



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“Aplicación de PCR para detectar y cuantificar
adulteraciones con leche de bovino en quesos de
cabra”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

GARCÍA BANDA KARLA MARIANA

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES 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:

Aplicación de PCR para detectar y cuantificar adulteraciones con leche de bovino
 en quesos de cabra.

Que presenta la pasante Karla Mariana García Banda

Con número de cuenta: 303733461 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 14 de abril de 2011

PRESIDENTE Dr. Francisco Montiel Sosa
 VOCAL Dra. Susana Patricia Miranda Castro
 SECRETARIO Dra. Tais Nopal Guerrero
 1er SUPLENTE I.A. Ma. Guadalupe López Franco
 2º SUPLENTE I.A. Miriam Alvarez Velasco

[Firma]
[Firma]
[Firma]
 Soledad Franco I.A. Cpe.
[Firma]



***“Ásete de la disciplina, no [la] sueltes.
Salvaguárdala, pues ella misma es tu vida”
Proverbios 4:13***



AGRADECIMIENTOS

Gracias a Jehová por permitirme estar viva y cuidarme en cada etapa de mi vida.

Con todo mi amor y respeto dedico este trabajo a mi familia quienes han sido y seguirán siendo mi mayor fuente de inspiración para cada día ser mejor.

A mi papá porque siempre, no importando las circunstancias ni la distancia me has proporcionado tu apoyo incondicional, siempre tratando de hacerme la vida más fácil y queriéndome hacer reír. Mil gracias papá te amo con todo mi corazón.

A mi mamá por esforzarte para que yo sea mejor, por enseñarme que no siempre tengo la razón, por perdonarme en todas las ocasiones que fui berrinchuda mami te amo con todo mi corazón

A mi hermano Juan gracias por ser mi compañero de vida estos 24 años, por preocuparte por mí, por comprenderme, apoyarme, por enseñarme a valorar el trabajo, por ser un gran ejemplo de fortaleza y por ser un gran hombre trabajador y responsable.

A mi pequeña hermana Lichi por permitirme ser parte de tu crecimiento, por ser mi compañera y amiga

A la familia García, a todos por ser una gran familia pero muy en especial a, Kika y a tía Licha porque me han dado el privilegio de conocerlas y porque en esta vida no he encontrado personas tan nobles y con ese gran corazón que las caracteriza.

A la familia Banda, a mis primos y tíos porque es muy ameno pasar tiempo con ustedes y por ese buen humor que los caracteriza Penélope, Cheño, Gordo y a mi tío Rafael por ser un amigo con gran experiencia y porque sé que en cualquier circunstancia puedo confiar en ti.

A mis grandes amigas Ale, Fer, Tania, que me han acompañado en los momentos más difíciles, gracias por siempre tener las palabras para hacerme sentir mejor.

A los amigos y compañeros de la Uni gracias Sandra, Chovis, Arturo, Chaparrita, Kitty por tantas risas, experiencias y sueños compartidos. A mi gran amigo Aldo por escucharme, comprenderme y nunca juzgarme, por enseñarme a sonreír en momentos realmente críticos eres una gran persona y un excelente amigo... y por sobre todas la cosas gracias a mi excelente AMIGA Ana porque tu ayuda es parte fundamental de este logro.

Gracias a todas y cada una de las personas que son y han sido parte de mi vida, gracias por compartir esta maravillosa experiencia, gracias por el placer de haberlos conocido, gracias porque todos ustedes han dejado una huella increíble en mi vida, gracias a todas las experiencias que hemos vivido...sin duda no sería la misma sin ustedes.





AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Al Dr. Francisco Montiel Sosa por la confianza, apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por las enseñanzas, tiempo, paciencia y asesoría técnica

A la Q.F.B. Angélica Saldaña por compartir su amplia experiencia y consejos técnicos.

A la I.A. Ana Elvia Sánchez Mendoza por el apoyo incondicional, el tiempo y los consejos aportados.

Al proyecto PAPIME-UNAM N°PE203211 “Innovación y fortalecimiento de la enseñanza teórico-práctica de la biotecnología para asignaturas terminales de las ciencias biológicas”

A la UNAM por ser la máxima casa de estudios e inculcar en cada uno de sus alumnos además de invaluable conocimientos técnicos un compromiso social para el impulso y mejora de nuestro país.

A los excelentes profesores de FES Cuautitlán, por ser un pilar importante para la superación y el progreso de nuestro país.





ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 01. IMPORTANCIA Y GENERALIDADES PRODUCTOS LÁCTEOS	4
1.1. Producción Anual.....	4
1.2. Similitudes y diferencias entre leche de vaca y leche de cabra.....	5
1.2.1. Definición de leche.....	5
1.2.2. Composición Química de la leche de vaca y cabra	5
1.2.2.1. Agua.....	6
1.2.2.2. Grasa.....	6
1.2.2.3. Sustancias nitrogenadas	6
1.2.2.4. Lactosa.....	8
1.2.2.5. Sales.....	8
1.2.2.6. Vitaminas.....	9
1.2.2.7. Ácidos Orgánicos.....	9
1.2.2.8. Enzimas.....	9
1.2.2.9. Propiedades Físico-Químicas de leche de vaca y cabra.....	9
1.3. Valor nutritivo y calidad en quesos	10
1.3.1. Definición de queso.....	10
1.3.2. Valor Nutritivo	11
1.3.3. Grupos más importantes de gérmenes presentes en la leche	12
1.4. Tecnología para la elaboración de queso Boursin (queso de cabra unttable).....	13
1.4.1. Descripción del diagrama de proceso	14
CAPÍTULO 2. GENERALIDADES ACERCA DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE ESPECIES	15
2.1. Métodos para la autenticación de especies en alimentos	15
2.1.1. Métodos de análisis basados en la detección de proteínas.....	18
2.1.2. Métodos de análisis basados en la detección de DNA.....	18
2.1.2.1. Características del DNA mitocondrial.....	18
2.1.2.2. Ventajas de la utilización de DNA para la autenticación de Especies	19
2.2. Importancia de la autenticación de alimentos por PCR	20
2.2.1. Principios de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	20
2.2.2. Componentes de la reacción	22
2.2.3. Etapas de la PCR	23
2.2.4. Limitaciones y eficiencia de la PCR.....	25
2.2.5. Visualización de los productos de PCR en gel de electroforesis	26





CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	29
3.1. Cuadro Metodológico.....	30
3.2. Descripción del cuadro metodológico.....	29
3.2.1. Objetivo General.....	29
3.2.2. Objetivo Particular 1.....	29
3.2.3. Objetivo Particular 2.....	31
3.2.4. Objetivo Particular 3.....	31
3.2.5. Objetivo Particular 4.....	31
3.2.6. Objetivo Particular 5.....	32
3.3. Materiales y Métodos	33
3.3.1. Material Biológico.....	33
3.3.2. Extracción de DNA	34
3.3.3. Cuantificación de DNA por medio de absorbancia	36
3.3.4. PCR directo	37
3.3.5. Electroforesis	40
3.3.6. Cuantificación de amplificados obtenidos.....	44
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	57
GLOSARIO	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO 1	66
ANEXO 2	69





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Muestra la producción nacional de leche en millones de litros del 2000 al 2010.....	4
Figura 1.2. Diagrama para la elaboración de queso Boursin	13
Figura 2.1. Esquema de ADN mitocondrial.....	19
Figura 2.2. Muestra los ciclos de la PCR.....	21
Figura 2.3 Muestra los enlaces que mantienen unida la molécula del DNA y que al ser sometidos a altas temperaturas se rompen permitiendo la desnaturalización de la doble hélice.....	23
Figura 2.4. Muestra las condiciones (tiempo-Temperatura) de las etapas de la PCR	24
Figura 2.5. Muestra la molécula de bromuro de etidio	27
Figura 2.6. Modelo teórico de unión del bromuro de etidio a la molécula de DNA	27
Figura 3.1. Cuadro Metodológico.....	30
Figura 3.2. Termociclador modelo ATC 401. Apollo instrumentation.....	40
Figura 3.3. Fuente de poder y cámara de electroforesis	42
Figura 3.4. Fotodocumentador	42
Figura 3.5. Muestra como el programa Gene tools mide la intensidad de la banda.....	44
Figura 3.6. Muestra la curva que el programa realiza con la ecuación de la recta correspondiente	45
Figura 4.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos amplificados por PCR directo a 35 ciclos de muestra de vaca y cabra. M-100 pb; carril 2, PCR directo con DNA de leche de vaca; carril 3, PCR directo con leche de vaca; carril 4, PCR directo con DNA extraído de leche de cabra, carril 5, PCR directo con leche de cabra	48
Figura 4.2. Electroforesis en gel doble de agarosa al 2.5 % de los productos amplificados por PCR directo a 35 ciclos de muestras de quesos comerciales. (Superior) MP-100 pb; B, blanco;	



C+control positivo de vaca; carril 1 a 7 corresponden a las muestras de productos comerciales de la Cuadro 3.2. (Inferior) M-100 pb; B, blanco; C+ control positivo de cabra; carril 1 a 7 corresponden a las muestras de quesos comerciales ilustrados en la Cuadro 3.1.50

Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos amplificados por PCR directo a 35 ciclos de muestras de quesos comerciales. MP-100 pb; B, blanco; C+ control positivo de vaca; carril 8 a 11 corresponden a las muestras de quesos comerciales ilustrados en la Cuadro 3.1.51

Figura 4.4 Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos amplificados por PCR directo a 35 ciclos de muestras de quesos comerciales MP-100 pb; B, blanco; C+ control positivo de cabra; carril 8 a 11 corresponden a las muestras de quesos comerciales de la Cuadro 3.1.....52

Figura 4.5. Muestra los resultados obtenidos del análisis de cuantificación del gel mostrado en la figura 3.11.....54

Figura 4.6. Muestra los resultados obtenidos del análisis de cuantificación del gel mostrado en la figura 3.1255



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Composición comparativa de las leches de vaca y cabra.....	5
Cuadro 1.2. Contenido proteínico de las diferentes leche de vaca y cabra.....	6
Cuadro 1.3. Valores de las fracciones de caseína en leche de vaca y cabra	7
Cuadro 1.4. Muestra una comparación entre las propiedades físico-químicas de leche de vaca y cabra.....	10
Cuadro 1.5. Muestra la composición química de diferentes tipos de quesos	11
Cuadro 1.6. Muestra los límites máximos permitidos de diferentes microorganismos para diferentes tipos de quesos	13
Cuadro 2.1. Muestra las ventajas y desventajas de las técnicas basadas en el análisis de proteínas.....	17
Cuadro 3.1. Generalidades de las muestras recolectadas.....	33
Cuadro 3.2. Oligonucleótidos utilizados como primers para la PCR	38
Cuadro 3.3. Cuadro 3.3. Componentes de la PCR	39
Cuadro 3.4. Muestra las condiciones a las que se llevó a cabo la PCR directa	40
Cuadro 4.1. Resultados obtenidos de la extracción de vaca y cabra.....	47
Cuadro 4.2. Muestra las especies encontradas en cada uno de los quesos analizados así como el porcentaje aproximado de cada una de ellas.....	55



Cuadro 3.5. Muestra las especies encontradas en cada uno de los quesos analizados así como el porcentaje aproximado de cada una de ellas.....51

Cuadro 4.1. Resultados obtenidos de la extracción de vaca y cabra.....47

Cuadro 4.2. Muestra las especies encontradas en cada uno de los quesos analizados así como el porcentaje aproximado de cada una de ellas55



RESUMEN

El presente trabajo ha sido realizado con la finalidad de detectar adulteraciones con leche de vaca en quesos que reporten en su etiquetado ser únicamente de leche de cabra; para lograr este objetivo se recurrió a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando primers específicos de la región 12S rRNA del DNA mitocondrial.

Así mismo se presenta una propuesta metodológica para la realización de la PCR, en la cual, a pesar de trabajar con DNA no es necesaria la extracción del mismo, lo cual representa ahorros económicos significativos así como disminución en tiempos de experimentación.

Aunque existen diversas técnicas basadas en la identificación de proteínas para detectar adulteraciones en alimentos, se decidió trabajar con DNA ya que es más termoestable que la mayoría de las proteínas, por lo que es menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos, y aun degradado parcialmente permite identificar diferencias; además, las técnicas con marcadores de DNA son más sensibles; y por último está presente en la mayoría de las células de un organismo, y en principio con la misma información independientemente del tejido.



INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los avances en ingeniería genética de cultivos y animales de granja, el descubrimiento de contaminantes en la cadena alimentaria y la aparición de nuevas enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos (Ej. “las vacas locas”), han provocado una mayor inquietud por parte de los consumidores. Garantizar la calidad del producto es actualmente un requisito para el consumidor, que exige autenticar el origen y calidad del alimento, para esto se ha implementado la trazabilidad alimentaria. La trazabilidad alimentaria se define como la capacidad de rastrear un alimento desde su origen hasta el consumidor, dando lugar a una identificación fiable de sus ingredientes, un control sanitario, y un seguimiento del alimento durante toda la cadena de producción. Todos aquellos compuestos que forman parte de un alimento serán en consecuencia susceptibles de ser sometidos a un proceso de trazabilidad mediante diversas técnicas (López M. *et al.*, 2003).

La identificación de especies de plantas o animales con fines alimentarios por medio de la observación de características exteriores tales como la forma, tamaño o apariencia, es una tarea difícil y poco fiable. Además, generalmente los alimentos se encuentran procesados o en pequeñas cantidades. Esta situación hace necesario recurrir al uso de análisis a nivel molecular: identificación de proteínas o DNA. La detección, identificación y cuantificación de compuestos de origen biológico, presentes en los alimentos, tales como el DNA y las proteínas, es en la actualidad posible mediante tecnologías relacionadas con la Genómica y Proteómica (López M. *et al.*, 2003).

La autenticación de especies en productos lácteos es un tema importante no sólo desde el punto de vista económico; sino también, por razones de salud pública, regulaciones gubernamentales e incluso por algunas prácticas religiosas (Locci F. *et al.*, 2008; Lopparelli R. *et al.*, 2007; Woolfe & Primrose, 2004; De la Fuente & Juárez, 2005).

Numerosos métodos basados en el análisis del DNA han sido empleados en la industria de alimentos para monitorizar adulteraciones en productos de origen animal. Entre estos métodos el utilizado con más frecuencia es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de un fragmento de gen marcador utilizando un primer universal o la



amplificación de DNA con primers específicos de la especie. Estos métodos han sido utilizados para identificación y diferenciación del origen animal de carne o productos cárnicos. (Chikuni K. *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994, 1995; Zehner *et al.*, 1998; Behrens *et al.*, 1999; Guoli *et al.*, 1999; Hopwood *et al.*, 1999; Matsunaga *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 1999). Dichas aproximaciones también son aplicables para el análisis de productos lácteos (Jacek B. *et al.*, 2001).

Las adulteraciones más frecuentes en productos lácteos son la sustitución de leches de alto valor por leche de vaca; la cual ha sido omitida en el etiquetado. Debido a esto, la detección de las especies con las que ha sido elaborado un queso es importante, especialmente en aquellos elaborados a partir de una especie pura y protegidos con designación de origen (PDO), tales como quesos de oveja o cabra (Mafra I *et al.*, 2007). La leche de cabra y sus derivados son alimentos que han recibido en los últimos años atención mundial. Su producción ha ido en aumento de manera considerable en las últimas dos décadas, contribuyendo a mejorar la economía de productores e industriales y a incrementar el aporte nutricional en los consumidores (Flores-Córdova *et al.*, 2009).

Debido a que en la actualidad se ha detectado la adición fraudulenta de leche de bovino en quesos de cabra y a que este fenómeno impacta de manera negativa a productores caprinos y consumidores el presente estudio tiene como principal objetivo utilizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la autenticidad de quesos que declaren en el etiquetado ser elaborados exclusivamente de cabra; para la realización de este objetivo se dan al lector las bases teóricas en los primeros dos capítulos, posteriormente se aborda a detalle la secuencia experimental seguida para llegar a los resultados y aportaciones finales del presente trabajo.



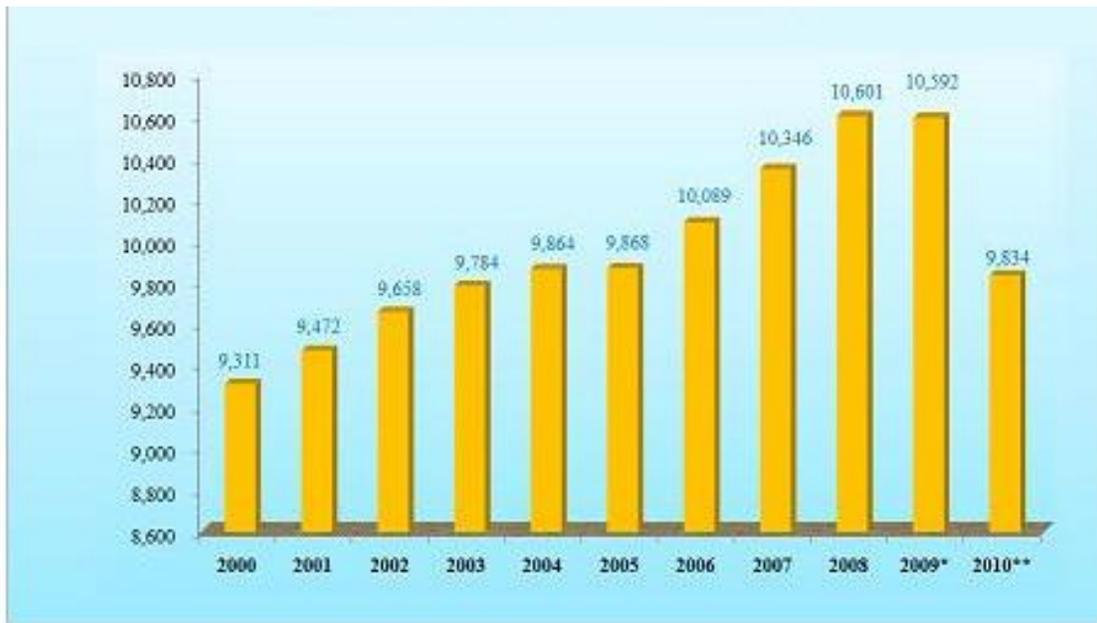
MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 1. IMPORTANCIA Y GENERALIDADES PRODUCTOS LÁCTEOS

1.1. Producción Anual

La producción de leche representa la quinta parte del valor total de la producción nacional pecuaria, siendo la tercera en importancia superando a la producción de cerdo y huevo, por lo que se deduce que esta es una actividad rentable, ya que de otra manera no se explica el importante crecimiento que se ha generado (Canilec., 2010).

Figura 1.1. Muestra la producción nacional de leche en millones de litros del 2000 al 2010¹



Fuente: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA., 2010

La leche de cabra y sus derivados son alimentos que han recibido en los últimos años atención mundial. Su producción ha ido en aumento de manera considerable en las últimas dos décadas, contribuyendo a mejorar la economía de productores e industriales y a incrementar el aporte nutrimental en los consumidores (Flores-Córdova *et al*, 2009).

¹Avances hasta Noviembre de 2010.



1.2. Similitudes y diferencias entre leche de vaca y leche de cabra

1.2.1. Definición de leche

Producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas, o de otras especies animales. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro (NOM-121-SSA-1994). La leche es un medio multifásico: una fase acuosa-acuosa continua que contiene esencialmente lactosa y minerales y elementos dispersos de naturaleza lipídica (glóbulos grasos) y de naturaleza protéica (micelas de caseínas) (Mahaut M. *et al.*, 2003).

1.2.2. Composición Química de la leche de vaca y cabra

Las diferentes composiciones químicas que tiene la leche de acuerdo a las circunstancias particulares de su obtención y procedencia, influye mucho sobre la calidad de los productos obtenidos a partir de ella. La influencia del estado de salud de los animales, la especie del mamífero, raza, edad, etapa de crianza, estación del año y la alimentación son otros tantos factores que no hay que subestimar, si se desean alcanzar buenos resultados. Por ser la leche una sustancia viva, su composición química también experimenta ciertos cambios en el curso de la lactación (Scholz W., 1995); en el Cuadro 1.1 se presenta la composición química general de la leche de vaca y cabra.

Cuadro 1.1. Composición comparativa de las leches de vaca y cabra

Nutrientes	Unidad	Vaca	Cabra
Agua	g	87,70	87,1
Glúcidos (lactosa)	g	4,70	4,60
Lípidos	g	3,60	4,30
Sust. Nitrogenadas	g	3,30	3,30
-Caseínas.	g	2,70	2,47
-Proteínas del suero.	g	0,42	0,56
-Nitrógeno no protéico.	g	0,18	0,27
Sales minerales	g	0,70	0,70
Na	mg	50	40
K	mg	150	180
Ca	mg	120	130
Mg	mg	12	20
P	mg	95	110
Fe	mg	0,40	0,40
Cu	mg	0,22	0,50
Zn	mg	4,19	3,50
Vitaminas	Trazas	Trazas	Trazas
Enzimas	Trazas	Trazas	Trazas
Gas disuelto	% Volúmen	5	-



Fuente: Chamorro y Losada, 2002.

1.2.2.1. Agua

Es el componente mayoritario de la leche, oscilando su valor entre el 83-89%. En la leche se halla en dos formas: libre y ligada (ésta no interviene en los procesos enzimáticos ni microbiológicos de los quesos). El agua libre es de gran importancia en la elaboración del queso porque muchos de los procesos físico-químicos y microbiológicos que tienen lugar, sobre todo en la fase de maduración, requieren su presencia y porque regulando su contenido en la cuajada se da al queso la consistencia adecuada (Chamorro y Losada, 2002).

1.2.2.2. Grasa

La grasa de la leche consta de ácidos grasos, glicerina, fofolípidos y otros componentes en menor proporción. El contenido graso de la leche depende mucho de la raza, alimentación y manejo de los animales, de la fase de lactación y del cuidado puesto en el ordeño. La última leche obtenida es precisamente la más rica en grasa (Warner J., 1995).

El tamaño medio de estos glóbulos grasos es de 5μ oscilando, normalmente entre 1 y 20μ (Scholz W., 1995).

1.2.2.3. Sustancias nitrogenadas

Estas forman la parte más compleja de la leche y comprenden dos tipos:

- 1.-Las proteínas (95% del nitrógeno total) (Chamorro y Losada, 2002).
- 2.- Las sustancias no proteicas (5% del nitrógeno total). Los valores medios del contenido en proteínas de las diferentes leches están reflejados en el Cuadro 1.2 siendo el más elevado el de cabra; esto la lleva a tener mayor rendimiento quesero con respecto a la de vaca (Chamorro y Losada, 2002).

Cuadro 1.2. Contenido proteínico de las diferentes leches

Especie	Vaca	Cabra
Proteínas	3,3	3,4

Fuente: Chamorro y Losada, 2002.



Las proteínas se encuentran en dos fases diferentes:

- a) Fase micelar inestable, formadas por partículas sólidas en suspensión (micelas de caseína) (Chamorro y Losada, 2002).
- b) Fase soluble estable, constituida por diversos polímeros protéicos hidrófilos (proteínas solubles o proteínas del suero). (Chamorro y Losada, 2002).

Las micelas de caseínas son complejos orgánicos formados por proteínas desnaturalizadas (caseínas: α , β , κ , γ), de diferentes tamaños, con carga eléctrica negativa, debido a la mayor presencia de aminoácidos ácidos y grupos hidrófilos lo que determina que se repelan entre sí (Chamorro y Losada, 2002). La cantidad presente de caseínas es variable en las diferentes especies tal como se muestra en el Cuadro 1.3.

Cuadro 1.3. Valores de las fracciones de caseína en leche de vaca y cabra

Fraciones de caseína.	Leche de vaca (%)	Leche de cabra (%)
α	50,88	12,6
β	33,0	75,3
κ	9,4	8,2
γ	6,8	3,9

Fuente: Chamorro y Losada, 2002.

Las diferentes caseínas (α , β , κ , γ) difieren en su contenido en fósforo y en su comportamiento frente al cuajo (enzima proteolítico) (Chamorro y Losada, 2002).

Las caseínas α , β y γ son sensibles al calcio; esto quiere decir que dichos componentes principales reaccionan en presencia de éste elemento, con el que forman compuestos que precipitan, provocando la coagulación de la leche (Scholz W., 1995).

Las caseínas de la leche pueden precipitar (pierden su estabilidad coloidal) por acidificación, hasta el pH isoelectrico (4,6), o por acción de enzimas proteolíticas (de origen animal o cuajo, de origen microbiano, vegetal, genético) (Chamorro y Losada, 2002).

Las proteínas solubles son exclusivamente de naturaleza orgánica, no llevan minerales en su molécula, y presentan una estructura secundaria (α -lactoalbúmina, proteasas-peptonas, inmunoglobulinas, albúmina sérica). Estas proteínas permanecen solubles en el lactosuero, por



su gran hidrofilia tanto si la leche se ha cuajado por acidificación o por vía enzimática, aunque pueden precipitar si previamente se las desnaturaliza por aplicación de calor a la leche.

Las proteínas de la leche tienen gran influencia en la textura de la pasta del queso, pues constituye su única fase sólida continua en la que se encuentran los sólidos glóbulos grasos y el lactosuero, así como en su sabor y aroma, gracias a la proteólisis que pueden sufrir, en los quesos madurados (Chamorro y Losada, 2002).

1.2.2.4. Lactosa

La lactosa o azúcar de la leche es el nutriente necesario para las bacterias acidolácticas que participan en la transformación de la leche. En la fabricación de todos los productos lácteos (con la excepción de la leche para beber, nata batida, leche con cacao o vainilla, y también de productos frescos) participan las bacterias acidolácticas, que ejercen una influencia positiva sobre la calidad y capacidad de conservación de los productos obtenidos. Estos microorganismos al multiplicarse desdoblan la lactosa en ácido láctico. Este hecho desempeña un papel esencial en la coagulación de la leche que tiene lugar en la elaboración de productos de leche fermentada; también es responsable del sabor y consistencia en la fabricación del queso (Scholz W., 1995).

1.2.2.5. Sales

Para la fabricación de queso resulta de particular importancia el contenido en calcio, que es necesario para la coagulación de la leche con el cuajo. Por depender mucho del contenido de sales minerales de la leche del racionamiento y naturaleza de los piensos, cuando los animales reciben insuficiente cantidad de calcio pueden presentarse problemas en la coagulación con cuajo. Esto puede compensarse agregando cloruro de calcio en la fabricación del queso (Scholz W., 1995).

1.2.2.6. Vitaminas

La leche contiene todas las vitaminas importantes para la vida, como la A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, C, D y E, cuyas tasas respectivas dependen en gran manera de factores diversos, como alimentación, sobrecargas térmicas, etc. Así, las vitaminas termolábiles, como la vitamina C, se encuentra en la leche acidificada o en el yogur



en menos cantidad que en los quesos de leche cruda, como consecuencia del procesos tecnológico seguido en la elaboración de estos productos (Scholz W., 1995).

1.2.2.7. Ácidos Orgánicos

El ácido cítrico es un componente característico de la leche, sintetizado por las células mamarias a partir de la glucosa o sus derivados y forma quelatos con el calcio, lo que permite que la leche tenga mucho calcio disuelto en forma de citrato cálcico. Además de intervenir en el estado de equilibrio del calcio, es utilizado por ciertos microorganismos, siendo por ello un precursor del olor (diacetilo) de algunos quesos (Chamorro y Losada, 2002).

1.2.2.8. Enzimas

Son sustancias orgánicas de naturaleza protéica que actúan como catalizadores en las reacciones bioquímicas. La mayoría son componentes o productos de las células mamarias que, durante los procesos secretores, llegan a la leche. Su concentración varía mucho con la especie y, dentro de la misma con el momento del período de lactación. Aunque presentes en pequeñas cantidades, pueden influir de forma importante en la estabilidad de los productos lácteos. Debido a las enzimas, la leche posee propiedades de un sistema reversible de óxido-reducción (Chamorro y Losada, 2002).

1.2.2.9. Propiedades Físico-Químicas de la leche de vaca y cabra

Las propiedades físico-químicas de la leche son consecuencia de su composición y estructura. Como existen variaciones en cuanto a la composición química entre las leches de vaca y cabra, también en sus propiedades físico-químicas se observan diferencias (Chamorro y Losada, 2002).

Las propiedades nutricionales y tecnológicas (estabilidad térmica, aptitud para la transformación quesera y mantequera) dependen, en gran parte, de las características fisicoquímicas de cada una de las fases (Mahaut M. *et al.*, 2003). En la Cuadro 1.4 se muestra un comparativo entre las propiedades fisicoquímicas de la leche de vaca y cabra.



Cuadro 1.4. Muestra una comparación entre las propiedades físico-químicas de leche de vaca y cabra

Propiedad	Leche de vaca	Leche de cabra
Densidad a 20°C (g/mL)	1,0270- 1,0320	1,0260 – 1,0420
Viscosidad (mPa.s)	1,236	1,186
Tensión Superficial (N/m)	50	52
Índice de Refracción (N_0^{20})	1,3440-1,3485	1,3454 -1,4548
Temperatura de Congelación (°C)	-0,55	-0,570
Acidez (% de ácido láctico)	0,15-0,18	0,16 -0,18
p H	6,50-6,70	6,50 – 6,80

Fuente: Chamorro y Losada, 2002.

1.3. Valor nutritivo y calidad en quesos

1.3.1. Definición de queso

Producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado (NOM-121-SSA-1994).A continuación se muestra en el Cuadro 1.5 la composición química general de diferentes tipos de quesos



Cuadro 1.5. Muestra la composición química de diferentes tipos de quesos

Alimento (composición por cada 100 gramos o centímetros cúbicos)	Calorías	CHOS	Prot.	Grasas Totales	Ácidos grasos saturados	Ácidos grasos polinsaturados Omega3,6 y 9	Colesterol	Sodio	Potasio	Calcio	Hierro	Fósforo	VitA	VitB 2
Queso blanco	142	3.7	11.8	8.8	---	---	---	70	---	163	---	137	500	0.1
Queso Cottage	98	2.5	13	4	2.2	0.1	15	265	92	110	0.4	135	163	0.3
Queso Crema	255	2.6	5	25	14	0.8	90	65	---	150	0.2	135	142 7	0.2
Queso Cuartirolo	273	1	19.4	21.3	11.9	0.6	90	470	165	460	0.4	430	159	0.9
Queso Desc. Promedio	125.8	3.8	12.2	6.7	---	---	15	70	95	150	0.4	137	451	0.2
Queso mar del plata	400	0	29.5	31.3	20.2	1	104	501	90	1040	0.2	608	845	0.4
Queso P. blanda promedio	304	0	22	24	13.4	0.7	11	400	165	460	0.4	136	467	0.2
Queso P. dura promedio	304	0	22	24	13.4	0	100	900	120	950	0.4	761	640	0.3
Queso de p. semidura promedio	304	0	22	24	13.4	0	100	500	100	750	1	552	100 0	0.3
Queso petit Suisse	152	4	7	12	5.7	0.4	40	70	84	60	0.1	135	434 .7	0.2
Queso port Salut	352	0.6	23.8	28.2	16.7	0.7	123	634	61	650	0	430	133 3	0.2
Queso Regganito	355	1	32.3	32.3	15.9	4.9	64.1	117 0	138	756	0.5	830	603	0.3

Fuente: <http://www.nutrimedperu.com/composicion.htm>

1.3.2. Valor Nutritivo

Desde el punto de vista tecnológico, la composición de la leche determina su calidad nutritiva, sus propiedades y su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios. La leche de cabra posee los mejores valores nutricionales y terapéuticos; sólo la supera la leche materna humana con alta calidad nutricional y de sabor agradable (Flores-Córdova *et al*, 2009).

Con el consumo de leche de cabra, el organismo aumenta la absorción y la utilización del hierro y del cobre, gracias a los altos contenidos de triglicéridos de cadena media y a los aminoácidos cistina y lisina. Los altos niveles de hierro en esta leche, son de mayor viabilidad en las anemias que cuando el consumo es de leche de vaca. Los niños que se alimentan con leche de cabra alcanzan mayor peso, mayor estatura, más mineralización de los huesos, y en plasma sanguíneo, mayor densidad de las vitaminas A, tiamina, riboflavina y niacina, así como del calcio y la hemoglobina (Solis R. y Castro A., 2007).



1.3.3. Grupos más importantes de gérmenes presentes en la leche

Coliformes. Son bacterias fecales y de suciedad, aunque también están presentes en el agua. Se encuentran prácticamente en todas partes, por lo que se utilizan como “gérmenes indicadores”, es decir, microorganismos cuya presencia en gran número delata la práctica de un trabajo en malas condiciones higiénicas. Al multiplicarse generan gas, por lo que provocan la aparición de muchos “ojos” pequeños en el queso, que lo hacen esponjoso.

Escherichia coli. (*E.coli*) Es un germen fecal que, por tanto, sólo está presente en el intestino del hombre o animales y también en aguas contaminadas con heces fecales. Por ello, en caso de duda debe analizarse el agua. La presencia de *E.coli* denotará, por consiguiente, que existen graves deficiencias higiénicas.

Estafilococos. Proceden de supuraciones, pero también se encuentran en las mucosas del espacio nasofaríngeo. Las personas sanas tienen estafilococos en el espacio nasofaríngeo, por lo que se debe evitar toser o estornudar cuando se está trabajando con alimentos. Por añadidura, una especie en particular (*Staphylococcus aureus*) es responsable de enfermedades de la ubre (mastitis). Cuando se encuentra en producto en grandes cantidades, provoca vómitos y diarrea .

Pseudomonas. Están presentes en gran número en los recipientes de lechería insuficientemente limpios. Las pseudomonas son gérmenes psicrófilos. Desdoblan grasas y proteínas, por lo que provocan en los productos lácteos almacenados largo tiempo alteraciones del olor y sabor .

Levaduras. Suelen llegar al producto en el curso de la elaboración, procedentes de productos poco limpios. Los signos de esta contaminación son olor ligeramente agrio y la presencia de manchas rojizas, amarillas o también de color castaño, que pueden llegar a hacer húmeda y viscosa la superficie del queso.

Mohos. Llegan a la leche procedentes sobre todo del aire, para después pasar a los productos. Aquí hay que vigilar especialmente la higiene de los locales. Algunos mohos producen toxinas, capaces de penetrar hasta 10cm de profundidad en el producto. El lavado o frotado de los mohos mejora el aspecto, pero el producto sigue considerándose alterado (Scholz W., 1995).



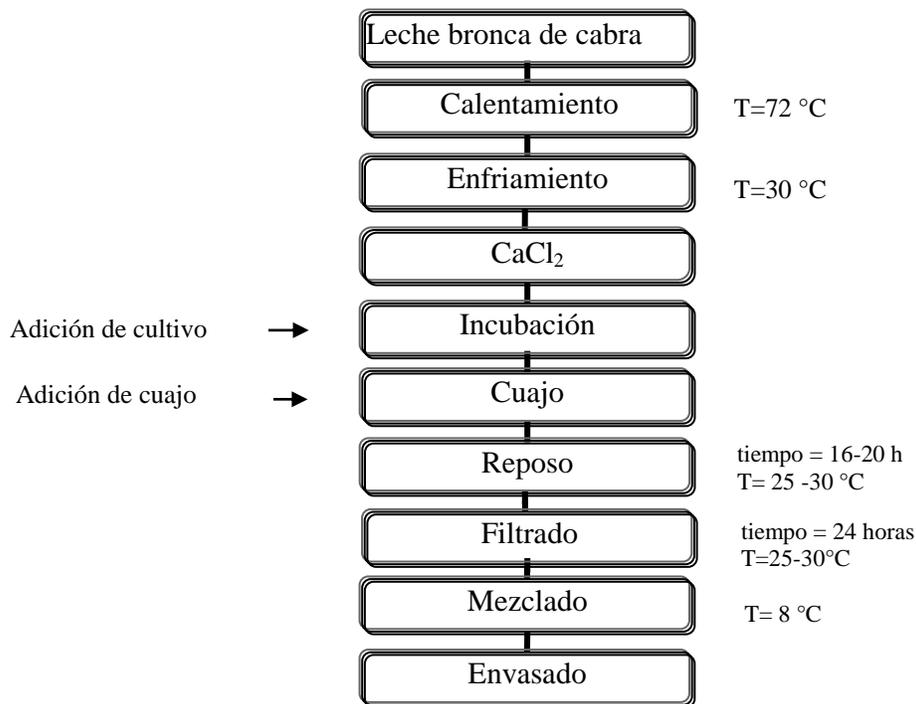
Cuadro 1.6. Muestra los límites máximos permitidos de diferentes microorganismos para diferentes tipos de quesos

Microorganismos	Frescos	Madurados	Procesados
Coliformes fecales(NMP/g)	100	50	-
Staphylococcus aureus (UFC/g)	1000	100	Menos de 100
Hongos y levaduras (UFC/g)	500	500 ⁺	100 ⁺⁺
Salmonella en 25g	Ausente	Ausente	Ausente

Fuente: NOM-121-SSA-1994

1.4. Tecnología para la elaboración de queso Boursin (queso de cabra unttable)

Figura 1.2. Diagrama para la elaboración de queso Boursin



(Dobler J. et al., 2005).



1.4.1. Descripción del diagrama de proceso

- a) **Leche.** Debe disponerse de leche con localidad establecida y tipo (vaca, cabra, oveja). Se aplicará un tratamiento térmico establecido para destruir los patógenos indeseables.
- b) **Aditivos.** Algunos protocolos recomiendan la adición de cloruro cálcico, hidróxido cálcico, fosfatos, nitrato/nitrito sódico o potásico, o bien agentes decolorantes, pudiendo ser críticas las dosis de uso de tales sustancias químicas.
- c) **Coagulantes.** Se dispone de una diversidad de cuajos de fuentes animales y microbianas, teniendo cada uno de los tipos, su dosis específica de uso y valores óptimos precisos, respecto a la temperatura y la acidez, para la máxima actividad de las enzimas constituyentes, así como una estabilidad característica en la cuajada o suero.
- d) **Desuerado.** Una de las partes más importantes del proceso es la eliminación del suero, porque separando la cuajada del suero, se produce la coalescencia de las partículas de cuajada para formar el queso. En determinados casos, esta compactación natural-con o sin presionar o comprimir-es suficiente para formar el queso. Una parte importante en esta etapa, es que la mayor parte de la lactosa se pierde con el suero, lo que limita los sustratos la actividad microbiana, después de la producción.
- e) **Salazón.** La aplicación de sal es importante por diversos factores: (a) inhibe el crecimiento de microorganismos lácticos y por tanto lentifica la velocidad de formación de ácido;(b) contribuye a la sinéresis del suero durante el moldeado y/o prensado; (c) imparte flavor esencial para el producto final.

(Scott R., 2002).

El queso natural o puede ser de hierbas finas, ajonjolí, nuez, almendra., etc. Estos ingredientes son opcionales y solo se incorporan al queso con movimientos envolventes después de la salazón (Dobler J. *et al.*, 2005).



CAPÍTULO 2. GENERALIDADES ACERCA DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE ESPECIES

2.1. Métodos para la autentificación de especies en alimentos

La autentificación consiste en la identificación de los componentes de un producto y la confirmación de su procedencia (López M. *et al.*, 2003).

Diversas técnicas electroforéticas y cromatográficas tales como ELISA, western blot, electroforesis capilar, HPLC han sido utilizadas para la identificación de especies específicas en productos lácteos (Hurley I. *et al.*, 2004; Lopez-Calleja I. *et al.*, 2007). Estas técnicas, enfocadas al análisis de proteínas o ácidos grasos son efectivas pero tienen algunas limitantes. Los métodos electroforéticos e inmunológicos al basarse en el análisis de proteínas disminuyen su sensibilidad con productos lácteos tratados térmicamente además de no ser tan efectivos ya que dichos productos presentan matrices complejas. Las técnicas cromatográficas presentan una alta sensibilidad para diferenciar el perfil de ácidos grasos de especies específicas de leche pero se requiere de grandes inversiones de tiempo y trabajo (Sachinandan D. *et al.*, 2001).

2.1.1. Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

La detección de proteínas puede realizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas de la muestra. Por este motivo, las técnicas moleculares que suponen el manejo de proteínas son aplicadas en aquellos casos en los cuales se dispone de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente y con calidad adecuada (López M. *et al.*, 2003).

Las técnicas basadas en el análisis de proteínas actualmente utilizadas son las siguientes:

- Elisa
- Electroforesis
- Cromatografía Líquida



- Isoelectroenfoque
- Western Blot

Los métodos de identificación de proteínas (técnicas electroforéticas, cromatografía líquida, inmunoensayos), algunos de ellos incluso de reciente desarrollo, están siendo reemplazados por técnicas basadas en el análisis de DNA, principalmente debido a la degradación que sufren las proteínas tras la muerte del animal, a que frecuentemente la expresión de la proteína es dependiente del tejido y a que muchas de ellas pueden desnaturalizarse durante el procesamiento. Los análisis basados en DNA parecen ser los más adecuados para la identificación de especies, así lo muestran tanto los trabajos publicados como las recientes patentes. En el caso de la detección de organismos transgénicos, esta se lleva a cabo mediante el análisis de proteínas o de marcadores de DNA dependiendo del coste del ensayo, sensibilidad requerida, y tipo de identificación (Lockley A. & Bardsley R., 2000; López M. *et al.*, 2003).

A continuación en el cuadro 2.1 se exponen las ventajas e inconvenientes de la utilización de métodos basados en el análisis de proteínas para la detección de especies específicas.



Cuadro 2.1. Muestra las ventajas y desventajas de las técnicas basadas en el análisis de proteínas

Ventajas	Desventajas
<p>✓ Entre sus principales ventajas cabe destacar la asequibilidad de la tecnología, y la alta sensibilidad que se consigue, con límites de detección que varían entre 0,25% para semillas y el 1% para alimentos cocinados</p>	<p>× Cuando las proteínas se desnaturalizan durante el procesamiento de un alimento, sucede que los anticuerpos diseñados para reconocer las diferentes especies no reconocen sus antígenos específicos, llegando a dar resultados erróneos. Paralelamente pueden ocurrir reacciones cruzadas entre especies estrechamente relacionadas y originar errores tales como falsos positivos.</p>
	<p>× Otra de las principales desventajas de los inmunoensayos como técnicas de análisis de alimentos es que su precisión puede verse alterada en el caso de alimentos procesados, ya que están formados por matrices complejas de proteínas y otros compuestos. Algunas sustancias presentes en estas matrices tales como surfactantes, compuestos fenólicos, ácidos grasos, fosfatasas endógenas y otras enzimas, son capaces de inhibir las interacciones específicas entre el antígeno y el anticuerpo.</p>
	<p>× 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 conformación de las proteínas y otros componentes</p>

Fuente: (Hernández-Chávez *et al.*, 2007; Lockley A. & Bardsley R., 2000; López M. *et al.*, 2003).



2.1.2. Métodos de análisis basados en la detección de DNA

Los métodos analíticos basados en la detección de DNA suelen emplearse cuando el alimento ha sido procesado o bien tratado fisicoquímicamente (calor, presión, etc.), ya que la proteína puede haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios. El DNA, en cambio, puede haberse fragmentado durante el procesado en trozos pequeños pero ello no implica necesariamente que no puedan ser detectados. Aunque el DNA también se degrada durante la esterilización por calor en el proceso de enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencias como para hacer posible la diferenciación entre especies cercanas. El DNA utilizado en la identificación de especies es generalmente DNA mitocondrial, aunque también se utilizan secuencias de DNA procedentes de genes de la familia de la actina. Ambos tipos de secuencias cumplen con las características necesarias para ser utilizados como indicativos de especie, al estar presentes en todas las especies y presentar una gran variabilidad entre las mismas (López M. *et al.*, 2003).

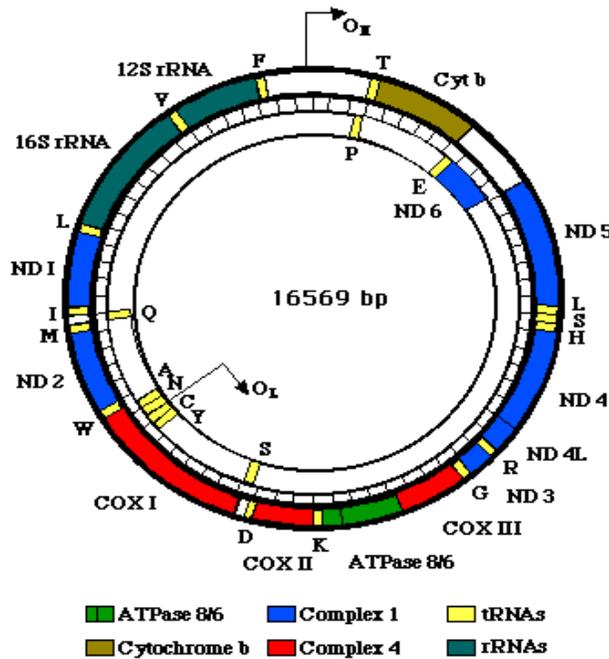
2.1.2.1. Características del DNA mitocondrial

El DNA mitocondrial de los animales comprende 13 genes que codifican proteínas, 2 genes que codifican RNAs ribosómicos (RNAr 12S Y RNA 16S), 22 genes que codifican RNAs de transferencia (RNA_t) y una región no codificante, denominada región control en los vertebrados, que contiene los ciclos de iniciación para la replicación y la transcripción.

Los genes mitocondriales codifican distintas subunidades de enzimas que intervienen en la cadena transportadora de electrones; siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6), el citocromo b, tres subunidades de la citocromo c oxidasa (CO I, II Y III) y una o dos unidades de sintetasa (ATP asa 6 y en ocasiones también la 8).



Figura 2.1. Esquema de DNA mitocondrial



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

2.1.2.2. Ventajas de la utilización de DNA para la autenticación de especies

La utilización del DNA mitocondrial para la identificación de especies por PCR ofrece una serie de ventajas. La primera, el mtDNA está presente en miles de copias por célula, además de ser más termoestable que la mayoría de las proteínas, por lo que es menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos y aún degradado parcialmente permite identificar diferencias. La segunda, se tiene un vasto conocimiento del MtDNA de varias especies animales, lo cual facilita el diseño de primers específicos para la amplificación. Tercera, Posee una alta tasa de mutación que resulta en un cúmulo de mutaciones puntuales que permiten la diferenciación de especies cercanas. Finalmente tiene un



tamaño pequeño y es más abundante en las preparaciones de DNA total en comparación con el DNA nuclear además de poseer tan solo un alelo y las consiguientes ambigüedades debidas a los genotipos heterocigóticos pueden ser evitadas (Montiel *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 1999).

2.2. Importancia de la autenticación de alimentos por PCR

Las principales técnicas utilizadas para la detección de dianas moleculares están basadas en la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) y la utilización de Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP).

2.2.1. Principios de la PCR

La PCR fue descubierta por Kary Mullis en 1985 y es un procedimiento extremadamente poderoso que permite la amplificación de DNA. (Micklos, *et.al*, 2003; Sambamurty, A. 2008). El método de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR sirve para aumentar la cantidad de DNA que se pretende detectar; por lo cual, la disposición de una cantidad suficiente de DNA es imprescindible para la obtención de resultados fiables, en el mismo sentido es importante resaltar que esta técnica puede ser aplicada solamente cuando la secuencia o al menos una pequeña secuencia de DNA es conocida (Sambamurty, A. 2008). Sobre la base de esta información se diseñan dos oligonucleótidos cebadores (*primers*) de alrededor de 15 a 25 pares de bases de longitud. Los cebadores son complementarios de la secuencia por fuera de los extremos 3' del sitio blanco y se unen a ellas en forma específica (Passarge E., 2004).

La PCR estándar es un procedimiento *in vitro* para amplificar secuencias definidas de DNA blanco aun partiendo de muy pocas cantidades de material, material antiguo o de pobre calidad (Walker J. *et al.*, 2006; Passarge E., 2004); es un método que permite clonar fragmentos de DNA sin utilizar células, es rápido y sensible. Se han desarrollado reacciones estándares y una amplia variedad de métodos basados en la PCR.

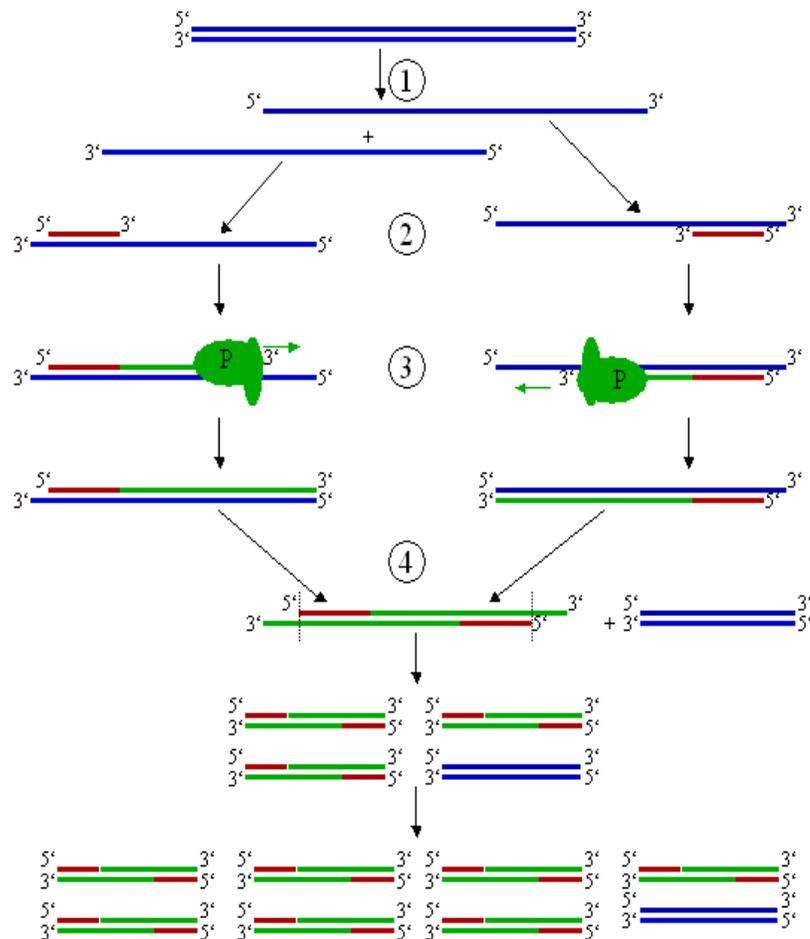
La PCR es una reacción en cadena porque las cadenas de DNA nuevas sintetizadas actúan como molde para la posterior síntesis de DNA en los ciclos subsecuentes. En teoría, cada ciclo dobla la cantidad de DNA amplificado, obteniéndose 2^n moléculas después de n ciclos. Al final, hay al menos 10^5 copias de la secuencia blanco (por ejemplo, 1.048.5756



moléculas después de 20 ciclos) (Tagu D. *et al.*, 2003; Passarge E., 2004). Ésta se puede visualizar como una banda distintiva de un tamaño específico luego de una electroforesis en gel (Passarge E., 2004).

La figura 2.2 muestra una representación esquemática de la PCR. Los oligonucleótidos específicos son sintetizados químicamente, de modo que estos cebadores son complementarios a las secuencias de DNA que flanquean la secuencia de interés. Los cebadores son mezclados con una solución tamponada que contiene el DNA molde, los dNTPs, magnesio y una enzima polimerasa termoestable (Walker J. *et al.*, 2006).

Figura 2.2. Muestra los ciclos de la PCR. (1)Desnaturalización 94-96°C. (2)Hibridación 68°C. (3) Elongación a 72°C (P=Polimerización). (4) Primer ciclo completado.





2.2.2. Componentes de la reacción

1) **Par de primers o oligonucleótidos.** El tipo de primer o cebador que se utilice en la PCR dependerá del tipo de identificación que se requiera. De esta forma, se utilizarán cebadores específicos, es decir, diseñados a partir de una secuencia de DNA conocida previamente y complementarios de la misma, fundamentalmente en la detección de OMGs (organismos modificados genéticamente) e identificación de especies. Los cebadores semiespecíficos son aquellos complementarios de elementos repetitivos de DNA, y tienen su principal aplicación en la detección de especies. Para esta última se emplean así mismo cebadores arbitrarios, que no requieren conocimiento previo de su secuencia de DNA. La elección de los cebadores y del tamaño del fragmento amplificado es de gran importancia para el resultado final. El tamaño del fragmento amplificado debe estar en el rango de 80 a 150 pares de bases de DNA procedente de alimentos procesados, y de 250 pares de bases en el caso de alimentos frescos (López M. *et al.*, 2003).

2) **dNTP's en exceso** Son nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, es decir, son el sustrato de la enzima DNA polimerasa y serán los componentes de miles de copias del fragmento diana al final de la reacción. Pueden denominarse como dATP's dTTP's, cGTP's y dCTP's (Sambrook J. & Russell D., 2001).

3) **DNA polimerasa.** Esta enzima se encarga de unir los dNTP's a la cadena complementaria a partir del cebador, formando una cadena doble de DNA a partir de una cadena sencilla (Sambrook J. & Russell D., 2001).

4) **DNA a amplificar.** La adición de DNA a la reacción implica su previa extracción de la célula o del tejido y la solubilización en agua. Es requerida una concentración adecuada para lograr una amplificación óptima ; si la concentración de DNA es menor , es probable que no se visualice una banda clara en un gel de agarosa, por otro lado, si la concentración es muy alta, la DNA polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de DNA (Sambrook J. & Russell D., 2001)

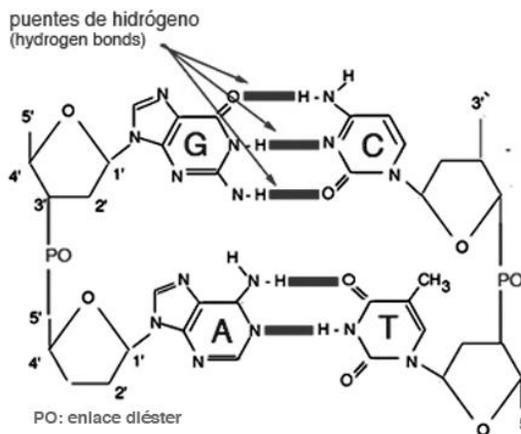
2.2.3. Etapas de la PCR



Cada ciclo, que involucra tres reacciones rigurosamente controladas en tiempo y temperatura en los termocicladores automáticos, lleva alrededor de 1-5 minutos. Los tres pasos en cada ciclo son:

1) Desnaturalización de la doble cadena de DNA, a una temperatura por encima de su punto de fusión alrededor de 93°-95°C para obtener dos cadenas simples de DNA (Walker J. *et al.*, 2006; Passarge E., 2004). En esta etapa el calor aumenta la energía cinética de la molécula de DNA dicha energía es mayor a la necesaria para mantener los enlaces entre los átomos de hidrógeno y las pares de bases lo cual conlleva a la separación de la doble cadena de DNA (Micklos *et.al*, 2003).

Figura 2.3 Muestra los enlaces que mantienen unida la molécula del DNA y que al ser sometidos a altas temperaturas se rompen permitiendo la desnaturalización de la doble hélice

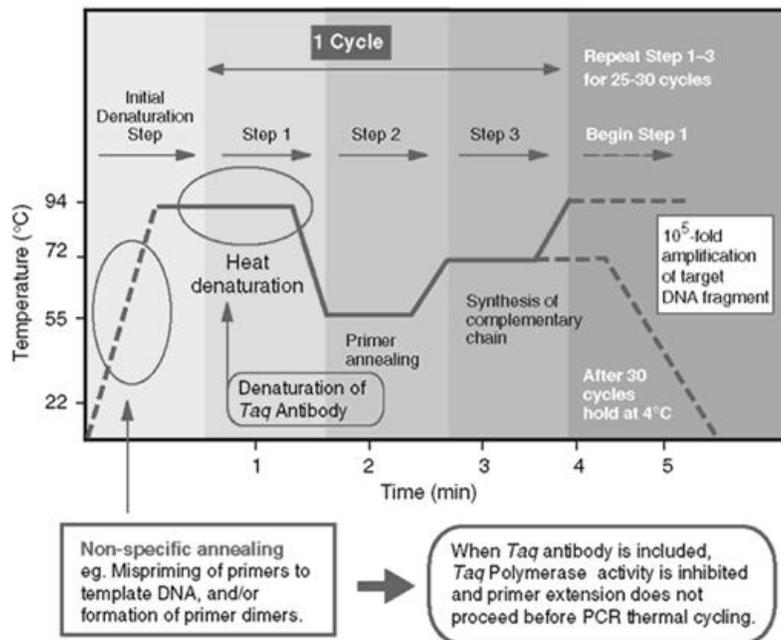


2) Hibridación alrededor de 50°C-70°C dependiendo de la temperatura de fusión esperada del dúplex de DNA (Passarge E., 2004). En esta etapa se desciende la temperatura lo suficiente para que ocurra la hibridación entre los cebadores y el DNA molde, pero que aún sea lo suficientemente alta para prevenir la hibridación errónea de los cebadores con otras secuencias de gran similitud que se encuentren en otras partes del genoma. El uso de altas concentraciones de cebadores favorecen que esta reacción transcurra con mayor eficiencia que la de re-alineamiento de las hebras de DNA molde. (Walker J. *et al.*, 2006). La temperatura óptima de hibridación varía dependiendo de la proporción de AT y GC (Micklos *et.al*, 2003).



3) Síntesis del DNA utilizando polimerasa de DNA termorresistente (proveniente de microorganismos que viven en fuentes calientes como la *Thermophilus aquaticus*, *Taq polimerasa*), típicamente a unos 70°C-75°C. En cada ciclo subsiguiente el molde inicial y el DNA nuevo, sintetizado durante el ciclo anterior actúan como molde para otra vuelta de síntesis (Passarge E., 2004).

Figura 2.4. Muestra las condiciones (tiempo-Temperatura) de las etapas de la PCR



Una vez que se ha realizado la técnica de PCR, consiguiendo por tanto una cantidad suficiente de DNA procedente de la muestra, se procede a la identificación de secuencias mediante geles de agarosa, hibridación con sondas complementarias (reconocimiento), o técnicas de análisis de polimorfismos (comparación de secuencias), también llamadas RFLPS. Éstas últimas se utilizan exclusivamente en la identificación de especies (López M. *et al.*, 2003).

Esta técnica de PCR ha revolucionado la investigación en biología molecular, aplicándose a una multitud de usos, desde la clonación y el estudio de la expresión genética, la búsqueda de polimorfismos genéticos y actualmente encuentra campo de aplicación en la autenticación de alimentos (Tagu D. *et al.*, 2003).

2.2.4. Limitaciones y eficiencia de la PCR



Los factores que pueden inhibir la amplificación de los ácidos nucleicos por PCR están presentes en los blancos de DNA provenientes de diversos medios. Estos inhibidores generalmente actúan en uno o varios puntos de la reacción de las siguientes maneras; (1) pueden interferir con la célula de lisis necesaria para la extracción de DNA (2) Degradan ácidos nucleicos (3) Inhiben la actividad de la polimerasa para la amplificación de DNA (Wilson I., 1997). Otro factor limitante es la longitud del DNA molde entre los cebadores; generalmente mientras más larga es la secuencia menor es la eficiencia de la PCR, si bien se han descrito amplificaciones de 10 kb. La reacción puede ser dificultada por la existencia de complementariedad entre los cebadores, causando un fenómeno conocido como “dimerización de cebadores”. Los cebadores parcialmente hibridados son reconocidos y amplificados por la polimerasa, monopolizando en ocasiones la reacción (Walker J. *et al.*, 2006).

La secuencia de DNA a amplificar puede así mismo afectar también a la eficiencia del proceso. Las hebras desnaturalizadas que presentan zonas de secuencia ricas en GC, las cuales tienden a formar estructuras secundarias pueden impedir a la enzima la lectura del DNA molde (Walker J. *et al.*, 2006). Sustancias tales como el glicerol y el sulfóxido de dimetilo (DMSO) pueden tener un efecto similar sobre la información de estructuras secundarias; si bien, por el contrario, pueden inhibir a las polimerasas. Otras proteínas como la albúmina sérica bovina (BSA) pueden intensificar la PCR protegiendo a la polimerasa quelando inhibidores. Ejemplos de inhibidores incluyen a los ácidos húmicos, los cuales se encuentran a menudo en muestras arqueológicas, los productos provenientes de la rotura del grupo hemo, los cuales pueden acomplejar el Mg^{2+} requerido para la actividad enzimática; del mismo modo algunos constituyentes de los alimentos tales como compuestos orgánicos y fenólicos, grasas, proteínas, polisacáridos, extractos de cocoa y azúcar caramelizada pueden inhibir la DNA polimerasa (Walker J. *et al.*, 2006; Wilson I., 1997; Gasch A. *et al.*, 1997)

La elevada sensibilidad que confiere a la técnica de PCR su utilidad es también su limitación más seria. Ya que la amplificación exponencial de DNA moldes puede conseguirse incluso a partir de una sola célula, cualquier debris celular o reactivos contaminados pueden representar un serio riesgo de resultados falsos. Con mucho, los recipientes más importantes de moldes expúreos son los productos de reacciones previas de PCR. Estos representan una



fuelle altamente enriquecida de la secuencia diana, y pueden llegar a encontrarse por todas partes en el laboratorio después de un periodo de tiempo utilizando los mismos cebadores. Por esta razón, es prudente el preparar y analizar las reacciones de PCR en áreas separadas de laboratorio, utilizando el equipamiento específicamente para la técnica (particularmente pipetas), reactivos alicuotados y múltiples controles en cada reacción (Walker J. *et al.*, 2006).

Los efectos inhibitorios pueden ser minimizados mediante la optimización de las condiciones de la reacción así como asegurando las cantidades adecuadas de cada uno de los reactivos y la asepsia del laboratorio (Wilson I., 1997). Algunos laboratorios que utilizan los protocolos de PCR hasta sus límites de sensibilidad, emplean una esterilización enzimática o fotoquímica para prevenir la amplificación de un protocolo anterior (Walker J. *et al.*, 2006). Irónicamente las buenas prácticas de cambiarse los guantes pueden causar una predisposición al fracaso de las reacciones. Se ha demostrado que el polvo de los guantes tiene un efecto inhibitorio sobre la PCR el cual varía dependiendo de su proceso de fabricación (De Lomas *et al.*, 1992).

2.2.5. Visualización de los productos de PCR en gel de electroforesis

Después de que ha concluido la PCR es necesario realizar un análisis electroforético a las muestras para poder visualizar el tamaño de los fragmentos amplificados. Estos fragmentos pueden separarse en función de su tamaño en geles de agarosa y acrilamida. La mezcla resultante de la PCR se deposita en un extremo del gel y se somete a un campo eléctrico. Las moléculas de DNA (ácido orgánico con carga negativa) migran en el campo eléctrico hacia el ánodo (Micklos *et al.*, 2003; Tagu D. *et al.*, 2003). Al pasar por el gel de agarosa o acrilamida, se separan según su tamaño: las moléculas mayores se retienen más que las moléculas más pequeñas y migran pues más lentamente en el gel. Una baja concentración (0.3%) es adecuada para separar fragmentos grandes mientras que una alta concentración (>2%) produce un gel denso en el cual tienen una buena resolución fragmentos pequeños (Micklos *et al.*, 2003). La acrilamida tiene una capacidad separadora superior, sin embargo, dada su toxicidad su uso es más delicado (Tagu D. *et al.*, 2003).

Para visualizar los fragmentos de DNA después de la electroforesis, el gel se sumerge en una solución con bromuro de etidio. Esta molécula se intercala entre las bases de los ácidos



nucleicos y emite fluorescencia roja-naranja cuando se excita con luz ultravioleta . En este punto cabe señalar que el bromuro de etidio es un mutágeno peligroso, induce citotoxicidad al intercalarse en el surco mayor de la hélice de DNA con lo cual se altera la síntesis de DNA y su transcripción por lo tanto se debe de manipular en condiciones particulares (guantes, bata, residuos reciclables, etc) (Tagu D. *et al.*, 2003)

Figura 2.5. Muestra la molécula de bromuro de etidio

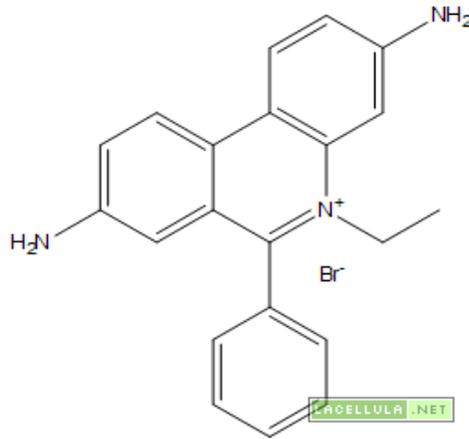
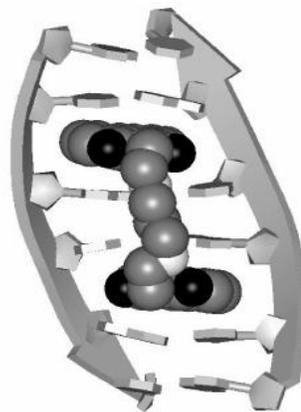


Figura 2.6. Modelo teórico de unión del bromuro de etidio a la molécula de DNA



Una vez teñido, el gel se analiza bajo una lámpara U.V. y las moléculas de DNA complejadas al bromuro de etidio se vuelven visibles. Esta técnica es extremadamente sensible y se puede detectar una cantidad tan pequeña como 5ng (0.000000005 g) de DNA (Micklos *et al.*, 2003).



Dado que las distancias de migración son proporcionales al logaritmo del número de bases, se puede determinar el tamaño de los fragmentos de restricción comparando su movilidad electroforética con la de fragmentos de DNA de tamaño conocido (marcadores de peso molecular) (Tagu D. *et al.*, 2003).

En algunos casos el DNA se marca, antes de la electrofresis, por incorporación de un isótopo radioactivo, lo que permite una fácil detección por autorradiografía : las partículas emitidas por el radio-isótopo impresionan una película fotográfica colocada sobre el gel . El revelado de la película es el de una película fotográfica normal y se obtienen señales (bandas) negras correspondientes a las moléculas radioactivas (Tagu D. *et al.*, 2003).



CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. Cuadro Metodológico

El cuadro metodológico utilizado para la realización de este trabajo se muestra en la figura 3.1

3.2. Descripción del cuadro metodológico

A continuación se describen los objetivos particulares así como las actividades que fueron realizadas para cumplir cada uno de ellos.

3.2.1. Objetivo General

Establecer una metodología para identificar dos diferentes especies animales basada en la técnica de PCR para detectar y cuantificar adulteraciones con leche de bovino en quesos que reporten en su etiquetado ser de leche de cabra.

3.2.2. Objetivo Particular 1

Analizar la secuencia de DNA mitocondrial de cada una de las especies de estudio cabra (*Capra hircus*) y vaca (*Bos taurus*) por medio de programas bioinformáticos para la selección de primers que delimitarán la zona diana.

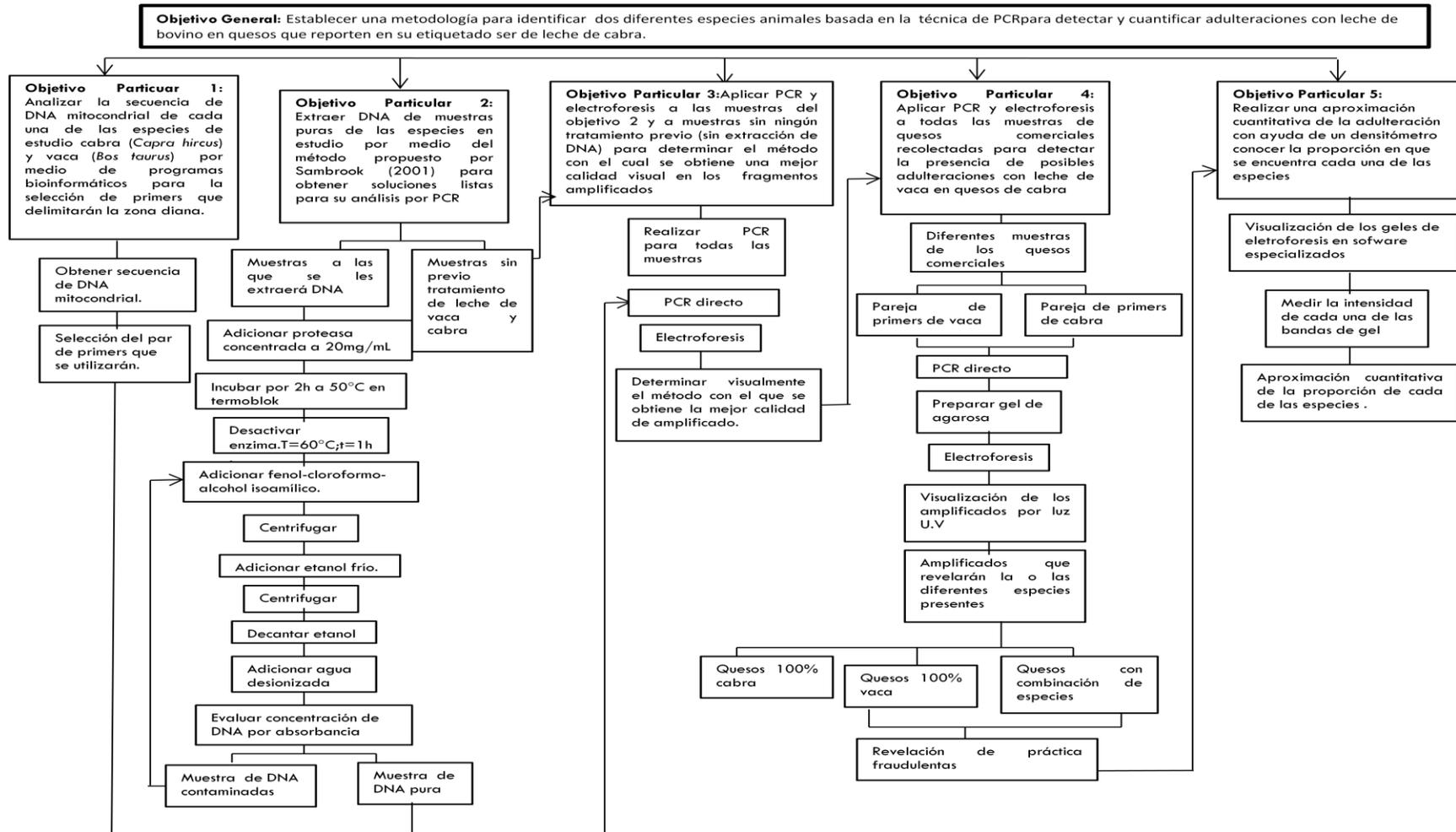
Actividad 1. Revisión bibliográfica para conocer las secuencias de primers reportadas para las especies en estudio (*Capra hircus* y *Bos taurus*).

Actividad 2. Revisión de las secuencias de DNA mitocondrial de cada una de las especies en programas bioinformáticos.

Actividad 3. Selección de primers que se utilizarán.



FIGURA 3.1. CUADRO METODOLÓGICO





3.2.3. Objetivo Particular 2

Extraer DNA de muestras puras de las especies en estudio por medio del método propuesto por Sambrook (2001) para obtener soluciones listas para su análisis por PCR.

Actividad 1. Obtener muestras de leche de vaca y cabra sin ningún tratamiento.

Actividad 2. Extracción de DNA de las muestras.

Actividad 3. Evaluar la concentración de DNA por absorbancia 260 nm.

3.2.4. Objetivo Particular 3

Aplicar PCR y electroforesis a las muestras del objetivo 2 y a muestras sin ningún tratamiento previo (sin extracción de DNA) para determinar el método con el cual se obtiene una mejor calidad visual en los fragmentos amplificados

Actividad 1. PCR directo con kit Phusion Blood[®] para muestras de DNA de vaca y cabra y para muestras sin tratamiento.

Actividad 2. Determinar visualmente el método con el cual se obtienen los mejores amplificados.

3.2.5. Objetivo Particular 4

Aplicar PCR y electroforesis a todas las muestras de quesos comerciales recolectadas para detectar la presencia de posibles adulteraciones con leche de vaca en quesos de cabra.

Actividad 1. Recolectar quesos etiquetados como quesos de cabra (exclusivamente) en diferentes supermercados y tiendas.



3.2.6. Objetivo Particular 5

Realizar una aproximación cuantitativa de la adulteración con ayuda de un densitómetro para conocer la proporción en la que se encuentra cada una de las especies.

Actividad 1. Analizar el gel de electroforesis en un densitómetro² para conocer las proporciones de cada una de las especies en los quesos analizados con presencia de bovino.

² Es necesario contar con un software especializado para llevar la cuantificación de esta manera. En el laboratorio #8 de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se cuenta con el software Gene tools.



3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Material Biológico

Muestras puras

- * Leche Fresca de vaca
- * Leche Fresca de cabra³

Muestras comerciales

Las muestras fueron obtenidas en diferentes supermercados, tiendas de productos orgánicos y tiendas de productos gourmet. En total se consiguieron 11 muestras las cuales declaraban en el etiquetado estar elaboradas exclusivamente de leche de cabra. A continuación se presentan algunas generalidades de dichas muestras:

Cuadro 3.1. Generalidades de las muestras recolectadas

# Muestra	Marca	Lote	Caducidad	Precio (kg)
1	Carol Madurado	26.111049E	010211	253.84
2	Mikonos deli	157	300111	252.66
3	Queso Art	NR	040211	229.50
4	Carol	20.121053 ^a	280311	228.57
5	Flaveur	QQNA12071210	050211	343.20
6	El queso de cabra	96	150311	238.46
7	Ranho Vistalegre	2523	120411	300
8	Laclette	17.091038E	050111	234.78
9	Queso Cabrales picos de Europa	NR	NR	636.00
10	Queso de Cabra García Baquero Tierno	NR	NR	479.28
11	La Cabrita	024	280311	250

NR-No Reportado

³ La leche de vaca y cabra fueron obtenidas en las instalaciones de “Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4”, estando presentes durante la ordeña; es por ello que se tiene la certeza de que estas muestras no fueron sometidas a ningún tratamiento, además de ser de las especies señaladas.



3.3.2. Extracción de DNA

Material de laboratorio

- * Mortero con pistilo
- * Espátula
- * Tubos eppendorff esterilizados
- * Termómetro.
- * Kit de micropipetas *Rainin* de 0.5 – 1000 μL
- * Puntas para micropipetas
- * Gradilla

Equipo

- * Balanza analítica electrónica, *Cole parmer PR410 Equipar*
- * Vortex *Genie K-55-G*
- * Microcentrífuga, *Minispin plus eppendorf* 14 000 rpm
- * Termoblok, *Thermomixer compact Eppendorf*

Reactivos

- * Agua desionizada o biodestilda con pH de 7
- * Solución de lisis (Tris base 50Mm, p H =8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)
- * Enzima proteinasa K a concentración de 20 mg/mL
- * Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico, en proporción 12:24:1
- * Etanol frío

Método de extracción de DNA

Disgregación del tejido

1. Congelar la muestra. Se puede utilizar Nitrógeno líquido o congelador normal.
2. Moler la muestra con ayuda de un mortero.
3. Pesar 125mg de muestra en un tubo eppendorff.
4. Adicionar 1250 μL de solución de lisis.
5. Agitar en el vortex hasta que se visualicen fragmentos más pequeños.



6. Adicionar 7 μ L de enzima Proteinasa k.
7. Incubar los tubos a 50°C en termoblok por 2 horas.
8. Elevar la temperatura del termoblok a 60°C por una hora; esto con la finalidad de desactivar la enzima.
9. Al salir las muestras del baño seco tomar aproximadamente la mitad y ponerla en un tubo eppendorff nuevo, por lo tanto se tienen dos tubos eppendorff que contienen la misma muestra. Esto se hace con la finalidad de tener una réplica de la extracción.

Extracción de proteínas y polisacáridos

10. Adicionar a cada tubo que con muestra 2500 μ L de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
11. Mezclar el tubo suavemente para que la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico pueda interactuar de forma adecuada con todos los demás componentes.
12. Centrifugara 8,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Recuperar la fase acuosa superior que contiene el DNA. Evitar recuperar cualquier otra de las fases.
14. Trasladar la fase recuperada a dos tubos eppendorff esterilizados.

Precipitación de DNA

15. Adicionar 1500 μ L de etanol frío a cada tubo.
16. Mezclar suavemente.
17. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos.
18. Decantar el etanol y dejar secar el DNA en la incubadora a 37°C colocando los tubos de forma horizontal. El DNA puede visualizarse pegado al tubo como una mancha blanca muy tenue.
19. Adicionar agua desionizada para resuspender el DNA agitando suavemente el tubo hasta que esté completamente diluido.
20. A continuación se debe de hacer la cuantificación del DNA por medio de absorbancia.⁴

⁴ Si no se cuantifica inmediatamente el DNA, éste tiene que conservarse a una temperatura de -20°C.



3.3.3. Cuantificación de DNA por medio de absorbancia

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

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

(Sambrook J. & Russell D., 2001)

Material de laboratorio

- * Micropipetas.
- * Puntas para micropipetas.

Equipo

- * Nanoespectrofotómetro, *Accesolab* Nano Drop ND-1000.

Reactivos

- * Soluciones de DNA.
- * Agua libre de nucleasas.



Método para la cuantificación de DNA por medio de absorbancia

1. Encender el Nanodrop.
2. Poner 2 μL de agua libre de nucleasas para iniciar el equipo.
3. Este equipo se encuentra conectado a una computadora. En la computadora abrir el programa de “Nanodrop”.
4. Entrar a la opción de ácidos nucleicos.
5. Poner 2 μL de agua libre de nucleasas la cual servirá como blanco.
6. En la computadora, dar en la opción de blanco y dejar que el equipo lo lea. En este caso todos los valores deben de ser cero.
7. Cuando el equipo ha dado los valores del blanco, limpiar el sensor con ayuda de un pañuelo.
8. Poner 2 μL de la muestra que se desea cuantificar y dejar que el equipo la lea.
9. El equipo da diferentes valores, pero los más importantes son:
 - Relación 260/280 = idealmente debe de ser 1.8
 - La concentración expresada en $\text{ng}/\mu\text{L}$ = 50

3.3.4. PCR directo

Material Biológico

- * Muestras de quesos
- * Primer F y R (*Bos taurus*)
- * Primer F y R (*Capra Hircus*)



Cuadro 3.2. Oligonucleótidos utilizados como primers para la PCR

Especie	Primers (5' → 3')	Tamaño del amplificado
<i>Capra hircus</i>	144 CGCCCTCCAAATCAATAAG	326 pb
	469 AGTGTATCAGCTGCAGTAGGGTT	
<i>Bos taurus</i>	916 GTACTACTAGCAACAGCTTA	256 pb
	1171 GCTTGATTCTCTGGGTAGAG	

1. Estas secuencias se mandaron sintetizar a los laboratorios Invitrogen®

Material de laboratorio

- * Tubos eppendorff esterilizados
- * Kit de micropipetas de 0.2 µL – 1000 µL
- * Puntas para micropipetas esterilizadas
- * Gradilla

Equipo

- * Balanza digital
- * Vortex
- * Microcentrífuga
- * Termoblok
- * Termociclador ATC 4011, *Apollo Instrumentation*

Reactivos

- * Agua desionizada o biodestilada con pH de 7
- * Kit de PCR directo Phusion® Blood



Método de PCR-directo

1. Los primers que ya han sido hidratados previamente ⁵ tienen que diluirse para realizar la PCR, ésta dilución tiene que ser en una proporción 1:10.
2. En este caso se prepararon 50µL de dilución.
3. En un tubo de los más pequeños (200 µL) poner 5 µL de primer y 45 µL de agua libre de nucleasas.
4. La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo que precisa Phusion[®] Blood.
5. La PCR está compuesta por diversos componentes. La reacción se preparó en tubos de 20µL; a continuación se muestra la proporción de cada uno de ellos :

Cuadro 3.3. Componentes de la PCR

Componente	Volumen (µL)
Buffer	10
Primer F	1.0
Primer R	1.0
Enzima	0.4
Agua libre de nucleasas	6.6
Muestra	1.0

6. Poner a cada tubo la muestra que le corresponda.
7. Etiquetar los tubos según la muestra que contengan.
8. Agitar los tubos en el vortex y ponerlos en la micocentrífuga 5 segundos aproximadamente.
9. Meter los tubos al termociclador y programarlo a las diferentes condiciones según la etapa de la reacción que se esté llevando a cabo. Para este caso en particular se trabajaron 35 ciclos y el programa tuvo una duración total de 60 min :

⁵ La hidratación de los primers se describe en el Anexo 2



Cuadro 3.4. Muestra las condiciones a las que se llevó a cabo la PCR directa

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización	98	5
Etapa que repite cíclicamente	98	0:01
Etapa que repite cíclicamente	55	0:05
Etapa que repite cíclicamente	72	0:15
Extensión final	72	1:00

Figura 3.2. Termociclador Mod. ATC 401. Apollo instrumentation



Al salir las muestras de la PCR se sometieron a electroforesis; así se pudieron visualizar los fragmentos de diferentes tamaños que correspondían a la(s) especie(s) contenidas en cada una de las muestras.

3.3.2. Electroforesis

Material Biológico

- * Muestras de amplificadas por PCR directo

Material de laboratorio

- * Puntas para micropipetas
- * Gradilla
- * Matraz Erlenmeyer de 200 mL
- * Parafilm

Equipo

- * Balanza analítica electrónica, *Cole parmer PR410 Equipar*
- * Microcentrífuga, *Minispin plus eppendorf 14 000 rpm*



- * Fuente de poder, *Bio-Rad PowerPac 200*
- * Cámara y cassette de electroforesis, *Apollo 75.10*

Reactivos

- * Agua desionizada o biodestilda con pH de 7
- * Agarosa, *Gibco ERL*
- * Bromuro de etidio en concentración de 10mg/mL
- * Tinte cargador azul/naranja 6X, *Promega*
- * Marcador de peso molecular, *Promega*

Método para electroforesis en gel de agarosa

Preparación del gel de agarosa

1. Cuando la PCR ha finalizado los productos de la misma se analizaron en un gel de agarosa al 2.5% el cual estaba contenido en una cámara de 50 mL.
2. Pesar 1250 mg de agarosa.
3. Disolver en 50 mL⁶ TAE 1X.
4. Calentar la disolución en horno de microondas aproximadamente 1 min por espacios de 10 segundos (esto se hace para evitar que se evapore agua de la disolución).
5. Cerrar las aperturas laterales del soporte del gel.
6. Se añade 1 gota de BRET y se mezcla bien⁷.
7. La mezcla se vierte en el soporte cuidando que no se formen burbujas, si se forman es preciso removerlas. Inmediatamente después se colocan los peines.

⁶ El volumen en el que se disuelve la agarosa depende del tamaño de la cámara de electroforesis.

⁷ El BRET (bromuro de etidio) es un colorante fluorescente altamente tóxico esencial para la tinción del DNA en el gel. Esta molécula se intercala entre las bases apiladas del DNA creando una unión del tipo Van der Waals con las bases de la cadena. Después de la inserción dentro de la hélice, el colorante permanece perpendicular al eje helicoidal teniendo contacto con la base superior e inferior. La posición arreglada de la molécula y la proximidad a las bases causa que el colorante exhiba su campo fluorescente (Sambrook J. & Russell D., 2001).



8. Se deja solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire.
9. Se retiran los peines y se coloca el soporte con el gel en la cámara de electroforesis.
10. Adicionar TAE 1X a la cámara de modo que el gel quede cubierto

Figura 3.3. Fuente de poder y cámara de electroforesis

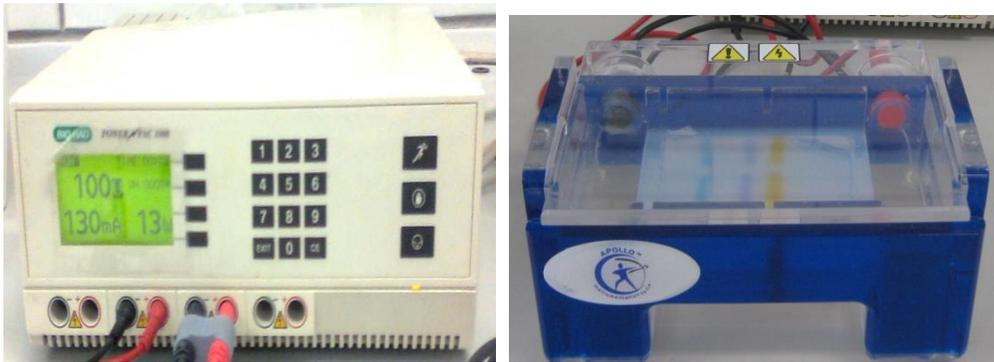


Figura 3.4. Fotodocumentador





Carga y corrida del gel

1. Poner en un trozo de parafilm 3 μ L de BRET; 3 μ L de colorante azul/naranja y 1 μ L de marcador de peso molecular y 5 μ L de la muestra que ha salido de la PCR directo.
2. Estas tres gotas se tienen que mezclar muy bien con ayuda de una micro-pipeta (teniendo cuidado de no formar burbujas) se recogen y se depositan en el pocillo correspondiente.
3. Cuando se ha terminado de cargar el gel, se cierra la cámara; el gel fue corrido en un campo eléctrico de 60v creado por la fuente de poder. El cátodo se conecta en el extremo cercano a los pocillos, de modo que la molécula migre hacia el ánodo.
4. La corrida dura hasta que el colorante se visualice cerca del extremo opuesto. El movimiento visible del bromuro de etidio permite monitorear la migración de las bandas invisibles de DNA

Visualización de fragmentos

Una vez finalizada la migración de los fragmentos de DNA, su tamaño puede determinarse comparando la distancia recorrida en el gel con la de fragmentos de tamaño conocido (Marcadores de peso molecular).

1. Poner el gel dentro del transluminador.
2. Centrar el gel y encender el transluminador.
3. Encender la cámara.
4. Fotografiar el gel; la imagen se envía a un ordenador que la procesa en el software adecuado.

3.3.3. Cuantificación de amplificadores obtenidos

Equipo

- * Software especializado Gene tools



Método para cuantificación de los amplificadores obtenidos

Para aquellas muestras en las cuales se detectó presencia de ambas especies se realizó una aproximación cuantitativa del porcentaje en el que se encuentra cada una de ellas. La cuantificación se llevó a cabo en el software Gene tools, el cual es un densitómetro (mide intensidad de banda del amplificador obtenido).

A continuación es detallada la secuencia seguida para la cuantificación se Ya que se tiene la foto del gel previamente corrido se tiene que abrir en el Gene tolos.

1. Delimitar la zona del gel con la que se va a trabajar.
2. El programa automáticamente detecta las bandas contenidas en el gel y mide la intensidad de cada una.
3. Para obtener una aproximación cuantitativa se tomó el control positivo de cabra como referencia y se le asignó el valor de 100%.
4. El programa automáticamente hace un comparativo de cada una las bandas contra el control positivo, hace una regresión lineal y saca un porcentaje, el cual se toma como una aproximación de el porcentaje de leche de cabra contenida en la muestra; el porcentaje de leche de bovino sólo se sacó haciendo una diferencia.

Figura 3.5. Muestra como el programa Gene tools mide la intensidad de la banda

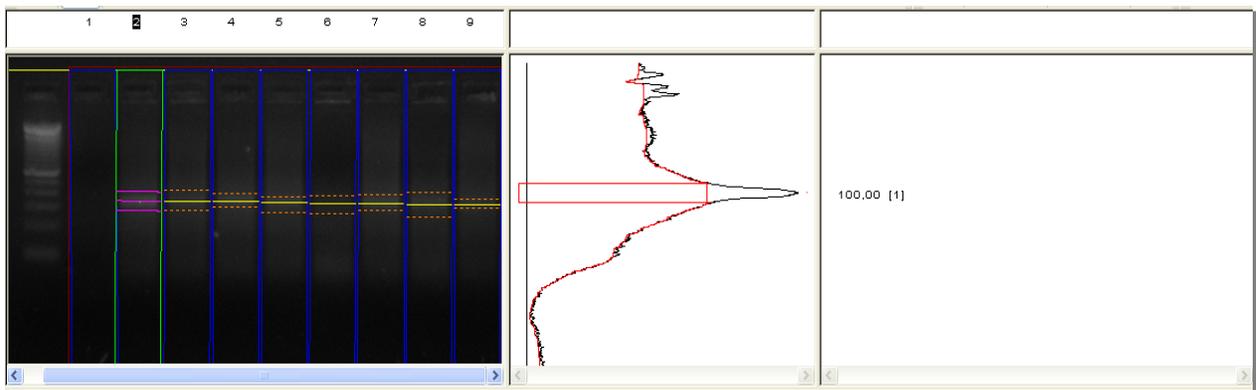
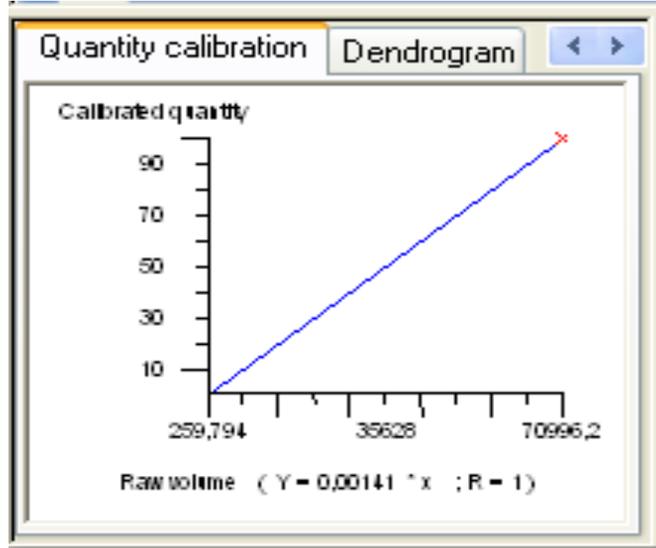




Figura 3.6. Muestra la curva que el programa va realizando con la ecuación de la recta correspondiente





CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo particular 1

Analizar la secuencia de DNA mitocondrial de cada una de las especies de estudio cabra (*Capra hircus*) y vaca (*Bos taurus*) por medio de programas bioinformáticos para la selección de primers que delimitarán la zona diana

Los primers que se utilizaron durante esta experimentación han sido reportados en publicaciones anteriores, tales como, Bottero *et al.*, 2003; Mafra *et al.*, 2004,2007; López Calleja I. *et al.*, 2005, por lo que solo se necesitó entrar a Mitomap el cual, es un programa bioinformático que comprobó que las secuencias correspondieran a las especies deseadas. La región utilizada del mtDNA 12S rRNA genera fragmentos de 256 y 326 pares de bases para bovino y cabra respectivamente.

A continuación se presentan las secuencias utilizadas para la amplificación de cada especie

* Secuencia *Bos taurus*

901 aaattattcg ccagagtact actagcaaca gcttaaaact caaaggactt ggcggtgctt
961 tatatccttc tagaggagcc tgttctataa tcgataaacc ccgataaacc tcaccaatc
1021 ttgctaatac agtctatata ccgcatctt cagcaaacc taaaaaggaa aaaaagtaag
1081 cgtaattatg atacataaaa acgtaggtc aaggtgtaac ctatgaaatg ggaagaaatg
1141 ggctacattc tctacaccaa gagaatcaag cacgaaagttt attatgaaac caataaccaa

* Secuencia *Capra hircus*

121 agcatccacg ccccggtgag taagccctc caaatcaata agactaagag gacgaggtat
181 caagcacaca tctcgtagct tacaagcct cgcttaacca caccctacg ggagacagca
241 gtgacaaaa ttaagccata aacgaaagt tgactaagcc atgtgacca gggttggtaa
301 atctcgtgcc agccaccg gtcatac gat taaccaagc taacaggaat acggcgtaaa
361 acgtgttaaa gcactacatc aaatagagtt aaattctaat taaactgtaa aaagccataa
421 ttacaacaaa aatagatgac gaaagtaacc ctactgcagc tgatacacta tagctaagac



Objetivo particular 2

Extraer DNA de muestras puras de las especies en estudio por medio del método propuesto por Sambrook (2001) para obtener soluciones listas para su análisis por PCR.

Se realizó la extracción de la leche de vaca y cabra siguiendo el protocolo detallado anteriormente, los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Resultados obtenidos de la extracción de vaca y cabra

Muestra	Relación 260/280	ng/ μ L
Leche de vaca	1.64	73.4
Leche de vaca	1.68	83.9

Los resultados de la relación 260/280 nos muestran que no hay contaminación significativa con proteínas en las muestras de DNA de leche de vaca y cabra; por otro lado la concentración de DNA es adecuada y suficiente para ambas muestras.

Dado que estos dos parámetros nos indican que el DNA de las dos especies se encuentra con la calidad y cantidad requeridas se puede proceder a la utilización de estas muestras para la realización de la PCR.

Objetivo particular 3

Aplicar PCR y electroforesis a las muestras del objetivo 2 y a muestras sin ningún tratamiento previo (sin extracción de DNA) para determinar el método con el cual se obtiene una mejor calidad visual en los fragmentos amplificados

Las muestras del objetivo 2, así como una muestra sin tratamiento de vaca y una de cabra fueron sometidas a PRC utilizando el kit de PCR directo Phusion[®] Blood Esto se realizó con dos finalidades; la primera, comprobar experimentalmente que el kit daba mejores resultados con las muestras sin tratamiento que en muestras en las cuales se trabajaba con DNA extraído; la segunda, comprobar la especificidad de los primers.

Los resultados de la PCR fueron evaluados en un gel de agarosa al 2.5%; sometido en un campo eléctrico de 60V por un tiempo aproximado de 1.30 horas. Una vez finalizada la



migración de los fragmentos de DNA, su tamaño puede determinarse comparando la distancia recorrida en el gel con los fragmentos de tamaño conocido (marcadores de peso molecular) referido como M, en el pocillo 1.

A continuación, en la figura 4.1 se muestra el gel obtenido para este objetivo.

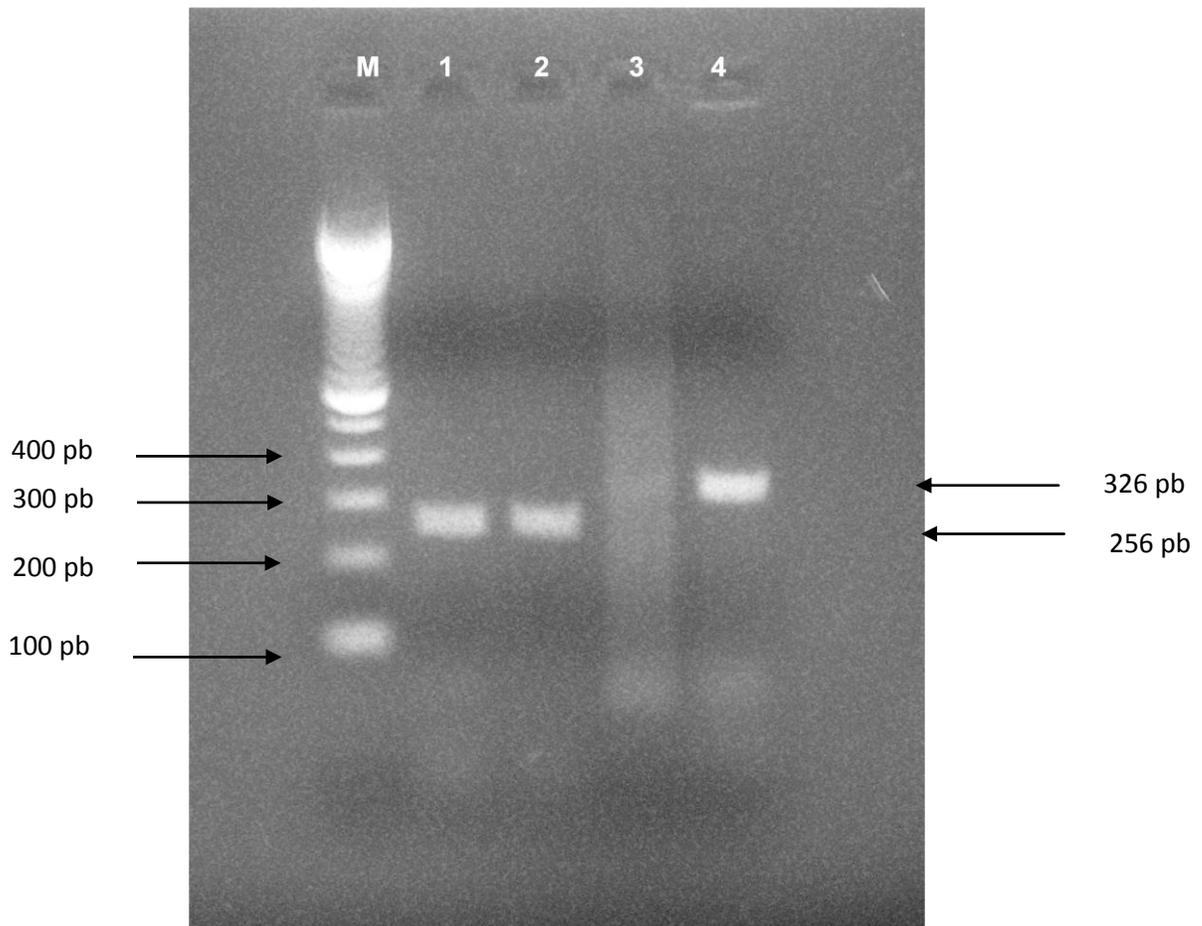


Figura 4.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos amplificados por PCR directo a 35 ciclos de muestras de vaca y cabra. M-100 pb; carril 1, PCR directo con DNA de leche de vaca; carril 2, PCR directo con leche de vaca; carril 3, PCR directo con DNA extraído de leche de cabra, carril 4, PCR directo con leche de cabra.

Como se puede observar en la Figura 4.1. para las muestras de vaca no se aprecia visualmente diferencia significativa en cuanto a la intensidad de la banda entre el carril 1 y 2; sin embargo para las muestras de cabra en el carril 3 no se ve ningún amplificado y en el carril 4 podemos observar una banda intensa a la altura esperada de 326pb. Después de realizada esta prueba



podimos comprobar que efectivamente los primers reportados en publicaciones de otros países también tenían aplicabilidad para las especies de nuestro país, además de concluir que para este kit y bajo las condiciones de experimentación era mejor trabajar la muestra sin extracción previa de DNA.



Objetivo particular 4

Aplicar PCR y electroforesis a todas las muestras de quesos comerciales recolectadas para detectar la presencia de posibles adulteraciones con leche de vaca en quesos de cabra.

Se evaluaron 11 muestras que reportaban ser productos elaborados exclusivamente con la especie *capra hircus*; a estas muestras se les realizó PCR-directo. A continuación se ilustran los resultados obtenidos:

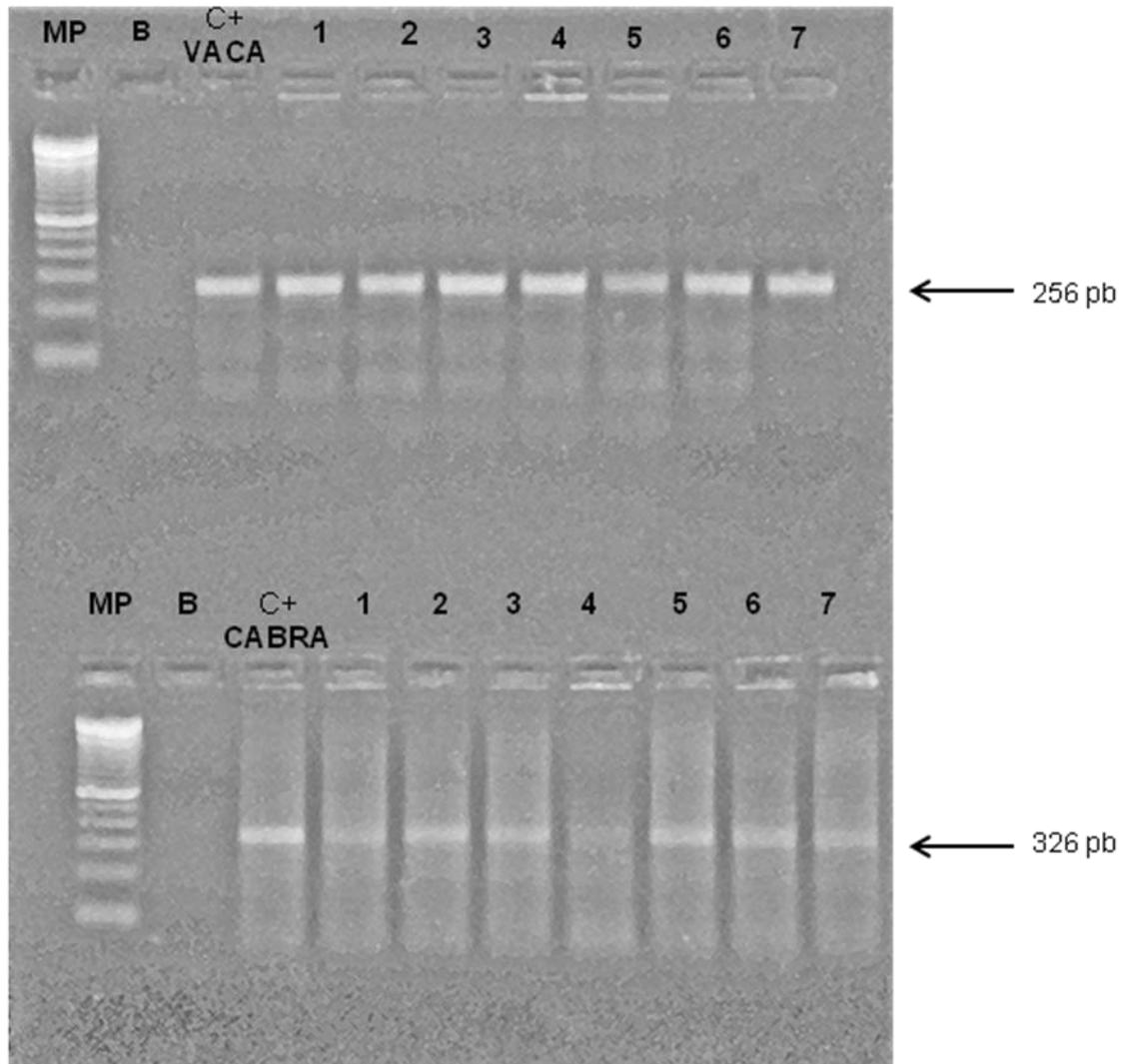


Figura 4.2. Electroforesis en gel doble de agarosa al 2.5 % de los productos amplificados por PCR directo a 35 ciclos de muestras de quesos comerciales. (Superior) MP-100 pb; B, blanco; C+ control positivo de vaca; carril 1 a 7 corresponden a las muestras de productos comerciales del Cuadro 3.2. (Inferior) M-100 pb; B, blanco; C+ control positivo de cabra; carril 1 a 7 corresponden a las muestras de quesos comerciales ilustrados en el Cuadro 3.1.



De acuerdo con los resultados expuestos en la Figura 4.2. se comprobó que las muestras 1 a 7; vienen adulteradas con leche de vaca, incluso visualmente la intensidad de las bandas de vaca 256 pb es mayor comparada con la intensidad de las bandas de cabra 326 pb.

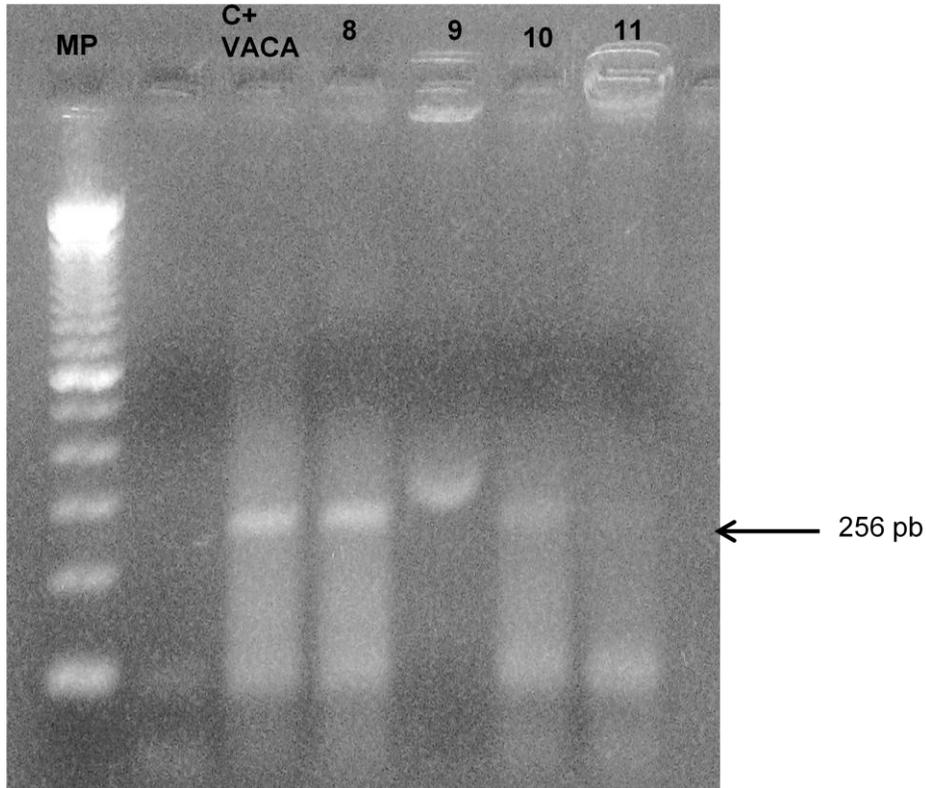


Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos amplificados por PCR directo a 35 ciclos de muestras de quesos comerciales. MP-100 pb; B, blanco; C+ control positivo de vaca; carril 8 a 11 corresponden a las muestras de quesos comerciales ilustrados en el Cuadro 3.1.

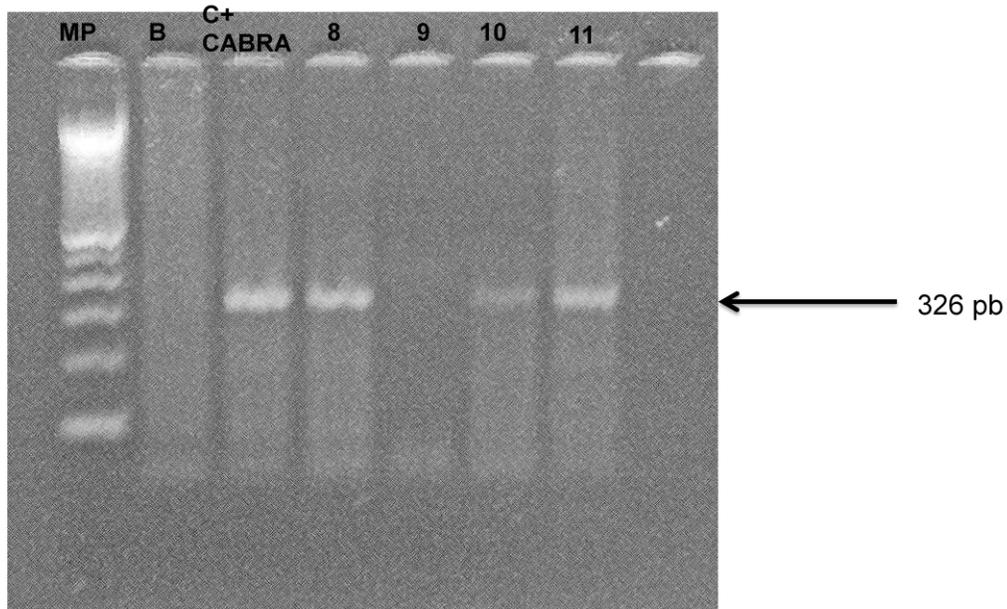


Figura 4.4 Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos amplificados por PCR directo a 35 ciclos de muestras de quesos comerciales MP-100 pb; B, blanco; C+ control positivo de cabra; carril 8 a 11 corresponden a las muestras de quesos comerciales del Cuadro 3.1.

Basándonos en los resultados mostrados en las figuras 4.3 y 4.4 podemos observar que la muestra 8, 9 y 10 vienen adulteradas con leche de vaca. Es importante resaltar que las muestras 9 y 10 que fueron conseguidas en tiendas de productos gourmet, son de marcas altamente reconocidas en España y tuvieron los costos más elevados y no obstante presentaron amplificados que revelan la presencia de leche de bovino.

Es quizá la muestra 9 la que llama más la atención ya que fue la que presentó el costo más elevado y la única que no tuvo amplificado alguno para cabra⁸; sin embargo, no se puede asegurar que este queso no contenga nada de leche de cabra en su composición ya que hay diversos factores que pueden inhibir la PCR. Rossen *et. al* contribuyeron con un estudio muy amplio acerca de diversos factores que pueden inhibir dicha reacción; identificando factores inhibitorios en diversos alimentos tales como medios de cultivo bacterianos, detergentes,

⁸ La PCR para la muestra 9 se hizo por triplicado para confirmar que efectivamente no contenía DNA de cabra, obteniendo en los tres geles el mismo resultado que se presenta en la figura 4.4.



antibióticos, buffers, enzimas, polisacáridos, Ca^{2+} , grasas y proteínas. Al ser este producto un queso madurado con presencia de microorganismos, alto contenido proteico y de grasas la reacción pudo verse inhibida ya que específicamente las proteínas lácteas han sido reportadas como inhibidores de la reacción (Wilson G., 1997). Es por ello que no se puede tener un resultado certero y concluyente para esta muestra.

La muestra 11 fue la única que no presentó ninguna clase de adulteración con bovino y a pesar de ser 100% de cabra no fue la que presentó el costo más elevado.

Es importante señalar que como se mencionó anteriormente las muestras analizadas estaban etiquetadas como si fueran únicamente de leche de cabra lo cual es falso ya que se pueden ver amplificados nítidos para vaca. Esto revela un etiquetado fraudulento y fuera de especificación, ya que, como lo señala la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, en su apartado 4.1.1 “La información contenida en las etiquetas de los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados debe ser veraz y describirse y presentarse de forma tal que no induzca a error al consumidor con respecto a la naturaleza y características del producto”; así mismo en el apartado 4.1.3 de la mencionada norma dice “ Los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados no deberán describirse ni presentarse con una etiqueta en la que se utilicen palabras, textos, diálogos ilustraciones, imágenes, denominaciones de origen y otras descripciones que se refieran o sugieran, directa o indirectamente a cualquier otro producto con el que pueda confundirse, o que pueda inducir al consumidor a suponer que el alimento se relaciona en forma alguna con aquel otro producto”.

El lote de los productos fue reportado con la finalidad de hacer énfasis en que sólo se realizó el estudio para esas muestras en específico y dicho estudio es válido sólo para el lote que se reporta, ya que tal como lo define la NOM-002-SCFI-1993 un lote es un conjunto de unidades de producto del cual se toma la muestra para inspección; en lo posible cada lote debe estar constituido por unidades de producto de un solo tipo, clase, tamaño y composición, fabricados esencialmente bajo las mismas condiciones y el mismo tiempo.

Lo más importante es señalar que esto es un engaño al consumidor que busca comprar un producto de alta calidad y además está dispuesto a pagar por ella. Sin embargo como se comprobó en este estudio, las prácticas fraudulentas como son la introducción de leche de



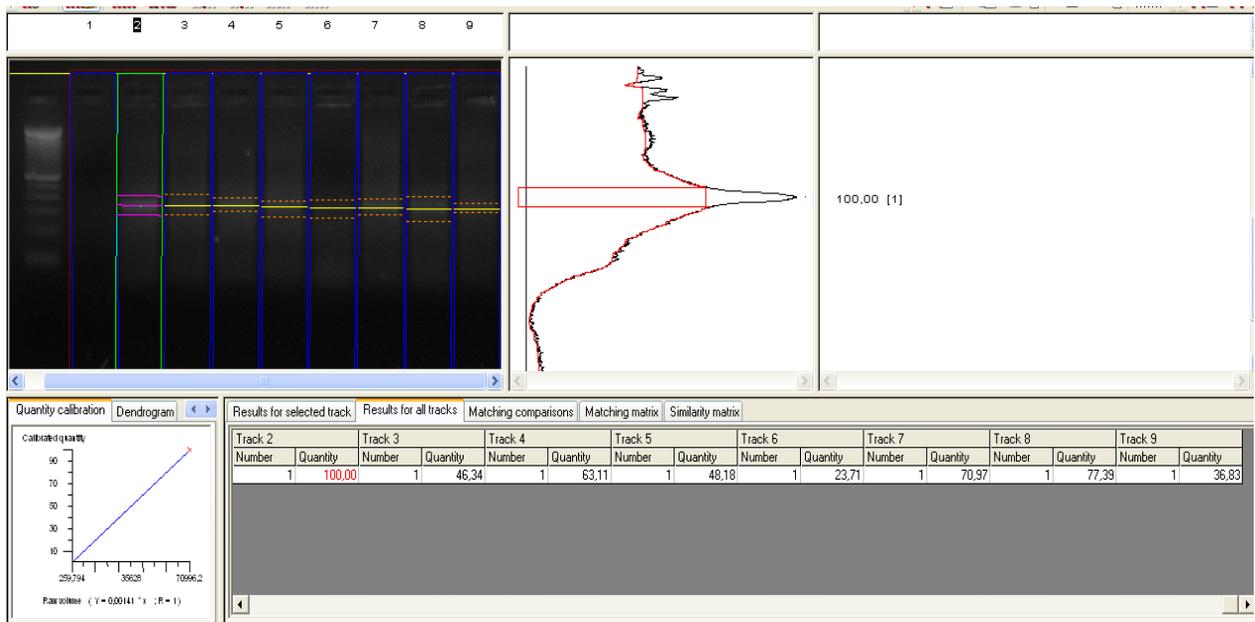
bovino para la elaboración de quesos de cabra es una práctica que suele ser muy común en nuestro país.

Objetivo particular 5

Realizar una aproximación cuantitativa de la adulteración con ayuda de un densitómetro para conocer la proporción en la que se encuentra cada una de las especies.

Para complementar estos resultados se realizó el análisis de los geles en el programa Gene tools para conocer la proporción en que se encontraba cada una de las especies detectadas. A continuación se muestran los resultados obtenidos:⁹

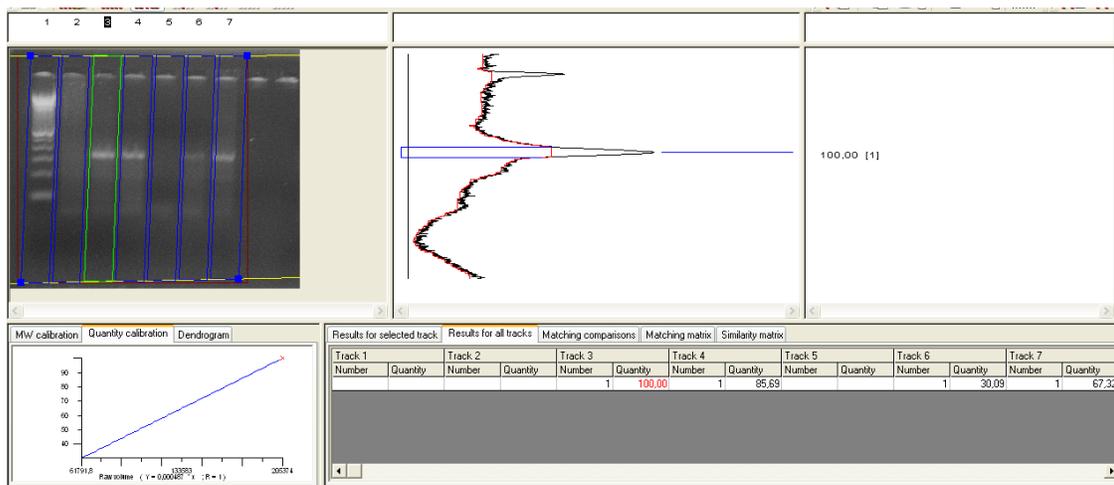
Figura 4.5. Muestra los resultados obtenidos del análisis de cuantificación del gel mostrado en la figura 3.11



⁹ Es importante señalar que este tipo de cuantificación es válida ya que todas las muestras (bovino y cabra) fueron corridas durante la misma PCR, utilizando para todas las mismas proporciones de todos los reactivos así como de muestra; igualmente para la corrida del gel se utilizaron las mismas proporciones de cada uno de los reactivos.



Figura 4.6. Muestra los resultados obtenidos del análisis de cuantificación del gel mostrado en la figura 3.12



Cuadro 4.2. Muestra las especies encontradas en cada uno de los quesos analizados así como el porcentaje aproximado de cada una de ellas

# Muestra	Especie reportada en el etiquetado	Resultado de PCR directo	% Leche de cabra	% Leche de vaca
1	Cabra	B/C	46.34	53.66
2	Cabra	B/C	63.11	36.89
3	Cabra	B/C	48.18	51.82
4	Cabra	B/C	23.71	76.29
5	Cabra	B/C	70.97	29.03
6	Cabra	B/C	77.39	22.61
7	Cabra	B/C	36.83	63.17
8	Cabra	B/C	85.69	14.31
9	Cabra	B/C	ND	62.34
10	Cabra	B/C	30.09	69.91
11	Cabra	B/C	67.32	ND

B=Bovino; C=cabra; ND= No detectado



Para la muestra 9, la cual no presentó ningún amplificado de cabra la cuantificación se realizó solo para bovino tomando como referencia únicamente para este caso la intensidad de banda del control positivo de vaca.

La muestra 11 a pesar de contener sólo leche de cabra el porcentaje obtenido de dicha especie fue menor del 100% esto puede ser resultado, probablemente de algún tratamiento térmico al que fuera sometida la materia prima (leche de cabra) en la cual el DNA se degradara parcialmente.



CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la técnica PCR desarrollada con primers específicos de la especie, permite llevar a cabo la autenticación de productos lácteos procesados de una forma rápida, precisa y eficaz.
- El método propuesto de realización de PCR-directo fue aplicado exitosamente representando un procedimiento rápido y económico.
- En cuanto a la cuantificación se tiene claro que actualmente existen métodos mucho más exactos como la PCR-tiempo real; sin embargo cuando no se tiene acceso al equipo que realiza el estudio mencionado, esta propuesta puede servir para darnos una aproximación cuantitativa. El método propuesto para la aproximación cuantitativa representa un método, fácil y rápido.
- La necesidad de cumplir con la normativa, y la creciente demanda por parte del consumidor hacia alimentos que le inspiren confianza, apuntan hacia un interés cada vez mayor por tecnologías que permitan la trazabilidad alimentaria, en este sentido las técnicas de biología molecular representan una alternativa que, aunque costosa, es aplicable a los alimentos procesados además de ser muy importante para alimentos protegidos con designación de origen (PDO) dando resultados confiables y rápidos.
- El consumidor depende totalmente de la veracidad de la lista de ingredientes en el etiquetado y es responsabilidad de las agencias reguladoras, el verificar y asegurar que los productos contengan solo los ingredientes indicados en sus etiquetas (Calvo *et.al.*, 2001)
- Este estudio se realizó a una pequeña cantidad de muestras y los resultados aquí mostrados son totalmente confiables; sin embargo se propone ampliar este estudio para un número mayor de muestras y lotes con la finalidad de tener resultados representativos y concluyentes en cuanto a las marcas analizadas.



GLOSARIO

ADN (Ácido Desoxirribonucleico): Es la molécula que contiene la información genética primaria en forma de una secuencia lineal de nucleótidos en grupos de tres (Passarge E., 2004).

Annealing: Hibridación de dos moléculas de DNA que se realiza a altas temperaturas para lograr una máxima especificidad; por ejemplo, unión de un cebador (primer) al DNA molde durante la PCR (Passarge E., 2004).

Autenticidad: confiable, fidedigno, genuino, sin duda del origen (Hernández-Chávez *et al.*, 2007)

Autenticación: identificación de los componentes de un producto y la confirmación de su procedencia (López M. *et al.*, 2003).

Bioinformática: Estudio del significado (interpretación) de la información contenida en el genoma de los organismos (Malacinski G *et al.*, 2002).

Electroforesis: Técnica de separación de macromoléculas que involucra el movimiento en un campo de voltaje permitiéndoles migrar de acuerdo con su carga neta individual (Malacinski G., 2002). Como medio de soporte se usan geles formados por sustancias como el almidón, agarosa, acrilamida, etc. Hay modificaciones técnicas que permiten un mayor poder de discriminación; por ejemplo, la electroforesis en dos dimensiones (el campo eléctrico se rota 90° para la segunda migración) o el cese de la migración en el punto isoeléctrico (Passarge E., 2004).

Genómica: Campo de la ciencia que estudia la estructura y función del genoma entero (Passarge E., 2004).

Lote: Conjunto de unidades de producto del cual se toma la muestra para inspección y determinación de la conformidad del criterio de aceptación. En lo posible cada lote o partida debe estar constituido por unidades de producto de un solo tipo, clase, tamaño y composición, fabricados esencialmente bajo las mismas condiciones y en el mismo tiempo (NORMA Oficial Mexicana NOM-002-SCFI-1993).



Muestra: Se constituye con una o más unidades del producto tomadas de un lote o partida (NORMA Oficial Mexicana NOM-002-SCFI-1993).

Primers: Cebadores, oligonucleótidos complementarios a una de las dos hebras de DNA. Los cuales son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción (Passarge E., 2004).



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ggBehrens M., Unthan M., Brinkmann Y., Bucholz R. & Latus N. (1999). Identification of animal species heated and complex meat products using species specific PCR reactions. *Fleischwirtschaft* 5 97-100
- 2) Bottero M.T., Civera T., Nucera D., Rosati S., Sacchi P., Turi R. M., (2003). A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows' goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal*, 13, 277-282.
- 3) Cervantes F., Villegas de Gante A., Cesín V A., Espinoza O.A., (2008). *Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio Cultural que debe rescatarse*. Grupo Mundi-Prensa. México.
- 4) Chamorro Ma. Concepción., Losada Manuel., (2002). *El análisis sensorial de los quesos*. Grupo Mundi-Prensa. Madrid, España.
- 5) Chikuni K., Tabata T., Saito M., Monma M., (1994). Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. *Animal Science and Technology*, 65, 571-579
- 6) De la Fuente M. A., Juárez, M., (2005). Authenticity assessment of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*, 45, 563-585.
- 7) De Lomas J.G., Sunzeri F.J & Busch M.P (1992). False-Negative results by polymerase chain reaction due contamination by glove powder. *Transfusion* 32:83-85
- 8) Dobler, J., Pérez, M., Ramírez Ma., Islas J. (2005). *Curso Teórico-práctico de Lactología*. UNAM. Cuautitlán.
- 9) Flores M.; Pérez M.; Basurto S. & Jurado M.; (2009) La Leche de cabra y su importancia en la nutrición. *Tecnociencia Chihuahua* 3(2): 107-113.
- 10) Gasch, A. *et al.* (1997) Detection of genetically modified organisms with the polymerase chain reaction: potential problems with food matrices in *Foods Produced by*



Modern Genetic Engineering (Schreiber, F.A. and Bögl, K.W., eds) 2nd Status Report, pp. 90–79, BgVV-hefte

- 11) Guoli Z., Mingguang Z., Zhijiang Z., Hongsheng O. & Qiang, L. (1999). Establishment and application of polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Science* 51 233-236.
- 12) Hopwood A.; Fairbrother K.; Lockley A & Bardsley, R. (1999). An actin polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Science* 53 227-231.
- 13) <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pcr.png>.
- 14) <http://dob.cicese.mx/labs/ecolmolecular/investigacion.html>.
- 15) <http://www.canilec.org.mx> .
- 16) <http://www.nutrimedperu.com/composicion.htm>.
- 17) Hurley I.; Coleman R.; Ireland H.;& Williams J.; (2004). Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *Journal of Dairy Science*, 87, 215-221.
- 18) Jacek B., Ugorski M., Polanowwki A., Adamczyk E., (2001). Application of polymerase chain reaction for detection of goats´ milk adulteration by milk of cow. *Journal of Dairy Research*, 68,333-336.
- 19) Jacek, B., Ugorski, M., Polanowwki, A., & Adamczyk, E. (2001). Application of polymerase chain reaction for detection of goats´ milk adulteration by milk of cow. *Journal of Dairy Research*, 68,333-336.
- 20) Locci F., Ghiglietti R.; Francolino S.; Iezzi R.; Oliviero, V.; & Garofalo A (2008).Detection of cow milk in cooked buffalo mozzarella used as pizza topping. *Food Chemistry* 107, 1337-1341.
- 21) Lockley A.K & Bardsley R.G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11, 67-77.



- 22) López, M., Mallorquín, P. & Vega M. (2003). "Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria". Informe de Vigilancia Tecnológica. Sector Agroalimentario. Genoma España/ CIBT-FGUAM.
- 23) López-Calleja I., González I., Fajardo V., Rodríguez M.A., Hernández P.E., García T., Martín R., (2004). PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal* 15, 1122-1129.
- 24) Lopez-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Hernandez, P. E., Garcia, T., Martin, R., et al.(2007). Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. *International Dairy Journal*, 17,87-93
- 25) Lopparelli, R. M., Cardazzo, B., Balzan, S., Giaccone, V., & Novelli, E. (2007). Real-time Taq-man polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese, method validation and its application on commercial samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3429-3434.
- 26) Mafra I., Ferreira M.P.L.V.O.I., Faria M. A., Oliveira B.P.P., (2004). A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4943-4947.
- 27) Mafra I., Ferreira M.P.L.V.O.I., Faria M. A., Oliveira B. P.P., (2007). A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1132-1138.
- 28) Mahaut, M; Jeantet, R; & Brulé, G. (2003). "Introducción a la tecnología quesera". Acribia. Zaragoza, España.
- 29) Malacinski, George M.(2002). "Essentials of molecular Biology". 4ª Edición. Jones and Barlett Publishers Inc. Sudbury Massachusetts
- 30) 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.



- 31) Meyer R., Hofelein C., Luthy J. & Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International* 78,1542-1551
- 32) 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
- 33) Micklos D; Freyer A.; & Crotty D. (2003). "DNA Science". 2^a Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 34) Montiel J.; Pesini E.; Montoya J. ; Roncalés P.; López M. & Pérez A.(2000). Direct and Highly Species-Specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2829-2832.
- 35) Norma Oficial Mexicana. NOM-121-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Quesos: Frescos, Madurados y procesados. Especificaciones Sanitarias. NORMA Oficial Mexicana NOM-002-SCFI-1993
- 36) Passarge, E. (2004). "Genética". Texto y Atlas.2^a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- 37) Robinson, R.K; & Wilbey, R.A. (2002). "Fabricación de queso". 2^a edición. Acribia. Zaragoza, España.
- 38) Rossen, L., Norskow, P., Holmstrom, K &Rasmussen O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Food Microbiology* 17, 37- 45.
- 39) Sachinandan D.; Biswajit B.; Shamik P.; Ayan M.; Moloya G.; Karan P.; Singh R. ; Singh T. ; Kumar D. & Surender L.(2011) . Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control* 22, 690-696
- 40) Sambrook J., Russell D.W., (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America.



- 41) Scholz, W. (1995). "Elaboración de quesos de oveja y de cabra". Acribia. Zaragoza, España.
- 42) Scott, R. (2002). "Fabricación de queso". 2ª Edición. Acribia. Zaragoza, España.
- 43) Skoog, D., Holler, A., Nieman, T. (2001). "Principios de análisis instrumental". 5ª Edición. McGraw-Hill. España.
- 44) Solis R. J., R. A. Castro. 2007. La leche de cabra en la nutrición y en la terapéutica. Universidad de Chapingo 4, 22-47.
- 45) Wilson Ian. (1997). Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Applied and environmental microbiology 63, 3741-3750.
- 46) Wolf, C., Rentsch, J. & Hubner, P. 1999 PCR ± RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 1350-1355
- 47) Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics, using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends in Biotechnology 22, 222- 226.
- 48) www.mitomap.com
- 49) Zehner R.; Zimmermann S. & Mebs D. (1998) RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. International Journal of Legal Medicine 111, 323-327



ANEXO 1. SECUENCIA A SEGUIR EN EL MITOMAP

1. Ingresar al programa bioinformático de Mitomap (www.mitomap.com) y dar clic en la liga de “Complete Mitochondrial Genome Sequences”.

The screenshot shows the MITOMAP website homepage. At the top left, it says "MITOMAP A human mitochondrial genome database". Below this, it describes the database as a compendium of polymorphisms and mutations of human mitochondrial DNA. A search bar is visible with "Perform search" and "Clear" buttons. There are several links and sections: "Mitomap Quick Reference" with links to "The Human Mitochondrial Sequence", "Haplogroups and Markers", and "Amino Acid Translation Tables"; "Illustrations" with links to "Mitochondrial DNA Map", "Eleven pathological mutations in tRNA^{Lys}(UUR)", and "Mitochondrial energetics"; and a "DONATE" button with a circular logo. A "Visitor locations" map is in the top right corner.

This screenshot shows a list of links related to mitochondrial DNA mutations and pseudogenes. The links include: "MitDNA Deletions", "Multiple mtDNA Deletions Within Individuals", "MitDNA Inversions", "MitDNA Simple Insertions", "MitDNA Complex Rearrangements", "Nuclear Genes Involved in Mitochondrial Disease", "Structural Nuclear Genes in Mitochondrial Disease", "Non-Structural Nuclear Genes in Mitochondrial Disease", "Mitochondrial Pseudogenes", "Submittal form for unpublished mtDNA polymorphisms", "Submittal of articles & published data", "Complete Mitochondrial Genome Sequences", "Mitochondria Interest Group Video Casts", "mtDNA in the news: NY Times on the Web, May 2, 2000 'The Human Family Tree: 10 Adams and 18 Eves'", "Archived data: Low Resolution RFLP Screening", and "How to cite MITOMAP".

2. Al entrar a esta liga aparecerán todas las especies (por su nombre científico) de las cuales se encuentra secuenciado el DNA mitocondrial. En esta parte se tiene que dar clic en el nombre científico de la especie de interés.





Species	Accession	Length	GC	Genes	Protein	Structural	GC	Completed	Organism
Canthidemis maculata	NC_011935	16324 nt	13	24	13			Jan 22 2009	Feb 6 2009
Canthigaster coronata	NC_010978	16446 nt	13	24	13			Jun 13 2008	May 14 2009
Canthigaster rivulata	NC_010979	16446 nt	13	24	13			Jun 13 2008	May 14 2009
Caperea marginata	NC_005269	16383 nt	13	24	13			Dec 5 2003	Apr 15 2009
Capra hircus	NC_005044	16640 nt	13	24	13			Jul 26 2003	Jan 13 2004
Capricornis capensis	NC_012096	16453 nt	13	24	13			Feb 24 2009	Mar 5 2009
Capros aper	NC_010958	15976 nt	13	24	13			Jun 13 2008	Jun 13 2008
Capsella bursa-pastoris	NC_009270	154490 nt	89	45	134			Apr 3 2007	Oct 8 2009
Carangoides amatus	NC_004405	16556 nt	13	24	13			Nov 18 2002	Oct 18 2006
Caranx melampygus	NC_004406	16593 nt	13	24	13			Nov 18 2002	Oct 18 2006
Carapus bermudensis	NC_004373	16613 nt	13	24	13			Nov 18 2002	Jul 27 2007
Carassius auratus	NC_002079	16578 nt	13	24	13			Aug 24 1999	Jan 12 2004
Carassius auratus auratus	NC_006580	16580 nt	13	24	13			Dec 31 2004	Jan 6 2005
Carassius auratus x Cyprinus carpio	NC_006136	16580 nt	13	24	13			Aug 13 2004	Jun 22 2007
Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius curvieri	NC_006387	16581 nt	13	24	13			Nov 4 2004	Apr 5 2006
Carassius auratus x Megalobrama amblycephala pentaploid hybrid	NC_013433	16580 nt	13	24	13			Oct 22 2009	Oct 29 2009
Carassius auratus x Megalobrama amblycephala tetraploid hybrid	NC_013430	16580 nt	13	24	13			Oct 22 2009	Oct 29 2009
Carassius auratus x Megalobrama amblycephala triploid hybrid	NC_013431	16580 nt	13	24	13			Oct 22 2009	Oct 29 2009
Carassius carassius	NC_006291	16580 nt	13	24	13			Sep 17 2004	Jun 22 2007
Carassius curvieri	NC_010768	16581 nt	13	24	13			Mar 28 2008	Mar 28 2008

3. El programa nos enviará a una ventana donde se dan diversas opciones sobre la información que podemos obtener. Dar click en la casilla llamada “GenBank”.

Genome > Eukaryota > Capra hircus mitochondrion, complete genome

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

Genome Info:	Features:	BLAST homologs:	Links:	Review Info:
Refseq: NC_005044	Genes: 13	COG	Genome Project	Publications: None
GenBank: AF533441	Protein coding: 13	TaxMap	Refseq FTP	Refseq Status: Reviewed
Length: 16,640 nt	Structural RNAs: 24	TaxPlot	GenBank FTP	Seq Status: Completed
GC Content: 39%	Pseudo genes: None	GenePlot	BLAST	Sequencing center: Istituto Spallanzani, Lea- Laboratorio Epigenomica Applicata, Italy
% Coding: 68%	Others: 2	gMap	TraceAssembly	Completed: 2003/07/26
Topology: circular	Contigs: None		CDD	Organism Group
Molecule: dsDNA			Other genomes for species: 1	

4. Enseguida aparecerá la secuencia completa de DNA mitocondrial de la especie seleccionada.





GenBank AF533441.1

Capra hircus mitochondrion, complete genome

Features **Sequence**

LOCUS AF533441 16640 bp DNA circular MAM 23-JUL-2003
DEFINITION Capra hircus mitochondrion, complete genome.
ACCESSION AF533441
VERSION AF533441.1 GI:33150920
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion Capra hircus (goat)
ORGANISM [Capra hircus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
Fecora; Bovidae; Caprinae; Capra.

REFERENCE 1 (bases 1 to 16640)
AUTHORS Parma,F., Feligini,M., Greeppi,G. and Enne,G.
TITLE The complete nucleotide sequence of goat (Capra hircus)
mitochondrial genome. Goat mitochondrial genome
JOURNAL DNA Seq. 14 (3), 199-203 (2003)
FORMED [1459832](#)
REMARK Erratum:[DNA Seq. 2004 Oct-Dec;15(5-6):375. Pietro, Parma
[corrected to Parma, Pietro]; Maria, Feligini [corrected to
Feligini, Maria]; Gianfranco, Greeppi [corrected to Greeppi,
Gianfranco]; Giuseppe, Enne [corrected to Enne, Giuseppe]]

REFERENCE 2 (bases 1 to 16640)
AUTHORS Feligini,M. and Parma,F.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (29-JUL-2002) Lea- Laboratorio Epigenomica Applicata,
Istituto Spallanzani, Lodi, Italy

FEATURES
source 1..16640
/organism="Capra hircus"
/organelle="mitochondrion"
/mol type="genomic DNA"

Customize View

Sequence Analysis Tools

- ▶ BLAST Sequence
- ▶ Pick Primers

Recent activity Turn Off Clear

- NC_006853 Bos taurus mitochondrion, complete genome
- Bos taurus
- Capra hircus mitochondrion, complete genome
- NC_005044 Capra hircus mitochondrion, complete genome
- Capra hircus

» See more...

5. En este paso podemos seleccionar la secuencia de DNA mitocondrial con la que deseamos trabajar, o bien, si la secuencia ya es conocida (por ejemplo trabajar con *primers* que estén reportados en publicaciones anteriores) comprobar que corresponde a la especie deseada.



**ANEXO 2. HIDRATACIÓN DE PRIMERS**

A continuación se describe el método para la hidratación de los primers, el cual parte de la siguiente fórmula:

$$U = \frac{\text{micromoles}}{250} = 10E - 6 \text{ Litros}$$

➤ **CÁLCULOS PARA *CAPRA HIRCUS* FORWARD**

nmoles = 33.9

$$U = \frac{33.9}{1000} = 0.0339 \text{ micromoles}$$

$$U = \frac{0.0339 \text{ micromoles}}{250} = 1.356 E - 4 L$$

$$U = \frac{1.356 E - 4 L}{10 E - 6} = 135.6 \text{ microlitros de Agua Libre de Nucleasas.}$$

Por lo tanto se debe de agregar 135.6 μ L de Agua libre de Nucleasas.

➤ **CÁLCULOS PARA *CAPRA HIRCUS* REVERSE**

nmoles = 34.9

$$U = \frac{34.9}{1000} = 0.0349 \text{ micromoles}$$

$$U = \frac{0.0349 \text{ micromoles}}{250} = 1.396 E - 4 L$$

$$\frac{1.396 E - 4}{10 E - 6} = 139.6 \text{ microlitros de Agua Libre de Nucleasas.}$$

Por lo tanto se debe de agregar 139.6 μ L de Agua libre de Nucleasas.





➤ **CÁLCULOS PARA BOS TAURUS FORWARD**

nmoles = 40.4

$$U = \frac{40.4}{1000} = 0.0404 \text{ micromoles}$$

$$U = \frac{0.0404 \text{ micromoles}}{250} = 1.616 E - 4 L$$

$$\frac{1.616 E - 4}{10 E - 6} = 161.6 \text{ microlitros de Agua Libre de Nucleasas.}$$

Por lo tanto se debe de agregar 161.6 μ L de Agua libre de Nucleasas.

➤ **CÁLCULOS PARA BOS TAURUS REVERSE**

nmoles = 45.0

$$U = \frac{45.0}{1000} = 0.045 \text{ micromoles}$$

$$U = \frac{0.045 \text{ micromoles}}{250} = 1.8 E - 4 L$$

$$U = \frac{1.8 E - 4}{10 E - 6} = 180 \text{ microlitros de Agua libre de nucleasas.}$$

Por lo tanto se debe de agregar 180 μ L de Agua libre de Nucleasas.

