Soya (Glicine max)

Muestras procesadas:

- Muestra comercial 1
- Muestra comercial 2
- Muestra comercial 3
- Muestra comercial 4
- Muestra comercial 5
- Muestra comercial 6
- Muestra comercial 7
- Muestra comercial 8

De cada una de las muestras se empleó un peso aproximado de 50g, la cual fue congelada, para su posterior molido y homogenizado. Las muestras de estos productos se mantuvieron en congelación durante periodos no mayores a 15 días.

3.3.2 Extracción de DNA total a partir de tejido.

Para la extracción de DNA de las muestras objetivo (vacuno, cerdo, pollo y soya), se empleo el protocolo clásico de Sambrook, J. Este protocolo se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasa, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamilico, seguido de la



precipitación de DNA con etanol frío. A continuación se describe el protocolo completo:

Reactivos:

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

Material y Equipo:

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

Método:

Disgregación del tejido:

- Enjuagar el tejido con agua estéril y no tocarlo con las manos, usar guantes.
- Congelar una porción de este tejido empleando nitrógeno líquido o en congelador normal.
- Con ayuda de un mortero, moler la muestra congelada.
- Pesar 150µg de la muestra en un tubo Eppendorff.
- Adicionar 1250µl de solución de Lisis.
- Agitar con vortex hasta que se visualicen pedazos más pequeños.
- Adicionar 7µl de enzima proteasa previamente concentrada a 20mg/ml.
- Incubar los tubos a 50°C en Termoblok por 2 horas.



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

Extracción de proteínas y polisacáridos:

- Adicionar al tubo con la muestra, 0.25ml de la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico.
- Mezclar el tubo varias veces suavemente.
- Centrifugar a 10,000rpm durante 10min a temperatura ambiente.
- Separar las fases, recuperar la fase acuosa superior que contiene el DNA. Es importante evitar recuperar cualquiera de las otras fases.
- Trasladar la fase recuperada a 2 tubos eppendorff nuevos.

Precipitación de DNA

- Adicionar 1500µl de etanol frío a cada uno de los tubos con la muestra.
- Mezclar suavemente.
- Centrifugar a 10,000rpm, durante 10 min.
- Decantar el etanol y dejar secar en la incubadora a 37°C. el DNA debe visualizarse pegado al tubo como una mancha blanca.
- Una vez que el etanol haya sido eliminado, se adiciona agua libre de nucleasas para resuspender el DNA agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.
- Cuando la solución presenta partículas insolubles, se reintenta la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol-cloroformo-alcohol isoamilico, y se vuelve a lavar con etanol

3.3.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia

Este método es útil para preparaciones de ácidos nucleicos altamente puras, pues se detecta cualquier compuesto que absorbe luz significativamente a 260nm. Lo cual incluye; DNA, RNA, EDTA y fenol. La relación de absorbancia a 260nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA y RNA con



proteínas puesto que los aminoácidos aromáticos absorben luz a 280nm. 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.

[34]

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260 y 280nm. La lectura de 260nm permite conocer la concentración de ácidos nucleicos que contiene la nuestra analizada. La relación entre las lecturas a 260 y 280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tiene 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 **1.7** entonces no puede cuantificar el DNA presente en la muestra. [34, 38]

Reactivos:

- Muestra de DNA de las diferentes especies (Pollo, Cerdo, Vaca, Soya).
- Agua libre de nucleasas.

Material y equipo:

- Espectrofotómetro, *Abccesolab* NanoDrop ND-1000 A113
- Micropipeta
- Tubos eppendorf.

Método:

- Calibra el equipo colocando 2µl de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo



Figura 5: Espectrofotómetro, para cuantificar concentración de DNA

- Abrir el programa de Nanodrop y seleccionar la opción de ácidos nucleicos.



- Colocar nuevamente 2 µl de agua libre de nucleasas para registrarlo como blanco.
- Correr el programa.
- Colocar 2 µl de la muestra de ADN a cuantificar y correr el programa.
- Registrar la concentración de ADN proporcionada por la relación 260/280, registrada por el equipo.
- Limpiar adecuadamente el equipo.

3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reactivos:

- Kit para PCR, *Promega* que contiene :
 - Agua libre de nucleasas
 - PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400µM de cada dNTP y 3mM de MgCl₂)
- Primers:

Los primers utilizados para la identificación de especies animales mediante PCR multiplex, fueron los diseñados por T. Matsunaga y col [23], publicados en su artículo de 2001, las secuencias correspondientes a estos primers son las que a continuación se muestran.

 - Especies animales:
 - Primer SIM
(5'GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3')
 - Primers reversos
 - Pollo (5'-AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG-3')
 - Amplificado de : 227pb
 - Vacuno(5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3')
 - Amplificado de : 274pb



- Cerdo (5'-GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA-3').
Amplificado de: 398pb

- Soya:

Para el caso de la soya los primers empleados fueron los trabajados por A. Kanasawa y col; publicados en su artículo de 1998 [15], las secuencias de estos primers son mostradas a continuación.

- Primer frontal: (5'-AGCGGGGTAGAGTAATTGGTC-3')
- Primer reverso: (5'-CAAGGAGCATCGTGAGGAATAG-3')
- Amplificado de: 305pb

Materiales y equipo:

- Termociclador, *Apollo* ATC401 CLP
- Juego de micropipetas
- Tubos eppendorf.

Preparación de la reacción

Para la preparación de la reacción es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes principales de la reacción (primers y DNA). Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 250nM, mientras que el DNA requiere una concentración baja puesto que, teóricamente, una sola copia de DNA debería ser suficiente para la adecuada amplificación, sin embargo, la extracción del DNA implica la colecta de millones de cadenas originales .

La preparación de las muestras para la reacción se llevo a cabo de acuerdo con el protocolo que precisa promega para el kit de PCR. Los componentes se prepararon en tubos de 25µl tal como se muestra en la tabla 3:



Tabla 3. Componentes de PCR.

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

Etapas y ciclos de la reacción

La programación del termociclador se efectuó de acuerdo a las condiciones señaladas en las figuras 6 y 7 las condiciones están basadas en las recomendaciones de T. Matsunaga y col, para el caso de las tres especies animales, mientras que las condiciones para soya fueron tomadas las que se reportan en el artículo publicado por A. Kanasawa y col.

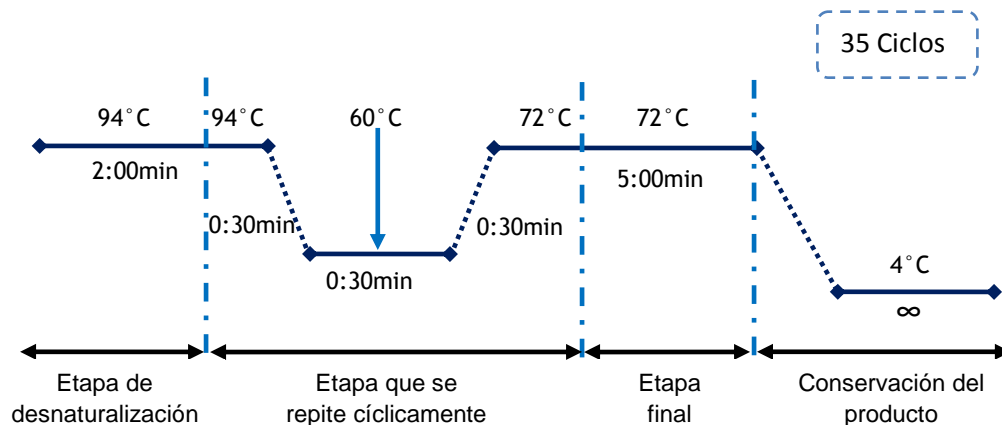


Figura 6: Etapas y condiciones programadas en el termociclador para especies animales (Vaca, Cerdo, Pollo).

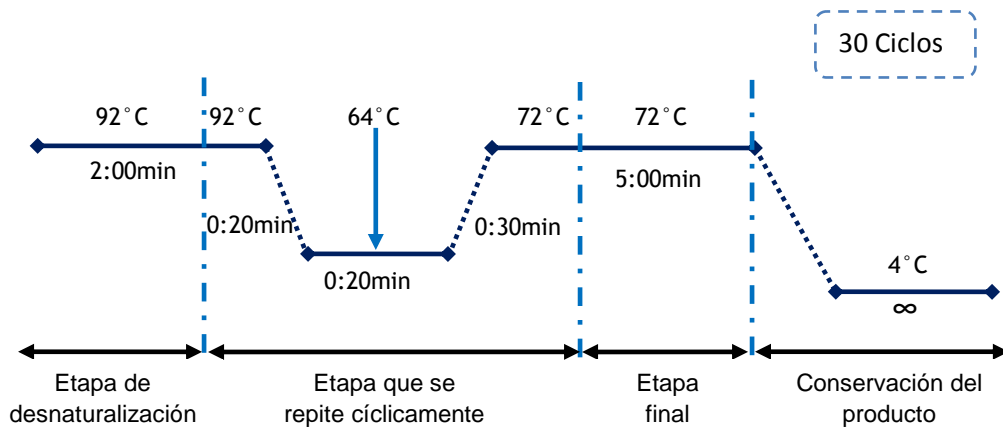


Figura 7: Etapas y condiciones programadas en el termociclador para Soya.

3.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es una técnica bioquímica estándar para la separación de moléculas sobre la base del tamaño y la carga eléctrica. Hay varios tipos diferentes de electroforesis; para separar las moléculas de DNA se utiliza electroforesis en gel. [29]

El gel es sometido al paso de corriente a través de él. Dado que el grupo fosfato de cada nucleótido de DNA posee una carga negativa, los fragmentos de DNA migran hacia el extremo positivo del gel y la movilidad de estos dependerá de su tamaño. [29]

La electroforesis para el análisis de los productos obtenidos de PCR se realizó de acuerdo a lo siguiente:

Reactivos

- Agarosa, *Gibco ERL*
- Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8.
- Bromuro de etidio en concentración(Bret) de 10mg/ml



- Marcador de peso molecular, *Promega*
- Tinte cargador azul/naranja 6X, *Promega*.
- Muestras de las reacciones de PCR.

Materiales y equipo

- Fuente de poder, *Bio-Rad PowerPac 200*
- Cámara y Cassete de electroforesis, *Apollo 75.710*
- Micropipetas
- Parafilm

Método:

- Pesar 1000 mg de agarosa para preparar un gel al 2% y se agregan 50ml del amortiguador TAE 50X
- Colocar en el microondas a temperatura baja, para que la agarosa se disuelva, evitando que esta ebulle.
- Retirar el matraz del microondas y esperar a que la solución alcanza la temperatura ambiente.
- Agregar una gota de bromuro de Etidio y homogeneizar.
- Transferir la solución de agar a la charola de electroforesis y colocar el peine.
- Esperar a que el agar solidifique y retirar el peine.
- Colocar la charola en la cámara de electroforesis.
- Agregar a la cámara la cantidad necesaria de amortiguador TAE 1X, para cubrir el gel.
- Colocar sobre parafilm 5µl de la muestra, 2 µl de azul de bromofenol, 2 µl de bromuro de etidio diluido.
- Homogeneizar la muestra con el azul de bromofenol y el Bret empleando una micropipeta.
- Transferir la muestra homogeneizada a uno de los pozos del gel de agarosa.
- Repetir los tres pasos anteriores con el resto de las muestras.



- Encender la fuente de poder y programar el voltaje a 90v dejar funcionar hasta que el azul de bromofenol recorra 2/3 partes del gel.
- Apagar la fuente de poder y retirar cuidadosamente el gel.

3.3.5 Análisis de los resultados de electroforesis

La visualización de los resultados de los geles de electroforesis se llevo a cabo en un transiluminador de luz UV marca Claver Scientific LTD, la captura de estas imágenes visualizadas se logró utilizando un equipo de fotografía para luz UV marca Kodak digital Science. Estas condiciones son esenciales para la detección del bromuro de etidio intercalado en los fragmentos de DNA presentes en el gel, esto es debido a que la radiación UV es absorbida a 254nm por el DNA y transmitida al colorante, el cual unido por si mismo absorbe la luz a 302nm y 366nm. En ambos casos, la energía es re-emitida a 590nm en la región rojo-naranja del espectro visible. [34]



CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo particular 1

Revisión bibliográfica.

Para llevar a cabo este trabajo fue necesario realizar una investigación bibliográfica de los trabajos hechos con anterioridad referentes al tema de interés, con la finalidad de tener un mayor conocimiento sobre este.

Al hacer esta revisión se encontró un artículo realizado por Matsunaga y col. cuyo objetivo era la identificación de diferentes especies animales simultáneamente en productos cárnicos, debido a que el trabajo reportado en este artículo era muy semejante a lo que se pretendía hacer en esta investigación de tesis, se optó por tomarlo como la principal referencia, obteniendo de él los primers a utilizar así como las condiciones para llevar a cabo la PCR en el caso de las especies animales de interés (cerdo, vaca, pollo).



ELSEVIER

Meat Science 51 (1999) 143–148

MEAT
SCIENCE

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

T. Matsunaga^a, K. Chikuni^{b*}, R. Tanabe^b, S. Muroya^b, K. Shibata^a, J. Yamada^a,
Y. Shinmura^a

^aJapan Meat Processors Association, Ebisu 1-5-6 Shibuya-ku, Tokyo 150, Japan

^bNational Institute of Animal Industry, Tsukuba Norindanchi, PO Box 5, Ibaraki 305, Japan

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

Figura 8: Presentación del artículo publicado por Matsunaga y col.



Objetivo particular 2

Extracción y cuantificación de DNA de muestras de las diferentes especies de interés (pollo, cerdo, soya, vaca).

Se llevó a cabo la extracción de DNA total para las muestras en fresco (carne de pollo, vacuno, cerdo y soya), empleando el protocolo de Sambrook modificado antes descrito. Posteriormente se cuantificó la concentración de DNA a través del Nanodrop, las concentraciones obtenidas se muestran a continuación:

Tabla 4. Cuantificación de DNA para muestras de vacuno, pollo, cerdo y soya sin diluir.

<i>Muestra</i>	<i>260/280</i>	<i>ng/μL</i>
<i>Vacuno</i>	1.77	664.7
<i>Pollo</i>	1.96	1446.8
<i>Cerdo</i>	1.78	720.9
<i>Soya</i>	1.74	1267.1

La tabla 4 muestra las concentraciones de DNA obtenidas, se puede apreciar que estas fueron muy elevadas por lo que fue necesario diluir las muestras para obtener concentraciones más adecuadas, para ello fue necesario calcular la cantidad de agua necesaria para ajustar la concentración de DNA a 60 *ng/μL* aproximadamente.

Una vez diluidas las muestras se cuantificó nuevamente la concentración de DNA obteniéndose los siguientes resultados que fueron más adecuados para llevar a cabo la aplicación de PCR.

Tabla 5. Cuantificación de DNA para muestras de vacuno, pollo, cerdo y soya diluidas.

<i>Muestra</i>	<i>260/280</i>	<i>ng/μL</i>
<i>Vacuno</i>	1.74	65.6
<i>Pollo</i>	1.94	106.7
<i>Cerdo</i>	1.8	69.4
<i>Soya</i>	1.79	61.0



La tabla 5 muestra las concentraciones finales, con las cuales se llevará a cabo la PCR, en esta tabla se puede apreciar que tanto la relación 260/280 como las concentraciones de DNA obtenidas son aceptables, ya que para el caso de la relación 260/280 los resultados se encuentran dentro del rango requerido (mayor a 1.7) lo cual indica que el DNA extraído cuenta con una la pureza necesaria para llevar a cabo la reacción, en cuanto a la concentración de DNA de las muestras, las cantidades resultantes nos garantizan que habrá la cantidad necesaria de DNA para que la reacción se dé.

Objetivo particular 3

Selección de primers para la delimitación de la zona de amplificación de PCR mediante el análisis de la secuencia de DNA mitocondrial de cada una de las especies de interés. Los primers empleados fueron obtenidos de artículos publicados.

En el caso de las tres especies animales (vacuno, cerdo y pollo) se tomó como referencia el artículo publicado por Matsunaga, y col, 1999, en donde se hace uso de la región del citocromo b y se diseñó un primer universal que reconozca las tres especies para que estas puedan ser identificadas simultáneamente.

La figura 9 muestra el diseño de dichos primers:

SIM= primer universal frontal

Las especies de interés son:

B= Vacuno (Bos Taurus)

C= Pollo (chiken)

P=Cerdo (Pig)

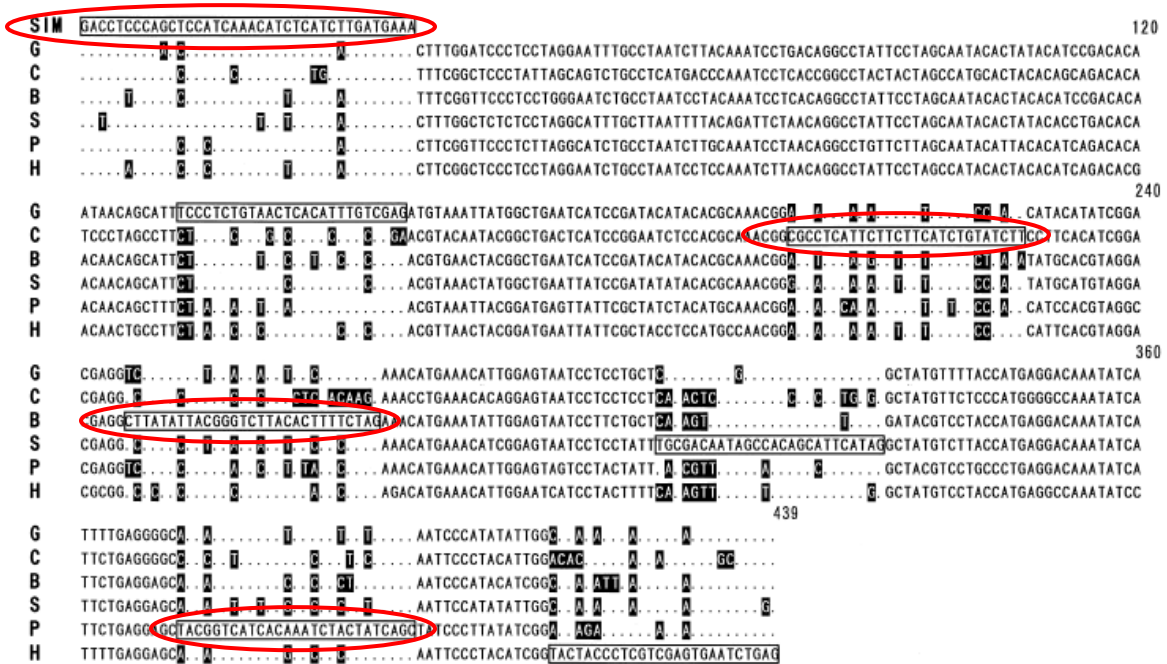


Figura 9: Diseño de los primers específicos para las especies animales (vaca, pollo y cerdo) y primer universal, las secuencias marcadas en rojo son los primers que se emplearán.

En la figura 9 se muestra la comparación de las secuencias de 439pb de las 6 diferentes especies estudiadas por Matsunaga. Se aprecia al inicio la secuencia del primer universal (SIM), el cual no presenta diferencias en las zonas críticas finales en ninguna de las especies, de ahí su carácter universal, en los rectángulos marcados se observan las posiciones que corresponderán a los primers reversos específicos para cada especie, como se observa cada fragmento presenta diferencias en uno o ambos extremos con el resto de las especies, lo cual les otorga su especificidad, en los rectángulos en negro se muestran los nucleótidos diferentes entre las distintas especies. Las secuencias marcadas en rojo son las correspondientes las tres especies que se trabajaron en este proyecto.

Con relación a la soya se emplearon los primers reportados por Kanasawa y col, 1998; la secuencia de estos primers corresponden a la sección de los genes mitocondriales atp6 y cox 2. Estos primers permiten obtener un amplificado de 305 pb que corresponden a una región entre los genes atp6 y cox2 del mtDNA. [15]



Una vez elegidos los primers se procedió a corroborarlos a través del programa bioinformático Blast. (Ver anexo 1).

Una vez corroboradas las secuencias, se procedió a comprobar su especificidad con cada una de las especies de interés mediante la aplicación de PCR simple, con las condiciones programadas en el termociclador para las especies en estudio, mostradas con anterioridad en el capítulo 3.

Posteriormente se evaluó el resultado a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%, los resultados de esta evaluación se muestran en la figura 10:

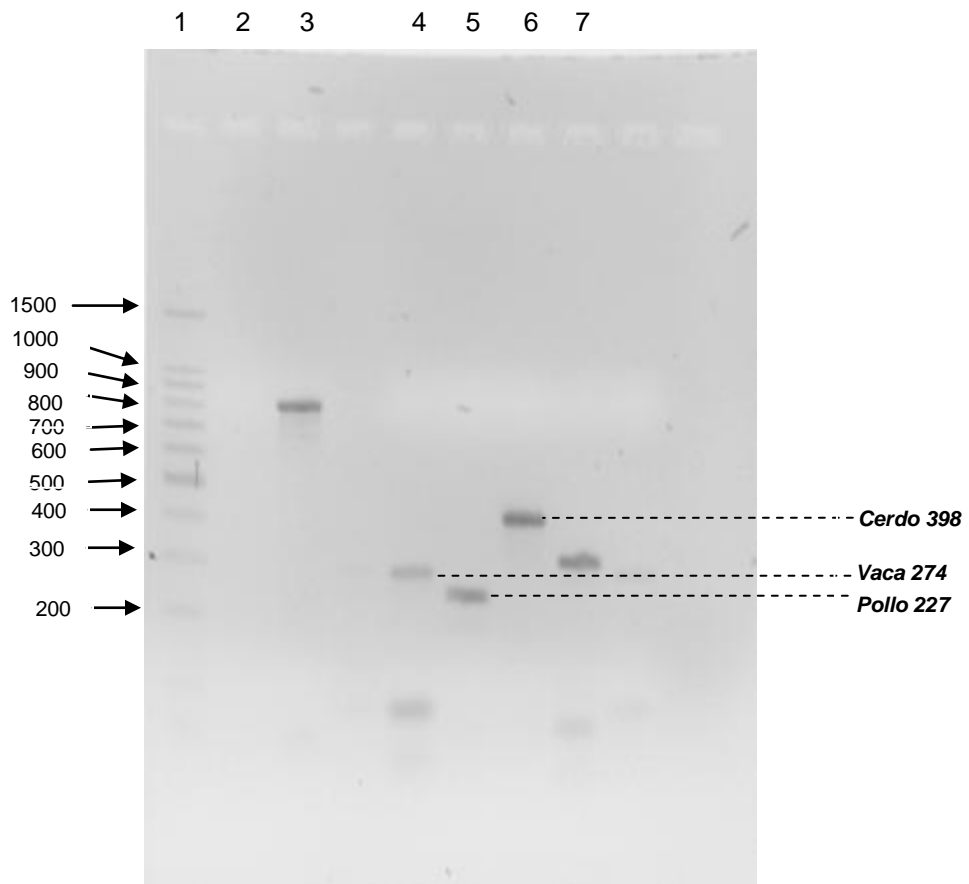


Figura 10: Evaluación de la especificidad de los primers para especies animales. 1) Marcador de peso molecular, 2) Blanco, 3) C+ humano, 4) Vacuno, 5) Pollo, 6) Cerdo, 7) soya.



Mediante este análisis se pudo comprobar, que los primers empleados son eficientes para la identificación de las especies objetivo, ya que en el gel de electroforesis mostrado en la figura anterior se aprecian bandas definidas, en el lugar esperado de amplificación, para cada una de las especies trabajadas.

Objetivo particular 4

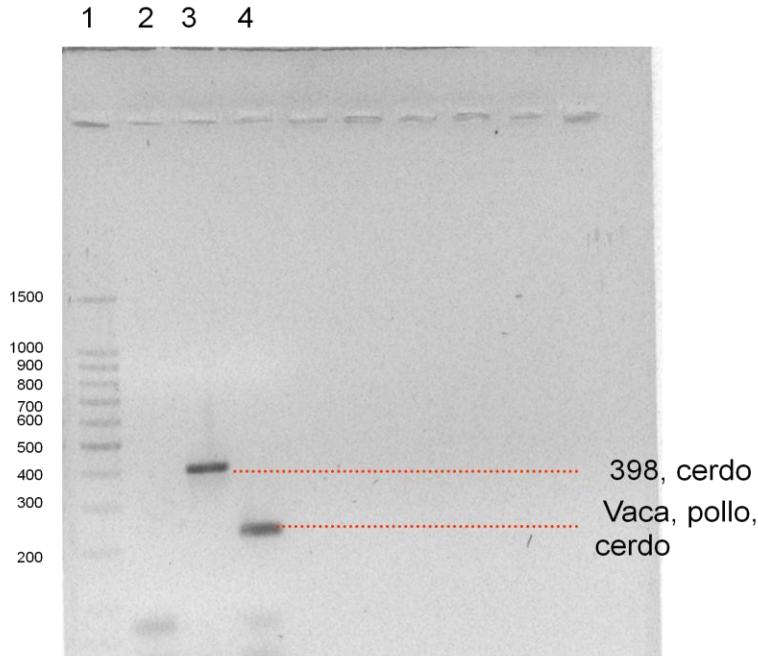
Evaluación de la técnica de PCR múltiplex para la identificación de la presencia de tres especies animales diferentes (vaca, cerdo y pollo).

Como ya se mencionó el objetivo de la aplicación de PCR multiplex es identificar simultáneamente varias especies, en este caso (vacuno, pollo y cerdo). Sin embargo para poder llevar a cabo esta actividad primero se tiene que comprobar que las concentraciones empleadas de los primers en conjunto serán las adecuadas para identificar la presencia de estas especies en hamburguesas, para ello es necesario evaluar la técnica multiplex usando DNA de cada una de las especies y comprobar que estas son identificables, con las concentraciones y condiciones propuestas para llevar a cabo esta técnica.

Para lograr obtener las concentraciones adecuadas de los primers a utilizar, se realizaron varias pruebas, variando las proporciones de los primers al ser mezclados, los resultados obtenidos de estas pruebas se presentan en las siguientes figuras:



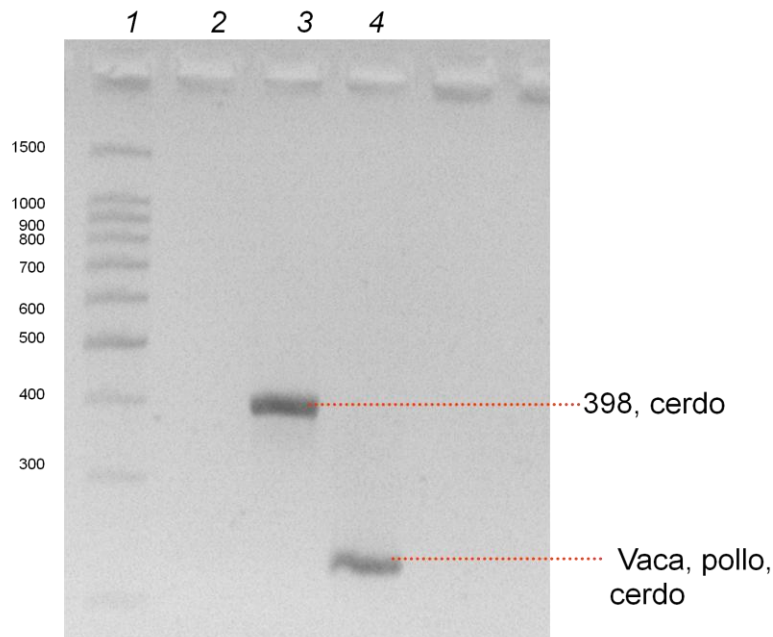
Prueba 1



Proporción de Primers	
Sim:	1.5 μ l
Cerdo:	0.5 μ l
Vaca:	0.5 μ l
Pollo:	0.5 μ l
DNA:	3 μ l mezcla de DNA
Gel al 2%	
Potencia: 90V	

Figura 11: Prueba 1 para determinar las concentraciones adecuadas de primers para PCR multiplex. 1) Marcador de peso, 2) Blanco, 3) C+ (Cerdo), 4) Mezcla de DNA (vaca, pollo, cerdo).

Prueba 2



Proporción de Primers	
Sim:	1 μ l
Cerdo:	0.6 μ l
Vaca:	0.6 μ l
Pollo:	3 μ l
DNA:	1.5 μ l de mezcla de DNA
Gel al 3%	
Potencia: 60V	

Figura 12: Prueba 2 para determinar las concentraciones adecuadas de primers para PCR multiplex. 1) Marcador de peso, 2) Blanco, 3) C+ (Cerdo), 4) Mezcla de DNA (vaca, pollo, cerdo).



La figura 11 corresponde a la prueba 1 la cual se hizo empleando las mismas concentraciones de primers que fueron ocupadas para verificar su especificidad en el objetivo 3 y se mezcló 1 μl de DNA de cada una de las especies en estudio, empleándose los 3 μl resultantes de esta mezcla para llevar cabo la PCR, la concentración del gel fue la misma que se empleó para el objetivo anterior, sin embargo, a pesar de que estas concentraciones resultaron adecuadas en el objetivo 3, para llevar a cabo la técnica multiplex no fue así, ya que no se aprecia la separación esperada de las tres bandas en el carril 4, por lo que se decidió cambiar las condiciones empleadas para realizar la PCR.

La figura 12 muestra el gel obtenido de la prueba 2, en donde se cambiaron las concentraciones de los primers, ocupándose para llevar a cabo la reacción las concentraciones recomendadas por Matsunaga, la concentración del gel y la potencia aplicada en la electroforesis también fueron modificadas; la concentración del gel fue disminuida, ya que al tener un gel más concentrado el desplazamiento de las macromoléculas de DNA se dificultara, lo cual favorecerá a la separación de las tres bandas correspondientes a las especies de interés para la PCR multiplex, mientras que un menor voltaje aplicado en la electroforesis resultara conveniente ya que al disminuir éste, la velocidad de desplazamiento de las macromoléculas también disminuye, y de esta forma se da más tiempo para que la separación de las bandas se lleve a cabo. Sin embargo, a pesar de las modificaciones realizadas en ambas pruebas, no se logró obtener la separación deseada de las bandas, por lo que fue necesario realizar más pruebas para encontrar las concentraciones ideales para llevar a cabo la reacción de PCR multiplex.



Prueba 3:

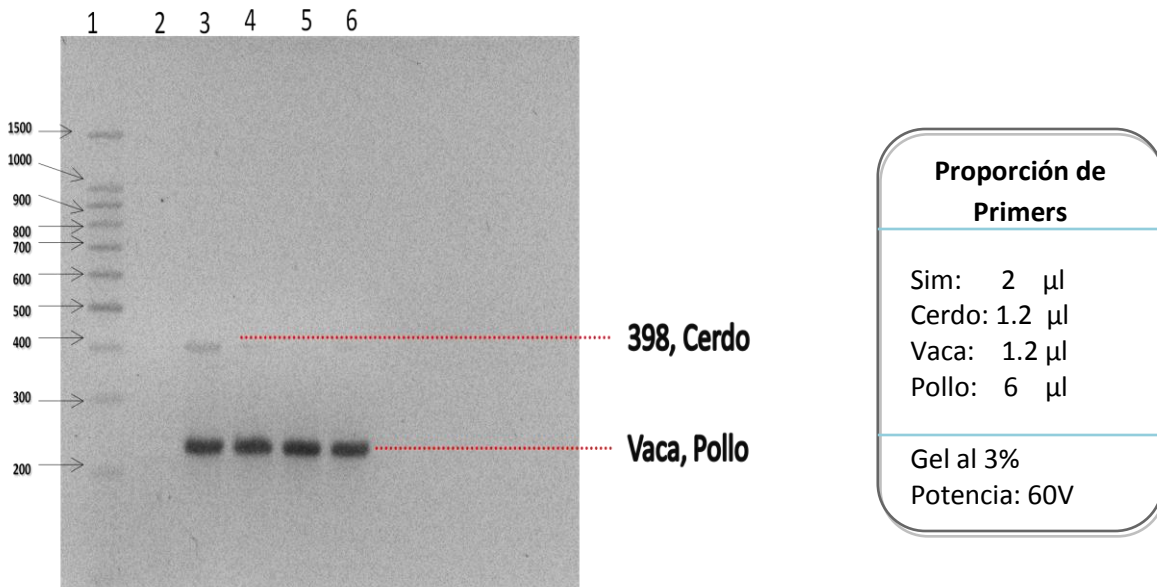


Figura 13: Prueba 3 para determinar las concentraciones adecuadas de primers para PCR multiplex. 1) Marcador de peso, 2) Blanco, 3) M 1, 4) M 2, 5) M 3, 6) M4

Para llevar a cabo la tercera prueba se decidió variar las proporciones de los primers empleados al doble de lo recomendado por Matsunaga, pero esta vez se mezclaron antes de realizar la PCR, en cuanto a la cantidad DNA que se utilizaría, también se hizo una mezcla, tomando 1 μ l de DNA de cada una de las especies (cerdo, vaca, pollo). Una vez realizadas estas mezclas se procedió a llevar a cabo la reacción, pero esta se realizó con diferentes proporciones de las mezclas anteriores, estas proporciones se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6: mezclas de DNA y primers para llevar a cabo la reacción de PCR multiplex.

MEZCLAS PARA LA REACCIÓN				
	M1	M2	M3	M4
Mezcla de Primers	0.5 μ l	0.5 μ l	1 μ l	1 μ l
Mezcla de DNA	1 μ l	0.5 μ l	1 μ l	0.5 μ l



Cada una de las mezclas mostradas en la tabla fueron empleadas para llevar a cabo una reacción de PCR diferente, y de esta manera encontrar la proporción adecuada de primers para poder realizar la PCR multiplex. Estas reacciones fueron evaluadas en el mismo gel de electroforesis, bajo las mismas condiciones que en la prueba 2, este gel se puede apreciar en la figura 13.

En la figura 13 se puede observar que con las proporciones manejadas en esta prueba, se logra una separación solo de dos bandas; cerdo (398) y una banda que contiene a las dos especies restantes, vaca (274) y pollo (227). La razón por la cual las bandas las especies de vaca y pollo no se logran separar, es quizá, porque su rango de amplificación está muy cercano el uno del otro, además que al tener solo un primer que funge como frontal para todas las especies se genera competencia por este, lo cual hace que la separación de bandas muy cercanas se dificulte. La proporción manejada en el carril 3 fue la más conveniente, ya que con estas proporciones se aprecia mejor las bandas de amplificación.

Con base en los resultados obtenidos de la última prueba se decidió que la PCR múltiplex se llevaría cabo con reacciones independientes, es decir, una reacción para Cerdo y vaca, y otra para pollo solamente, además que las proporciones de los primer y DNA sería las mismas que se utilizaron para la reacción mostrada en el carril 3 del gel anterior (0.5 μ l de la mezcla de primers y 1 μ l de la mezcla de DNA). con esto se busca que al aplicarse el protocolo de autenticación mediante PCR multiplex en productos comerciales, si existiera adulteración de estos, se pueda apreciar claramente, teniendo bandas separadas lo suficiente.

Para llevar a cabo estas modificaciones se realizó una última prueba, donde se buscaba verificar que las especies entre las cuales había más distancia en cuanto a las bandas de amplificación (cerdo y vaca), se pudieran ver claramente, el gel de la evaluación de esta prueba se muestra en la figura siguiente.

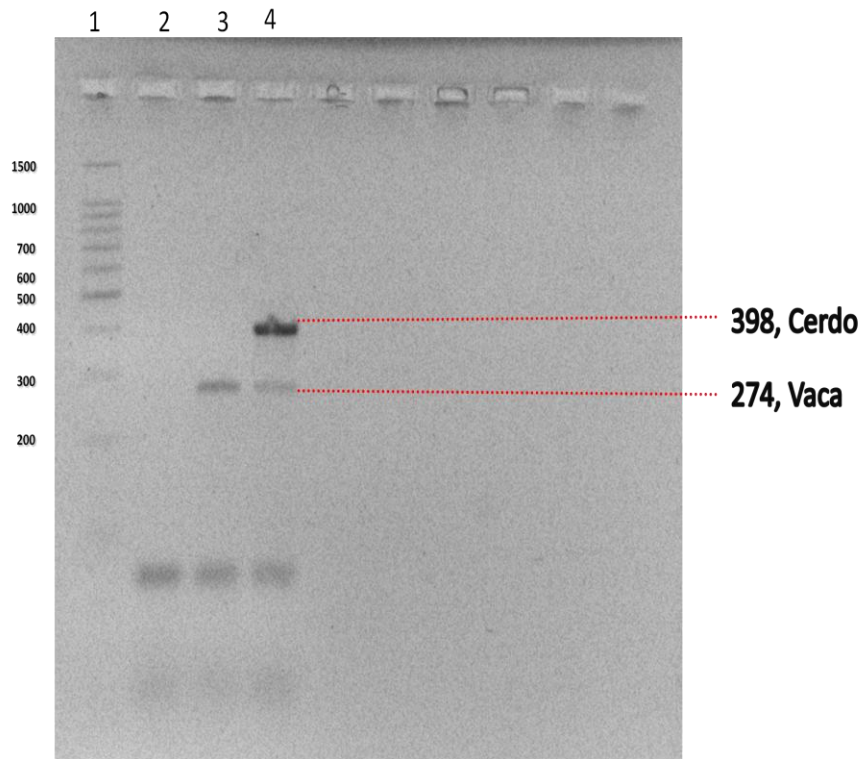


Figura 14: Evaluación electroforética para confirmar las concentraciones de primers a emplear 1) Marcador de peso, 2) Blanco, 3) C+ vaca, 4) Mezcla de DNA de vaca v cerdo.

En la figura 14, se observa que las concentraciones de primers fueron las adecuadas para llevar a cabo la PCR y poder identificar dos especies en una sola reacción, las bandas obtenidas en esta prueba están definidas y los amplificados se obtuvieron en las zonas esperadas.

Con la realización de esta prueba se logró establecer las concentraciones de primers que se utilizaran para aplicará el protocolo de autenticación en los productos comerciales.

Objetivo particular 5

Evaluación de la técnica de PCR para la identificación de la presencia de soya.

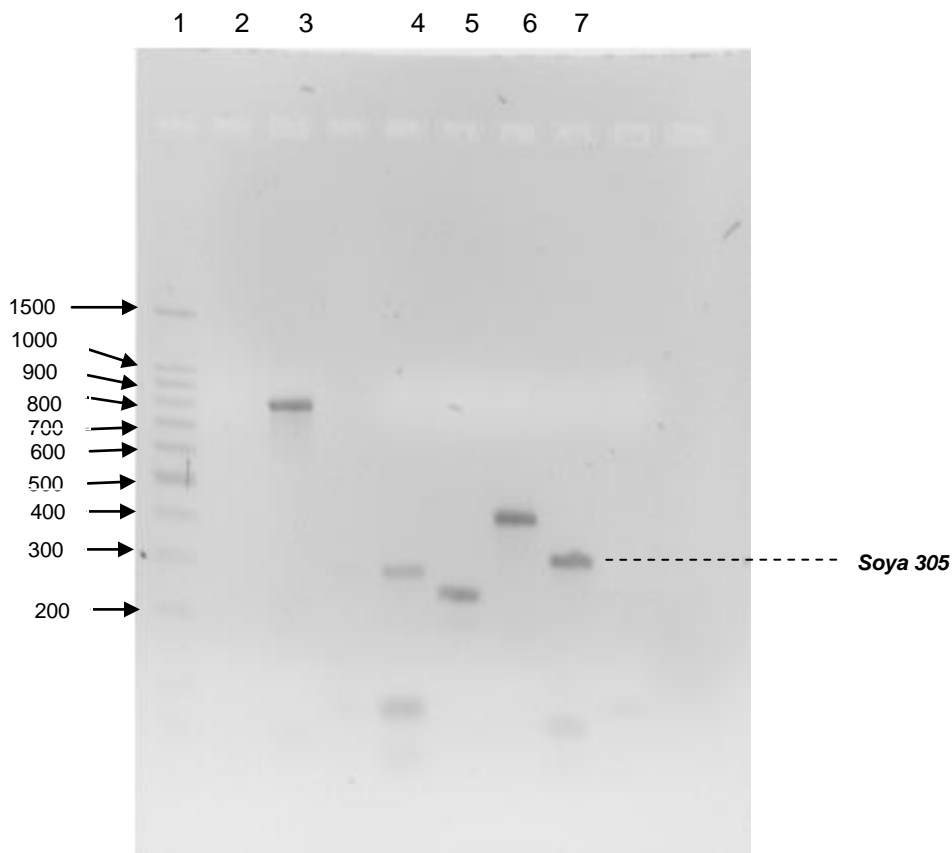


Figura 15: Evaluación electroforética de PCR simple para soya;
1) Marcador de peso molecular, 2) Blanco, 3) C+ humano, 4)
Vacuno, 5) Pollo, 6) Cerdo, 7) soya.

En el caso de la soya también fue necesario evaluar la especificidad de los primers elegidos, empleando DNA de soya. Como se puede observar en la figura anterior se obtuvo una buena amplificación y visualización de la banda de soya, por lo que se puede confirmar que las condiciones empleadas para llevar a cabo la PCR de soya son las adecuadas para la posterior evaluación de presencia de soya en hamburguesas, la evaluación de la PCR para soya se llevó a cabo al mismo tiempo, que para las especies de origen animal, por lo cual se pueden apreciar también las bandas de amplificación de estas especies.



Planteamiento del protocolo de autenticación

Una vez evaluada la especificidad de los primers con las distintas especies y definidas las concentraciones adecuadas a emplear de estos a si como las condiciones para llevar a cabo la PCR, el protocolo de autenticación queda planteado de la siguiente manera y deberá llevarse a cabo de esta forma al ser empleado en los productos comerciales.

- La extracción de DNA de los productos a autenticar se debe llevar a cabo como se presenta en el capítulo 3 (extracción de DNA total a partir de tejido).
- Las condiciones para llevar a cabo la PCR deberán ser las señaladas en el apartado 3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Los primers y las cantidades a usar deberán ser las definidas en los objetivos anteriores y las cuales se muestran a continuación:

- **PCR simple para evaluación de soya**

Primers:

Frontal: 5´-AGCGGGGTAGAGTAATTGGTC-3´

Reverso: 5´-CAAGGAGCATCGTGAGGAATAG-3´

La cantidad a emplear para la reacción, de cada primer será de 0.5µl, mientras que la cantidad de de DNA de muestra será de 1µl.

La evaluación electroforética se llevara a cabo en un gel de agarosa al 2% y se correrá con una potencia de 90v

- **PCR Multiplex para evaluación de especies animales (Cerdo, Vaca y pollo)**

Primers:

SIM (frontal): 5´GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3´

Reverso Pollo 5´-AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG-3´



Reverso Vacuno 5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3'

Reverso Cerdo 5'-GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA-3'

Debido a que la evaluación de cerdo y vaca se harán en la misma reacción debe llevar a cabo una mezcla de primers de cerdo 1.2 µl, Vaca 1.2 µl, SIM 2 µl, de la cual se tomarán 0.5

Para evaluar la especie de pollo las cantidades de primers eran 0.5 µl pollo y 0.5 µl de SIM. Mientras que la cantidad de DNA será de 1 µl.

La evaluación electroforética se llevará a cabo en un gel de agarosa al 3% y se correrá con una potencia de 60v.

Objetivo particular 6

Evaluación del protocolo de autenticación ante hamburguesas comerciales que declaran contener solo carne de vacuno.

Una vez que se ha evaluado la técnica tanto de PCR multiplex para especies animales como PCR simple para soya por separado y se ha comprobado que las condiciones empleadas para llevar a cabo las reacciones son las adecuadas para poder identificar adulteración con estas especies en hamburguesas, el protocolo se evaluará en diferentes hamburguesas comerciales.

Para aplicar el protocolo de autenticación propuesto, fue necesario realizar la extracción de DNA de 8 muestras comerciales de hamburguesas, esto se hizo mediante el protocolo de Sambrook definido anteriormente para el objetivo particular 2, la extracción de DNA se hizo tanto en productos térmicamente procesados, como en aquellos que no recibieron este tratamiento, los resultados que se obtuvieron de estas extracciones se pueden observar en las tablas siguientes.



Tabla 7: Concentraciones de DNA y relación 260/280 obtenidas para las diferentes muestras comerciales de hamburguesas trabajadas. S/P = muestra sin procesar, P= muestra procesada.

MUESTRAS CONCENTRADAS	260/280	ng/μL
Muestra 1 (S/P)	2.04	3300.4
Muestra 2 (P)	1.79	2124.8
Muestra 3 (P)	1.86	18637
Muestra 4 (S/P)	1.97	3318.4
Muestra 5 (P)	1.89	774.0
Muestra 6 (P)	1.91	905.4
Muestra 7 (S/P)	1.75	970.2
Muestra 8 (S/P)	1.87	514.0

En la tabla 7 se puede observar que las concentraciones de DNA resultantes de la extracción son muy elevadas al igual que en el objetivo 2, cabe hacer notar que a pesar de que se trabajo con muestras que fueron sometidas a un tratamiento con calor, estas también permitieron obtener una gran cantidad de DNA, menor en comparación a la mayoría de las muestras no procesadas, esto debido a que en el caso de las primeras, el calor aplicado durante el tratamiento, degradó parte del DNA disponible, en cuanto a la relación 260/280, los valores son aceptables, lo cual señala que la pureza del DNA obtenido es adecuada, sin embargo, para llevar a cabo la PCR, la cantidad de DNA requerida es menor, por lo tanto estas concentraciones obtenidas fueron diluidas para poder tener valores aceptables y llevar a cabo la PCR, estas diluciones se realizaron de la misma forma que fue señalada en el objetivo particular 2, y los resultados de estas se muestran en la tabla 8, que se muestra a continuación.



Tabla 8: Concentraciones de DNA diluidas y relación 260/280 obtenidas para las diferentes muestras comerciales de hamburguesas trabajadas. S/P = muestra sin procesar, P= muestra procesada.

MUESTRAS DILUIDAS	260/280	ng/μL
Muestra 1 (S/P)	1.71	117.0
Muestra 2 (P)	1.67	85.2
Muestra 3 (P)	1.70	103.5
Muestra 4 (S/P)	1.70	123.8
Muestra 5 (P)	1.91	69.5
Muestra 6 (P)	1.89	71.8
Muestra 7 (S/P)	1.75	70.2
Muestra 8 (S/P)	1.64	68.3

Las concentraciones de DNA, al ser diluidas disminuyeron sus valores, y estas disminuciones fueron las adecuadas para llevar a cabo la PCR para soya y para las especies animales; en cuanto a la relación 260/280 los valores se mantuvieron dentro del rango, ambos valores obtenidos, concentraciones y relación 260/280, garantizan que la reacción se llevara a cabo de forma adecuada y que los resultados obtenidos fueron confiables.

Las muestras diluidas de DNA de los productos comerciales fueron empleadas primero para aplicar el protocolo de autenticación con respecto a soya, la evaluación de este protocolo se pudo visualizar en la siguiente figura, que corresponde al gel de electroforesis que se obtuvo.



Evaluación de presencia de soya en hamburguesas comerciales

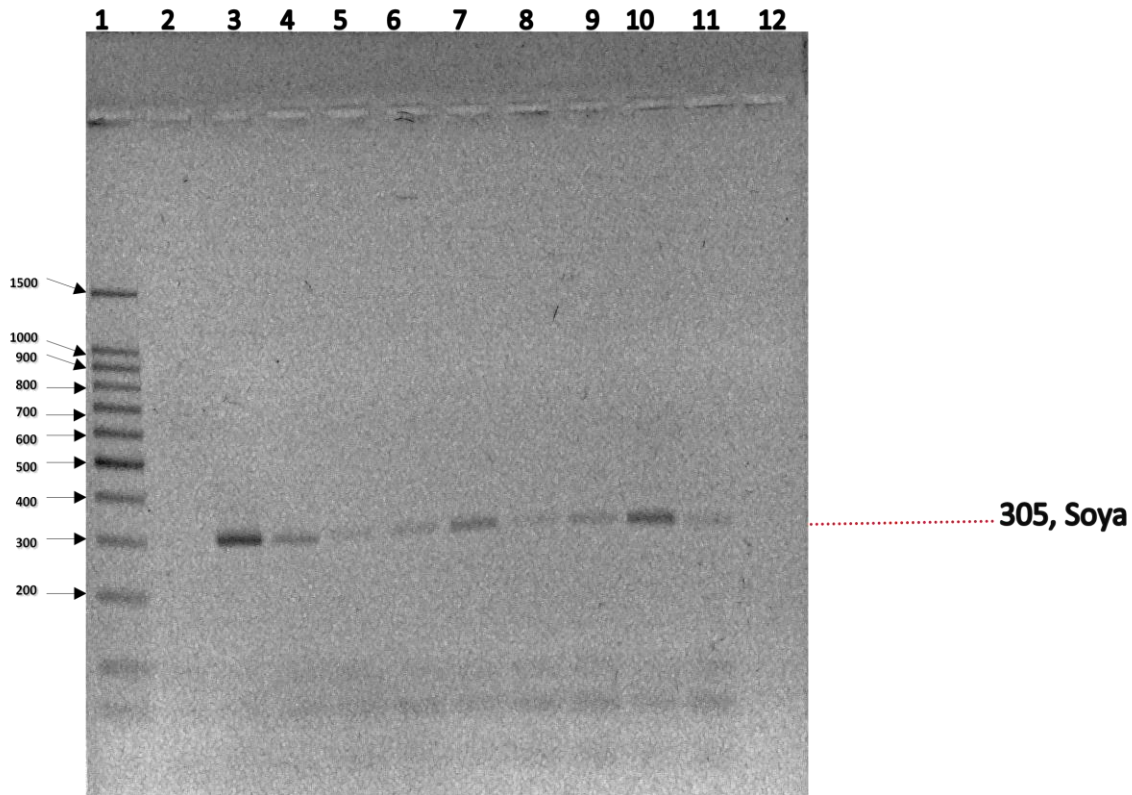


Figura 16: Evaluación electroforética de PCR simple para soya en productos comerciales; 1) Marcador de peso molecular 2) blanco, 3) C+ Soya, 4) M1, 5) M2, 6) M3, 7) M4, 8) M5, 9) M6, 10) M7, 11) M8, 12) C-

En la evaluación electroforética realizada para verificar la presencia de soya en las hamburguesas comerciales, se encontró que de las ocho muestras estudiadas que se encuentran en los carriles del 2 al 11, todas estas contiene soya en su composición, unas en mayor proporción que otras, en cuanto a la proporción presente en las muestras no puede decirse con exactitud la cantidad, sin embargo, la definición de las bandas nos dan una idea de esto al comparar las obtenidas para los productos comerciales con el control positivo (C+) que se muestra en el carril tres, ese control positivo es una muestra 100% soya, en el gel se puede observar que la banda correspondiente al control positivo tiene mayor intensidad con respecto a las demás ya que es solamente DNA de soya, las muestras comerciales muestran intensidades menores lo cual nos indica que la presencia de



soya en los productos comerciales no es del 100% y que se encuentra en estos productos en menos proporción.

La adición de soya texturizada a los productos cárnicos, como en las hamburguesas, se debe principalmente a que esta posee un contenido proteico muy similar al de la carne de origen animal y que su textura y consistencia es parecida al de la carne, además de que este producto tiene un valor económico mucho menor al de la carne animal, reduciendo así los costos en cuanto a materias primas para la elaboración del producto sin afectar las ganancias obtenidas de este al presentarlo al consumidor como un producto elaborado únicamente con carne de origen animal y negarle el conocimiento de la presencia de este componente.



Evaluación de presencia de especies animales (Vaca, Cerdo y Pollo) en hamburguesas comerciales

Debido a que las reacciones resultantes de la PCR multiplex para detectar la presencia de las especies de pollo y cerdo en las hamburguesas comerciales fueron 16, la evaluación electroforética se dividió en dos geles, en los cuales se puede apreciar la ausencia o presencia de dichas especies en los productos estudiados. Estos resultados de esta evaluación pueden ser apreciados en las figuras 17 y 18, que se muestran a continuación.

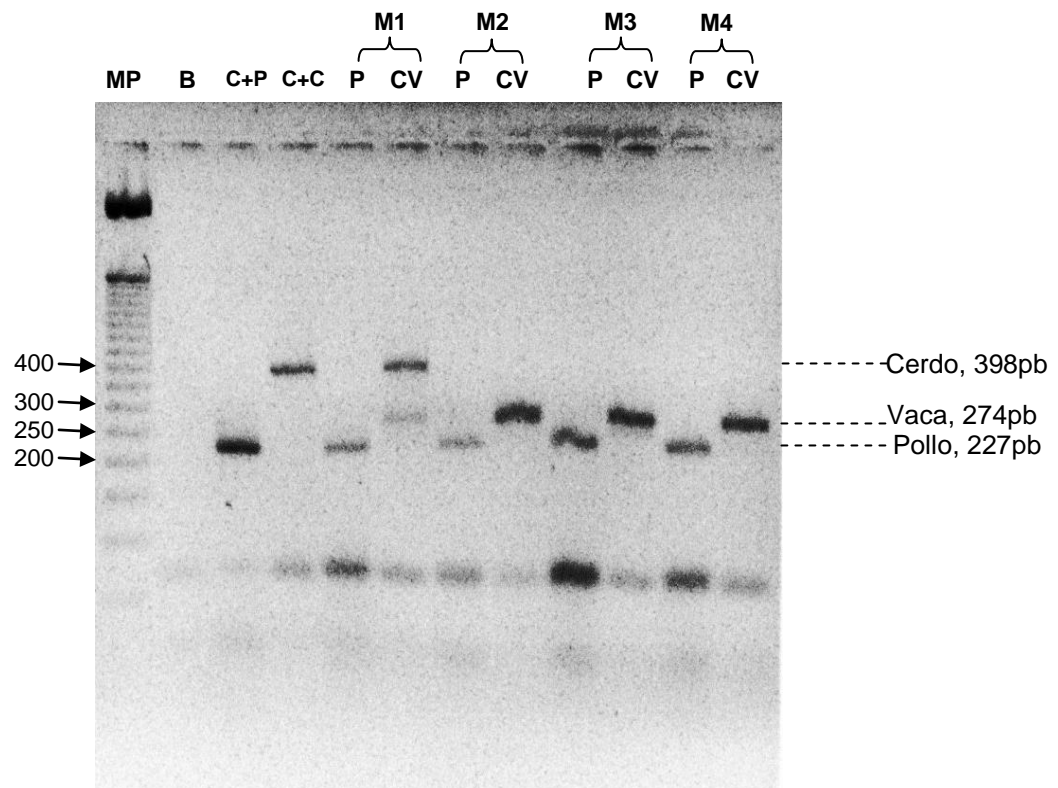


Figura 17: Evaluación electroforética de PCR multiplex en Hamburguesas. MP= marcador de peso molecular, B= Blanco, C+P= control positivo de Pollo, C+C= control positivo Cerdo, M1...4= Numero de muestra, P= evaluación para pollo, CV= evaluación para Cerdo y vaca.

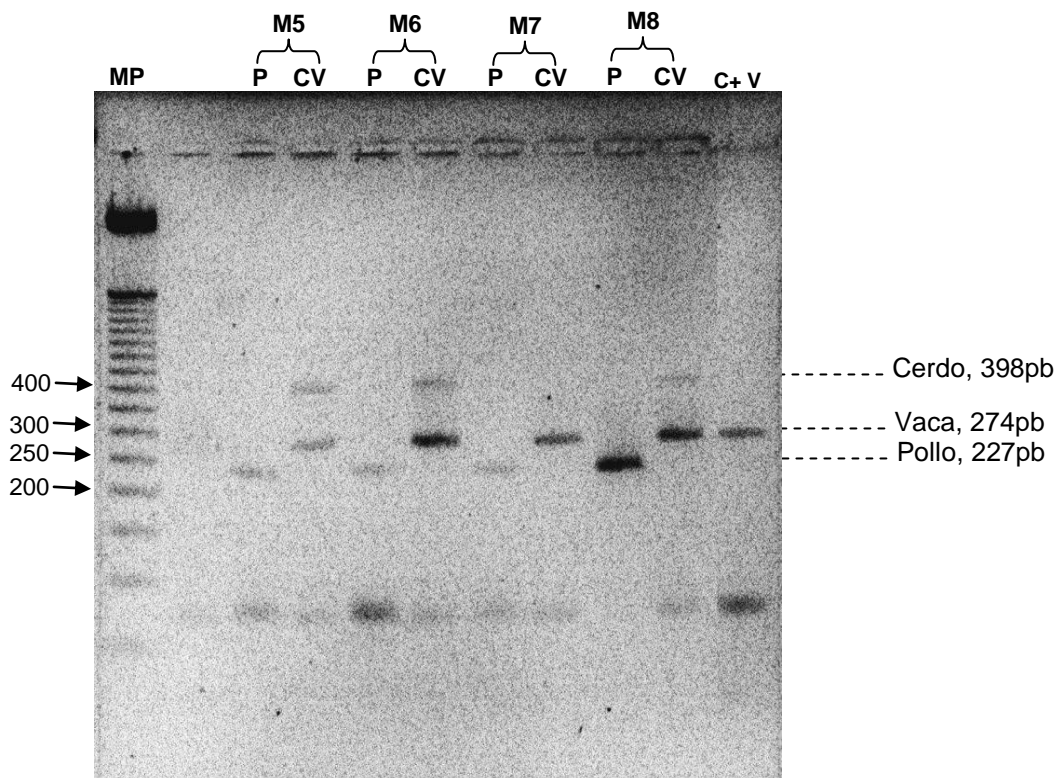


Figura 18: Continuación de evaluación electroforética de PCR multiplex en Hamburguesas. MP= marcador de peso molecular, M5...8= Numero de muestra, P= evaluación para pollo, CV= evaluación para Cerdo y vaca, C+V= control positivo de vaca.

En la figura 17 se observan las muestras 1, 2, 3, y 4 además de los controles positivos de cerdo y pollo, las muestras restantes de la 5 a la 8 y el control positivo de vaca, pueden ser observadas en la figura 18. Debido a que no fue posible lograr la amplificación de las tres especies en una sola reacción, estas fueron divididas, así pues, la evaluación para cerdo y vaca (CV) fue hecha en una sola reacción, mientras que la de pollo se hizo aparte (P), por lo que en los carriles correspondientes para cerdo y vaca, se pueden apreciar dos bandas, si se encuentran ambas especies, mientras que para pollo se observara únicamente una banda si se confirma la presencia de esta especie.



Se puede observar en ambos geles que todas las muestras confirman la presencia de la especie vacuna, sin embargo, en todas estas también se confirmó que contienen al menos una especie adicional ya sea pollo o cerdo, y en algunos casos ambas. Para las muestras 2, 3, 4 y 7 se pudo confirmar que estas hamburguesas contenían además de carne de vacuno, carne de pollo, mientras que para las muestras 1, 5, 6 y 8 se detectó la presencia de pollo y cerdo además de la de vaca.

Al igual que en el caso de la evaluación de soya, no es posible precisar la proporción del contenido en los productos de cada una de las especies en cuestión, sin embargo, con referencia en los controles positivos de las tres especies, es posible tener una idea, de la proporción de acuerdo a la intensidad de las bandas que se obtuvieron.

La adición de estas especies en la elaboración de hamburguesas, se debe principalmente a que esas especies, son de menor costo en comparación con la carne de vacuno, por lo que la sustitución de esta carne, por carne de pollo y cerdo, resulta monetariamente benéfica para los productores. Además de que al ser un producto a base de carne molida, esto permite que la sustitución de carne de vacuno, no se lleve a cabo precisamente con carne de las especies antes mencionadas, sino que permite que esto se haga con despojos y viseras procedentes de estas especies, lo cual decreta aun más su costo, siendo los más afectados con estas prácticas los consumidores.



CONCLUSIONES

La autenticación de alimentos puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas, sin embargo, las técnicas basadas en el análisis de DNA, han demostrado ser las más convenientes debido a su gran especificidad, muestra de ello es la técnica de PCR, la cual está basada en la amplificación de fragmentos de DNA. Para el caso de este trabajo la amplificación fue en DNA mitocondrial.

Para llevar a cabo el análisis de PCR a los productos propuestos para este proyecto, fue necesario la extracción y aislamiento de DNA de las especies de interés (soya, cerdo, vaca y pollo), lo cual se logró de manera satisfactoria utilizando la técnica descrita en el capítulo 3. Al aplicar la PCR con el DNA extraído de las muestras y encontrar amplificadas de las especies a estudiar, se demostró que no hubo degradación del DNA y la técnica de PCR se pudo llevar a cabo satisfactoriamente.

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos para el objetivo 3 los primers empleados demostraron una alta especificidad para las especies de interés, lo cual nos permite tener la seguridad que al ser empleados en muestras comerciales los resultados obtenidos serán altamente confiables. La especificidad de los primers empleados también fue confirmada mediante el uso del programa bioinformático Blast.

La metodología de autenticación para hamburguesas propuesta, resultó de gran utilidad para la identificación de adulteraciones tanto en productos térmicamente procesados como en aquellos que no lo estaban, probando así que la técnica de PCR, es altamente potente y que la molécula de DNA no es degradada de manera importante al someterla a estos tratamientos, permitiendo así su detección sin ningún problema.



La terminación de este trabajo de tesis, deja un planteamiento para llevar a cabo la autenticación de hamburguesas, lo cual constituye un estudio significativo para la calidad y/o aseguramiento de calidad de este producto, ya que actualmente el método señalado en la legislación vigente en nuestro país para este producto, resulta poco específico, trayendo como consecuencia que día con día los productos expuestos en el mercado sean adulterados. El protocolo propuesto puede ser utilizado como una herramienta poderosa de auditoría que proteja al consumidor.



BIBLIOGRAFÍA

1. Carvajal G., (2001). Valor nutricional de la carne de: Res, Cerdo y Pollo. Corporación de Fomento ganadero San jose- Costa Rica.
2. Chikuni, K., Tabata, M., Kosugiyama, M., Monma, M., Saito, M., (1994). Polymerase chain reaction assay for detection of shepp and goat meats. *Meat Science*, 37, 337-345.
3. Cota R.M., Vallejo C.B., (1997). Capillary electrophoresis for meat species differentiation. *Journal of capillary Electrophoresis*, 4, 195-199.
4. Desrosier N. W., (1987). Elementos de tecnología de alimentos. Continental, México, D.F.
5. Esain E. J., (1973). Tecnología Práctica de la carne. Acribia, Zaragoza, España.
6. Etienne J., (2001). Bioquímica genética, bioquímica molecular. Mansson S.A., Barcelona, España.
7. Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martín I., Rojas M., Hernández P.E., García T., Martín Rosario., (2006). Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 76, 234–240.
8. Fornias V. O., Diaz V. C., (1999) Clasificación de los productos cárnicos. *Revista cubana Aliment Nutr*, 13, 63-67
9. Forrest, C. John., y col., (1979). Fundamentos de ciencia de la carne. Acribia, Zaragoza, España.
10. García M. J. A., Erosa V. G. E., Prieto C., Núñez G. F. A., (2000). Identificación del origen de especie animal en carne fresca utilizando inmunodifusión doble, Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua.
11. Gil L. A., (2007), PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 558-566.



12. Haunshi S., Basumatary R., Girish P.S., Doley Sunil, Bardoloi R.K., Kumar Ashok., (2009). Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species specific markers of mitochondrial origin. *Meat Science*, 30, 1-6.
13. Hernández C. J.F., González C.A.F., Sánchez E.A., Torrescano G. R., Camou J.P., Córdoba V.B., (2007). Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados térmicamente. *Nacameh*, 1, 97-109.
14. Hsieh, Y.P., Sep, S., Bridgman, R.C., (1998). Development of monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. *Journal of Food Protection*. 61, 476- 481
15. Kanasawa A., Azumi T., Sumie K., Tetsuo M., Juan A., Yoshiya S., (1998). Small sequences that serve as recombination sites at the Cox2 and atp6 loci in the mitochondrial genome of soybean are widely distributed in higher plants. *Curr Genet*. 33, 188-198.
16. Lawrie R. A., (1998). Ciencia de la carne, 3ra ed., Acribia, Zaragoza, España.
17. Legarreta G. I. y col., (2002). Curso práctico de tecnología de carnes y pescados. UAM, México.
18. López, M., Mallorquín, P., Vega, M., (2003). Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria, informe de vigilancia tecnológica. *Genoma España. Sector agroalimentario*. 1-78.
19. Luque, J. Herraiz, A., (2001). Biología celular y e Ingeniería Genética. Harcourt, Madrid, España,
20. Mafra I., Roxo A., M.P.L.V.O Ferreira I., P.P. Oliveira M. B., (2007). A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1132–1138.
21. Mane B.G., Mendiratta S.K., Tiwari A.K., (2009). Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chemistry*, 116, 806–810.
22. Marquez M. G. O., Velazquez G. G. T., Revilla O. I.G., (2007). Aplicación de la espectroscopia Infrarroja y Análisis Multivariable para identificar



- adulteraciones en la carne molida de res, Departamento de Biofísica y Departamento de Ingeniería Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
23. Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K. Yamada J. Shinmura Y., (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143-148.
 24. Meyer. R., Candrian, U., Luthy, J., (1994). Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *Journal of AOAC international*, 77, 617- 622.
 25. Montiel S. Francisco, Ruiz P. E., Montoya J., Roncalés P., López P. M.J., Pérez M. A., (2000). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Agricultural food chemistry*, 48, 2829-2832.
 26. Nicolai Z. Ballin, Finn K. Vogensen, Anders H. Karlsson., (2009). Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration?. *Meat Science*, 83, 165–174.
 27. NORMA Oficial Mexicana NOM-051-SCFI-1994, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.
 28. NORMA Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
 29. Perera J. y Col., (2002). Vol.1, Ingeniería Genética, Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. Síntesis, Madrid, España.
 30. Pierce B. A., (2005). Genética un enfoque conceptual, 2da ed., Panamericana, Madrid, España.
 31. Potter N. N., y Col., (1999). Ciencia de los alimentos, 5ta ed., Acribia, Zaragoza, España.
 32. Rojas D. M., González A. I., Martín S. R., (2008). Autenticación de carne y productos cárnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz y pintada



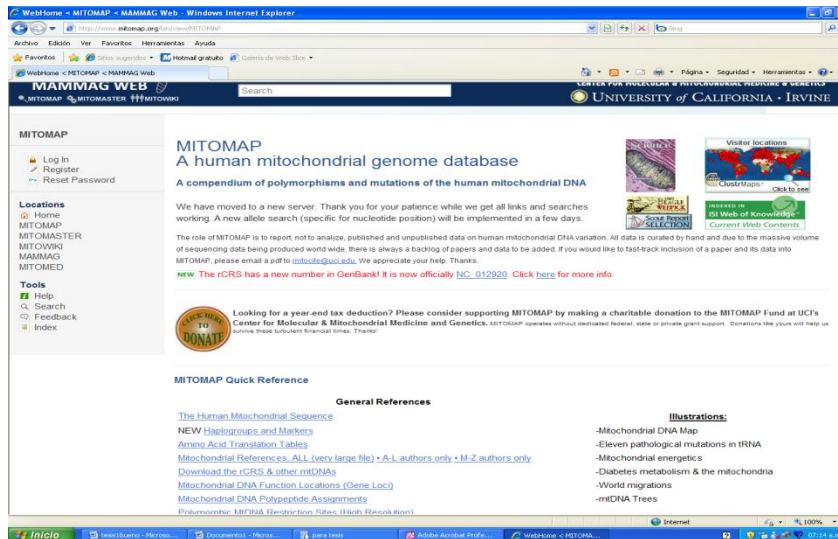
- mediante una técnica de pcr con cebadores especie-específicos. *RCCV*, 2,199-206.
33. Sagdr. (1995). Secretaria de Agricultura, ganadería y desarrollo rural. NOM-023-Z00-1995. Identificación de especie animal en musculo de bovinos, ovinos, equino, porcino y aves, por la prueba de inmunodifusión en gel.
 34. Sambrook, J., Russel, D., (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. E.U.A, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 35. Tamarin R. H., (1996). *Principios de genética*. Reverte, Barcelona, España.
 36. Torres Tejada Alfredo G. Baca Beatriz Eugenia., (1995), Reacción en cadena de la polimeraza. *Elementos*, 23, 16-21.
 37. Watson D. J., (2006). *Biología molecular del gen*. 5ta ed., Panamericana. Madrid, España.
 38. Winder, F., Beffa, R., (2000). *Diccionario de Bioquímica y Biología Molecular*. España, Acribia.
 39. Wolf, C., Luthy, J., (2001). Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Scienc*, 57, 161-168.
 40. Wolf, C., Rentsch, J., Hübner, P., (1999). PCR-RFLP Analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification, *Journal of agriculture and Food Chemistry*, 47, 1350-1335.
 41. www.biology.uprm.edu/labs/genetica/pcr, 22 de Noviembre 2009
 42. www.portalagroalimentario.com, 18 de Noviembre de 2009
 43. www.sectorcarnico.com, 10 de noviembre de 2009



ANEXO

Para corroborar que las secuencias de los primers utilizados eran correctas, se verificaron con ayuda del programa Blast para poder llevar a cabo esta actividad se realizó lo siguiente:

Ingresar a la base de datos de mitomap y seleccionar la opción Complete Mitochondrial DNA Sequences:



Seleccionar la especie de interes (ejemplo Bos Taurus,Vaca), haciendo clic sobre la clave.



Representative [Complete Mitochondrial Genomes](#) of different organisms at NCBI:

Blastocystis sp. DMP-02-328	NC_011212	27719 nt	27	18	45	Sep 12 2008	Sep 12 2008
Blastocystis sp. NandII	NC_011213	28382 nt	27	18	45	Sep 12 2008	Sep 12 2008
Blattella germanica	NC_012901	15025 nt	13	24	13	Jul 1 2009	Jul 8 2009
Blumenia graminis f. sp. hordei	pBgh NC_004935	7965 nt	2	0	0	Jul 7 2003	Jul 7 2003
Boa constrictor	NC_007398	18905 nt	13	24	13	Sep 9 2005	Jan 30 2008
Bolitoglossa n. sp. RLM-2004	NC_006346	21657 nt	13	24	13	Oct 1 2004	Jan 12 2005
Bombina bombina	NC_006402	17575 nt	13	24	13	Nov 9 2004	Nov 26 2008
Bombina maxima	NC_011049	18388 nt	13	24	13	Jul 14 2008	Jul 14 2008
Bombina orientalis	NC_006689	17847 nt	13	24	13	Jan 24 2005	Jun 15 2008
Bombina variegata	NC_009258	18551 nt	13	24	13	Mar 30 2007	Apr 3 2007
Bombus hypocynta sapporoensis	NC_011923	15468 nt	13	23	13	Jan 22 2009	Feb 6 2009
Bombus ignitus	NC_010967	16434 nt	13	24	13	Jun 13 2008	Jun 27 2008
Bombyx mandarina	NC_003395	15928 nt	13	24	13	Feb 8 2002	Nov 26 2008
Bombyx mori	NC_002355	15643 nt	13	24	13	Jun 13 2000	Jun 16 2008
Boreogadus saida	NC_010121	16745 nt	13	24	14	Dec 6 2007	Dec 12 2007
Bos grunniens	NC_006380	16323 nt	13	24	13	Oct 20 2004	Apr 15 2009
Bos indicus	NC_005971	16341 nt	13	24	13	Jul 12 2004	Apr 15 2009
Bos javanicus	NC_012706	16339 nt	13	24	13	May 21 2009	Jun 2 2009
Bos taurus	NC_006853	16338 nt	13	45	13	Feb 22 2005	Apr 15 2009
Bathiniotropa macracantha	NC_008930	14564 nt	13	27	13	Nov 19 2007	Nov 28 2007
Bothropolys sp. SP-2004	NC_009458	15139 nt	13	24	13	May 18 2007	Apr 15 2009
Brachaluteres ulvarum	NC_011940	16421 nt	13	24	13	Jan 22 2009	Feb 6 2009
Brachionus plicatilis	NC_010472	11155 nt	4	15	4	Mar 17 2008	Jun 4 2008
Brachionus plicatilis	NC_010484	12672 nt	8	9	8	Mar 19 2008	Jun 4 2008
Brachyodinium distachyon	NC_011032	133199 nt	81	46	133	Jul 10 2008	Dec 1 2009
Bradyopus tridactylus	NC_006923	16975 nt	13	24	13	Apr 4 2005	Apr 21 2005
Branchiostegus albus	NC_012905	16532 nt	13	24	13	Jul 1 2009	Jul 8 2009
Branchiostegus argentatus	NC_012907	16550 nt	13	24	13	Jul 1 2009	Jul 8 2009
Branchiostegus japonicus	NC_012904	16541 nt	13	24	13	Jul 1 2009	Jul 8 2009

Edit | Attach | Print version | History: r5 < r4 < r3 < r2 < r1 | Backlinks | Raw View | More topic actions

Seleccionar el No. De referencia para obtener el GI de la especie.

[Genome](#) > [Eukaryota](#) > [Bos taurus mitochondrion, complete genome](#)

Lineage: [Eukaryota](#); [Fungi/Metazoa group](#); [Metazoa](#); [Eumetazoa](#); [Bilateria](#); [Coelomata](#); [Deuterostomia](#); [Chordata](#); [Craniata](#); [Vertebrata](#); [Gnathostomata](#); [Teleostomi](#); [Tetrapoda](#); [Amniota](#); [Mammalia](#); [Theria](#); [Eutheria](#); [Laurasiatheria](#); [Cetartiodactyla](#); [Ruminantia](#); [Pecora](#); [Bovidae](#); [Bovinae](#); [Bos](#); [Bos taurus](#)

Chromosomes: [1](#), [2](#), [3](#), [4](#), [5](#), [6](#), [7](#), [8](#), [9](#), [10](#), [11](#), [12](#), [13](#), [14](#), [15](#), [16](#), [17](#), [18](#), [19](#), [20](#), [21](#), [22](#), [23](#), [24](#), [25](#), [26](#), [27](#), [28](#), [29](#), [X](#)
Organelles: [mitochondrial-MT](#)

Genome Info:	Features:	BLAST homologs:	Links:	Review Info:
Refseq: NC_006853	Genes: 13	COG	Genome Project	Publications: None
GenBank: AY526085	Protein coding: 13	TaxMap	Refseq FTP	Refseq Status: Reviewed
Length: 16,338 nt	Structural RNAs: 45	TaxPlot	GenBank FTP	Seq Status: Completed
GC Content: 39%	Pseudo genes: None	GenePlot	BLAST	Sequencing center: National Livestock Research Institute, Animal Genomics & Bioinformatics, Korea, Suwon
% Coding: 69%	Others: 7	gMap	TraceAssembly	Completed: 2005/02/22
Topology: circular	Contigs: None		CDD	Organism Group
Molecule: DNA			Other genomes for species: 142	

Una vez conocido el Gi de la especie dar clic sobre el lin del programa Blast



NCBI Reference Sequence: NC_006853.1

Bos taurus mitochondrion, complete genome

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS NC_006853 16338 bp DNA circular MAM 15-APR-2009

DEFINITION Bos taurus mitochondrion, complete genome.

ACCESSION NC_006853

VERSION NC_006853.1 GI:60101824 ← **GI de especie**

DBLINK Project:13366

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Bos taurus (cattle)

ORGANISM [Bos taurus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (sites)

AUTHORS Lowe, T.M. and Eddy, S.R.

TITLE tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence

JOURNAL Nucleic Acids Res. 25 (5), 955-964 (1997)

FUBMED 9023104

REMARK This is the methods paper for tRNAscan-SE.

REFERENCE 2 (bases 1 to 16338)

AUTHORS Chung, H.Y. and Ha, J.M.

TITLE Haplotype analysis of mitochondrial DNA in Korean native cattle

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 16338)

CONSTRM NCBI Genome Project

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-FEB-2005) National Center for Biotechnology Information. NIH. Bethesda. MD 20894. USA

Change Region Shown

Customize View

Analyze This Sequence

- Run BLAST ← **Acceso a Blast**
- Pick Primers

Recent activity

Turn Off Clear

- Bos taurus mitochondrion, complete genome
- NC_006853 Bos taurus mitochondrion, complete genome

See more...

All links from this record

- Full text in PMC
- Gene
- Genome Project
- Genome Project
- HomoloGene
- Identical GenBank

Introducir el GI de la especie y la secuencia del primer que se quiera localizar:

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI BLAST/blastn suite

blastn blastx blastz tblastn tblastx

BLASTn programs search nucleotide subjects using a nucleotide query. more...

Reset Layout Bookmarks

Enter Query Sequence

Enter accession number, gi, or FASTA sequence Clear Query subrange

From To

Or, upload file Examiner

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Enter Subject Sequence

Enter accession number, gi, or FASTA sequence Clear Subject subrange

From To

Or, upload file Examiner

Program Selection

Optimize for

- Highly similar sequences (megablast)
- More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
- Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

BLAST Search nucleotide sequence using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

show results in a new window

Algorithm parameters

GI de especie

Secuencia a localizar

una vez localizada la secuencia nos mostrara el porcentaje de identificación con la existente en la base del genoma mitocondrial de la especie y su localización en el genoma mitocondrial.

Primer reverso



▼ Alignments Select All [Get selected sequences](#) NEW

```

>lcl|23681
Length=29

Score = 54.7 bits (29), Expect = 1e-11
Identities = 29/29 (100%), Gaps = 0/29 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 14816 CTTATATTACGGGTCTTACACTTTCTAG 14844
            |||
Sbjct 29    CTTATATTACGGGTCTTACACTTTCTAG 1
  
```

Porcentaje de semejanza de Bos Taurus

Select All [Get selected sequences](#) NEW

Primer frontal (sim)

```

Score = 51.8 bits (56), Expect = 1e-10
Identities = 34/38 (90%), Gaps = 0/38 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 14571 GACCTTCCAGCCCATCAAACATTTTCATCATGATGAAA 14608
            |||
Sbjct 1     GACCTCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA 38
  
```

Para el caso de todas las especies los primer fueron comprobados y se obtuvo un porcentaje de semejanza aceptable al rededor de 100% con la base existente, por lo que su diseño y aplicación son confiables.

- Pollo

Primer reverso

```

Score = 54.0 bits (27), Expect = 2e-11
Identities = 27/27 (100%), Gaps = 0/27 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1     AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG 27
            |||
Sbjct 15179 AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG 15153
  
```

Primer frontal

```

Score = 51.8 bits (56), Expect = 1e-10
Identities = 34/38 (90%), Gaps = 0/38 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 14953 GACCTCCAGCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAA 14990
            |||
Sbjct 1     GACCTCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA 38
  
```



- Cerdo

Primer reverso

Score = 54.0 bits (27), Expect = 2e-11
Identities = 27/27 (100%), Gaps = 0/27 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA 27
            |||
Sbjct 14618  GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA 14592
```

Primer frontal

Score = 55.4 bits (60), Expect = 9e-12
Identities = 35/38 (93%), Gaps = 0/38 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 14221  GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAA 14258
            |||
Sbjct 1      GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA 38
```