

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
ESCUELA DE QUÍMICA

IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE  
ADN PARA LA AUTENTICACIÓN DE CARNES MEDIANTE LA  
TÉCNICA PCR".

Presentado por:

Thania Víquez 4-763-1292

Karina González 4-765-1762

Asesor: José Renán García M., *Dr.*

Co-asesora: Mariel Monroy, *Dra.*

Co-asesora: Omar Chacón, *MSc.*

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO  
DE LICENCIADA EN QUÍMICA

Chiriquí, Panamá

2016



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**

**“IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA LA  
AUTENTICACIÓN DE CARNES MEDIANTE LA TÉCNICA PCR”.**

Presentado por:

Thania Víquez 4-763-1292

Karina González 4-765-1762

Asesor: José Renán García M., *Dr.*

Co-asesora: Mariel Monroy, *Dra.*

Co-asesora: Omar Chacón, *MSc.*

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO  
DE LICENCIADA EN QUÍMICA

Chiriquí, Panamá

2016

## DEDICATORIA

Todo trabajo realizado con esfuerzo y dedicación siempre deja sus frutos; los cuales nos enseñan que las cosas que más te cuestan son las que realmente tienen valor, y una vez las hayas terminado el sentimiento de orgullo y satisfacción es increíble.

Este proyecto es el producto de mucho esfuerzo y constancia para lograr cada uno de los objetivos propuestos en el mismo es por ello que lo dedico principalmente a Dios quien me sostiene y me hace ser quien soy, a mis padres quienes han sido el motor principal que me ha impulsado a ser mejor cada día y que me han enseñado siempre que todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

A mis hermanas y a toda mi familia quienes me han visto recorrer este camino lleno de tragos amargos pero también dulces y que me han animado a seguir a pesar de mis tropiezos.

Y finalmente a mis amigos en especial a mi compañera con quien hicimos realidad este proyecto Thania Víquez a todos aquellos que nunca me abandonaron y que a pesar del tiempo transcurrido siempre me animaron con un "wao tu tesis es increíble" esas palabras de ánimo fueron influencia suficiente para como dicen por ahí "no colgar los guantes". A todos ustedes dedico este proyecto que gracias a Dios hemos culminado.

*Karina E. González P.*

RJST 720

## DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado primeramente a Dios por haberme dado la inteligencia, paciencia y sabiduría necesaria para culminar mi carrera de manera satisfactoria.

A mi hija Leilanys que ha sido mi fuente de inspiración para seguir adelante y nunca rendirme a pesar de los obstáculos que se presentaron en el camino, por ser mi soporte y motivación.

A mis padres que me han brindado su apoyo para llegar hasta esta etapa de mi vida académica, gracias por las palabras de aliento que en algún momento me dieron y por haberme forjado como la persona que soy hoy en día.

A mis hermanos que han sido pilares muy importantes en mi vida y siempre me han brindado su apoyo incondicional, gracias por creer en mí y motivarme a cumplir con mis ideales.

A mi compañera de tesis Karina González por su valioso apoyo y amistad durante la carrera. A mis amigos y a todas aquellas personas que de una u otra manera han estado a mi lado apoyándome y lograr que este sueño se haga realidad.

*Thania M. Víquez*



## AGRADECIMIENTO

Fueron muchas las personas quienes a lo largo de toda la carrera han ejercido una influencia positiva sobre apoyándome en cada paso y decisión tomada.

Agradezco eternamente a Dios quién me acompañado en este viaje de conocimientos y proyectos que nos han hecho crecer como personas tanto en lo personal como profesional.

A mis padres y hermanas por hacerme ver las cosas siempre positivamente y no dejarme desmayar en los momentos más difíciles, porque siempre estuvieron conmigo aun en esos momentos en los cuales perdía la cabeza muchas gracias por estar siempre ahí para mí.

A mis profesores asesores por hacerme parte del centro de investigación CIBQUIA y por haber dedicado parte importante de su tiempo y de sus vidas en enseñarme y guiarme en todos lo que he necesitado para la realización de este proyecto, porque fueron muchas horas que incansablemente me apoyaron y me animaron ante los inconvenientes y errores cometidos durante la elaboración de esta tesis pero que con su ayuda realizamos satisfactoriamente.

A mis amigos y compañeros de clases muchas gracias por compartir tantas experiencias y por estar siempre ahí en cada proyecto durante estos años de estudio.

A todos ustedes muchas gracias a todos por su incansable ayuda.

*Karina E. González P.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios quien me dio la fuerza y la fe para seguir luchando en lo que algún día me parecía imposible culminar.

Mi más sincero agradecimiento va dirigido a mi asesor y director del Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA), el Dr. José Renán García por haberme dado la oportunidad de pertenecer a este centro de investigación, gracias por su paciencia, su orientación y profesionalismo. De igual manera a mi co-asesora la Dra. Mariel Monroy por la ayuda brindada durante este periodo.

A mi mayor bendición, mi hija quien es mi motivación en las adversidades que se presentan y me impulsa a superarme para ofrecerle siempre lo mejor.

A mis padres por ayudarme con mi hija mientras continuaba con mi proyecto de investigación y haberme dado el mejor regalo que se le puede brindar a un hijo, la educación. A mi familia en general por el apoyo constante, especialmente en mis años de carrera profesional.

A mis compañeros de clases que en algún momento de la carrera me brindaron su amistad sincera y desinteresada. Gracias al apoyo de cada uno de ustedes.

*Thania M. Viquez P.*

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>XIII</b>
<b>GLOSARIO DE TÉRMINOS</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XVIII</b>
<b>I. MARCO REFERENCIAL</b>	
1.1 La carne como alimento	1
1.2 Consumo de carne a nivel internacional y nacional	1
1.3 Adulteración en carnes y sus derivados	2
1.4 Autenticación de Carnes	4
1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la autenticación de carnes	6
1.5.1 Elementos determinantes para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	7
1.5.1.1 ADN molde o ADN diana	7
1.5.1.2 ADN polimerasa	8
1.5.1.3 Cebadores, partidores o primers	8
1.5.1.4 Nucleótidos libres o dNTPs	8
1.5.1.5 Denaturación del ADN molde	9
1.5.1.6 Hibridación del cebador	9
1.5.1.7 Extensión del cebador o polimerización	10
1.5.1.8 Equipo utilizado para realizar la PCR	10
<b>II. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION</b>	<b>11</b>
<b>III. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>12</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
1.6 Objetivo general	12
1.7 Objetivos específico	12
<b>V. COBERTURA</b>	<b>13</b>

<b>VI. METODOLOGÍA</b>	13
6.1 Muestras	13
6.2 Extracciones de ADN	13
6.2.1 Método propuesto por Muston, M. (2011)	14
6.2.2 Modificación del método propuesto por Muston, M. (2011)	15
6.2.3 Método de Axy Prep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®).	17
6.3 Cuantificación de ADN y pureza	18
6.4 Amplificación por PCR especies-específica.	18
6.4.1 Preparación de la mezcla de reacción	19
6.4.2 Programación del termociclador	19
6.4.3 Visualización y foto documentación de los productos de PCR	20
6.5 Optimización de las pruebas de PCR para amplificaciones a partir de ADN de muestras puras de carnes (MP).	20
6.6 Electroforesis	21
6.7 Evaluación de la capacidad de la metodología aplicada para discriminar diferentes especies en mezclas de carnes.	21
6.8 Pruebas de reacciones múltiples	22
6.9 Pruebas de sensibilidad.	24
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	25
7.1 Muestras seleccionadas.	26
7.2 Obtención y purificación de ADN.	27
7.3 Análisis de Varianza de la concentración de ADN	33
7.4 Prueba de rango múltiple para la concentración de ADN por tipo de carne (especies) y soluciones extractora	34
7.5 Pruebas y selección de partidores especie-específicos.	37
7.6 Sensibilidad de las pruebas de PCR para detectar las especies.	50



7.7 Autenticación de las especies en muestras de productos procesados.	56
7.8 Reacciones múltiples para identificar especies en productos cárnicos.	64
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>74</b>
<b>X. REFERENCIAS</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Medias de las concentraciones de ADN en los tipos de carne y el intervalo Tukey HSD al 95.0% de confianza. 36
- Figura 2. Medias de las concentraciones de ADN de acuerdo los métodos o soluciones extractoras y el intervalo Tukey HSD al 95.0% de confianza. 36
- Figura 3. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de ADN de *Bos taurus*, *Gallus gallus* y *Sus scrofa*. 40
- Figura 4. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicada a muestras puras de ADN de *Meleagris gallopavo*. 42
- Figura 5. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicada a muestras puras de ADN de *Meleagris gallopavo* y pruebas de reacciones cruzadas aplicadas a muestras de ADN de *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Sus scrofa* y *Meleagris gallopavo*. 43
- Figura 6. Prueba para selección de partidore especie específico aplicada a la muestra pura de *Meleagris gallopavo* y pruebas de reacciones cruzadas aplicadas a muestras de ADN de *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Sus scrofa*. 44
- Figura 7. Pruebas para selección de segundo grupo de

partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de <i>Bos taurus</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Sus scrofa</i> y <i>Meleagris gallopavo</i> .	45
Figura 8. Pruebas de reacciones cruzadas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de <i>Bos taurus</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Sus scrofa</i> y <i>Meleagris gallopavo</i> utilizando los nuevos partidores.	47
Figura 9. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de ADN de <i>Bos taurus</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Sus scrofa</i> y <i>Meleagris gallopavo</i> .	48
Figura 10. Prueba para selección de partidior especie específico aplicadas al par de partidores GgF30/GgR30 diseñado para identificar <i>M. gallopavo</i> .	49
Figura 11. Pruebas de sensibilidad aplicada a las muestras puras de <i>Bos taurus</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Sus scrofa</i> y <i>Meleagris gallopavo</i> con distintas cantidades de ADN.	52
Figura 12. Pruebas de sensibilidad aplicada a las muestras puras de <i>Bos taurus</i> , <i>Gallus gallus</i> y <i>Sus scrofa</i>	53
Figura 13. Prueba de sensibilidad aplicada a la muestras pura de <i>Sus scrofa</i> .	54
Figura 14. Prueba realizada en diferentes productos procesados de la localidad utilizando 2 $\mu$ L de ADN.	59
Figura 15. Prueba realizada en diferentes productos	60

procesados de la localidad utilizando 4  $\mu$ L de ADN.

Figura 16. Prueba de detección de ADN de *Bos taurus*, *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo* para muestras C y F utilizando 4  $\mu$ L de ADN. 61

Figura 17. Prueba realizada en diferentes productos procesados de la localidad utilizando 4  $\mu$ L de ADN. 62

Figura 18. Prueba realizada en diferentes productos procesados de la localidad utilizando 5  $\mu$ L de ADN 63

Figura 19. Pruebas multiplex aplicadas a las muestras puras de ADN de *Bos taurus* y *Meleagris gallopavo* con sus partidores especie específicos. 65

Figura 20. Pruebas multiplex aplicadas a las muestras puras de ADN de *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Sus scrofa* y *Meleagris gallopavo* con sus partidores especie específicos. 66

Figura 21. Reacciones múltiples RM3 y RM4 para identificar especies en muestras de ADN de productos procesados con contenidos cárnicos. 72

Figura 22. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Sus scrofa* y *Meleagris gallopavo*. 75

Figura 23. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de ADN de *Bos*



*taurus, Gallus gallus, Sus scrofa y Meleagris gallopavo.* 76

Figura 24. Prueba de enzimas IBI e INVITROGEN con partidores especie-específicos en ADN de *Bos taurus, Gallus gallus, Sus scrofa y Meleagris gallopavo.* 77

Figura 25. Comprobación la capacidad de polimerización de enzimas polimerasas empleadas de diferentes marcas comerciales y pruebas de soluciones amortiguadoras para las reacciones adicionando Mg en forma de  $MgCl_2$  78

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones amortiguadoras de extracción utilizadas en la modificación de la metodología propuesta por Muston, M. (2011).	16
Tabla 2. Componentes presentes en cada tubo de reacción con la cantidad a utilizar.	19
Tabla 3. Cantidad a utilizar de cada reactivo para llevar a cabo las pruebas multiplex en muestras puras y productos procesados.	23
Tabla 4. Concentraciones finales de ADN utilizadas en las pruebas de sensibilidad	24
Tabla 5. Muestras puras utilizadas para el estudio.	26
Tabla 6. Muestras procesadas utilizadas para el estudio.	26
Tabla 7. Cuantificación de ADN y pureza de las muestras de <i>Bos taurus</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Sus scrofa</i> y <i>Meleagris gallopavo</i> por el Método referido por el Kit de extracción Axy Prep Multi source Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®). (Primer Grupo)	30
Tabla 8. Cuantificación de ADN y pureza de las muestras de <i>Bos taurus</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Sus scrofa</i> y <i>Meleagris gallopavo</i> por el Método referido por el Kit de extracción Axy Prep Multi source Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®).(Segundo Grupo)	30

Tabla 9. Cuantificación de ADN y pureza de muestras comerciales por el método referido por el Kit de extracción Axy Prep Multi source Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®).	31
Tabla 10. Cuantificación de ADN de muestras puras por espectrometría UV utilizando los métodos A y B modificados referido por Muston, M. (2011).	32
Tabla 11. Análisis de Varianza de la concentración de ADN.	33
Tabla 12. Resultados de la prueba de rango múltiple para las concentraciones de ADN por tipo de carne y soluciones extractoras (Method: 95.0 percent Tukey HSD).	35
Tabla 13. Selección de partidores especie-específicos	38
Tabla 14. Resultados de sensibilidad aplicada a las pruebas de PCR.	55
Tabla 15. Identificación de especies en los contenidos cárnicos de los productos procesados.	58
Tabla 16. Pruebas para establecer las reacciones múltiples.	67
Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos con reacciones independientes y reacciones múltiples.	71

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**ADN molde o ADN diana.** Es el DNA a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, el ADN que queremos amplificar.

**ADN polimerasa Taq.** Es una enzima que deriva su nombre de la bacteria *Thermus aquaticus*, de la cual fue aislada por primera vez, es termoestable (Saiki, et al. 1988). Esta enzima es probablemente la más utilizada a efectos de la PCR y es capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde.

**Amplicón.** Es una pieza de ADN o ARN que es la fuente o el producto de los eventos de amplificación o replicación naturales o artificiales. Se puede formar usando varios métodos incluyendo reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), o la duplicación de genes natural.

**Amplificación.** Es un aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular

**Autenticación.** Es el proceso para el establecimiento o confirmación de algo (o alguien) como real.

**Cebadores, partidores o primers.** Son oligonucleótidos o pequeños fragmentos de ADN complementarios al ADN que se va a amplificar (templado o molde). Estos se unen a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN.

**Denaturación del ADN molde.** Etapa de la PCR en la cual, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C por un tiempo determinado.



**Especificidad.** Se refiere a la obtención de un solo producto amplificado. Viene determinada por los oligos y la especificidad con la que se unen al ADN molde. De esta forma, si los oligos tienen más de un sitio al que se pueden unir aparecerá más de un producto amplificado.

**Extensión del cebador o polimerización.** Etapa de la PCR en donde la ADN Taq polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde.

**Fidelidad.** Se refiere a los errores que comete la ADN polimerasa durante la amplificación.

**Gen.** Es una región de ADN que codifica un producto de ARN o proteína funcional, y es la unidad molecular de la herencia.

**Genoma.** Es el conjunto de genes contenidos en los cromosomas, lo que puede interpretarse como la totalidad de la información genética que posee un organismo o una especie en particular.

**Hibridación del cebador.** Es la fase, en que los cebadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria.

**Nucleótidos libres o dNTPs.** Son los substratos que las enzimas ADN polimerasas van utilizar para sintetizar una nueva cadena de ADN a partir de una cadena molde, incorporándolos al extremo 3' libre del cebador, que se ha unido a la cadena molde.

**PCR Múltiple.** Es la PCR en la cual se amplifica simultáneamente más de una secuencia. Para ello, se combinan dos o más pares de cebadores en un mismo

tubo, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes, para amplificar simultáneamente varios segmentos de ADN.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.

**Secuenciación.** Es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

**Sensibilidad.** Se refiere a la cantidad mínima de ADN necesaria para que se produzca la amplificación es decir para obtener una banda. Se relaciona con los falsos negativos, ya que puede que una muestra sea positiva pero sea dada como negativa porque no se ha amplificado por no tener suficiente cantidad de ADN.

**La sensibilidad analítica (o límite de detección).** Se define como la cantidad más pequeña de copias que puede detectarse y distinguirse a partir de un resultado cero

**TITULO**  
**IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA LA**  
**AUTENTICACIÓN DE CARNES MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR**

**Resumen**

El fraude alimenticio es un tema de relevancia mundial. Por ello la autenticación de productos cárnicos es imprescindible en los procesos de control de las exportaciones e importaciones, donde cada gobierno toma las directrices necesarias. Sin embargo, los métodos empleados para determinar si un tipo de carne es el que dice ser, varían de región a región, pero todos tienen el mismo objetivo y es ratificar que el alimento en mano sea realmente el esperado, previniendo así posibles problemas legales ya sea por razones religiosas, médicas y demás que son ocasionadas por un etiquetado incorrecto o por un fraude alimenticio debido al costo de las carnes. En este estudio se implementó la PCR convencional para la autenticación de carnes, para lo cual se realizó extracción de ADN utilizando un kit y un método tradicional con dos soluciones extractoras, determinando que la solución extractora A realizaba mejores extracciones de ADN que la B. Se cuantificó y se determinó la pureza de ADN para luego proceder a realizar PCR. El primer paso de esta técnica fue la selección de partidores especie-específicos que identificaron las cuatro especies estudiadas además realizamos ensayos de sensibilidad a los mismos en el cual se logró la detección de concentraciones bajas de ADN siendo el partidor de *G. gallus* el de mayor sensibilidad detectando hasta 0,0001ng/μL seguido por el de pavo a 0,0005ng/μL. también se ensayaron reacciones múltiples en donde se seleccionó la RM3 y RM4 como óptimas para aplicarlas en productos procesados. Se autenticaron 16 productos cárnicos obtenidos del comercio local y se comparó el contenido de su etiqueta con el los resultados obtenidos de la identificación de especies presentes dando como resultado que 9 de estas presentaban adulteración, en la mayoría de los casos por adición de gallina. De esta manera se logró desarrollar un método sencillo, confiable y económico que nos permita una fácil extracción de ADN, que garantice la pureza del mismo, haciéndolo óptimo para la aplicación de la técnica de PCR, la cual, nos permitió conocer la verdadera identidad de la carne analizada determinando rápidamente si un producto está adulterado o no.

a establecer un estimado del consumo de carnes en nuestro país, ya que no contamos con las cifras exactas del consumo de carnes a nivel nacional.

### **1.3 Adulteración en carnes y sus derivados**

La adulteración de diferentes alimentos es un problema que afecta principalmente a los consumidores; sin embargo el sector productivo no escapa de esta realidad, ya que la industria procesadora puede comprar materia prima de menor calidad y la transforma haciéndola pasar como de buena calidad, ocasionando una competencia desleal (Hernández et al., 2007).

La adulteración de los productos cárnicos, pueden ocurrir tanto en productos frescos como en procesados; según (Hargin, 1996), un alimento no auténtico es aquel que no es de la sustancia natural y calidad demandada por el consumidor. Este autor considera que un alimento está adulterado cuando se da una completa o parcial omisión de los constituyentes de alto valor, total o parcial sustitución con componentes alimenticios de menor calidad o valor económico, y adición de materiales o sustancias no declaradas en la etiqueta, con el fin de incrementar el peso o volumen del producto. En el caso de la carne, la autenticidad se centra en la identificación de la especie, ya que existen grandes diferencias de precio de acuerdo a ésta (Cota y Vallejo, 1997), (Hernández et al., 2007). Es por ello que la mayor cantidad de adulteraciones se dan al sustituir una especie por otra de menor calidad y que en algunos casos no son consumidas por la población.

El fraude alimentario es uno de los temas más controversiales a nivel mundial en los últimos años; registrándose una serie de hechos de adulteración de carnes, siendo uno de los más recientes el caso documentado en febrero del 2013 en Francia, donde se vendió carne de caballo como carne de res por la empresa Spanghero (Smith, 2013). Un caso similar en el mismo año se registró en China en donde más de 900 personas fueron detenidas por fraudes con alimentos, entre ellos la venta de ratas y zorros presentados como carne vacuna o de oveja, lo cual

indicó el Ministerio de Seguridad Pública de ese país, publicado por la página de internet de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). A su vez también podemos mencionar el caso de la Food Safety Authority of Ireland (FSAI) quien el 15 de enero de 2013 hizo público los resultados de un estudio sobre la autenticidad de diversos productos cárnicos, en los que se reflejaba la presencia de ADN de caballo en hamburguesas de carne de vacuno congeladas que se vendieron en varios supermercados irlandeses. De las 27 hamburguesas de carne de vacuno congeladas que se analizaron, el 37% dio positivo en cuanto a ADN de caballo. Una de las hamburguesas de carne de vacuno analizadas contenía un 29% de carne de caballo. Estas hamburguesas estaban etiquetadas como si fuesen de carne de vacuno, y no de caballo.

La FSAI descubrió lo que finalmente resultó ser un problema paneuropeo de productos de vacuno adulterados en muchos de los Estados Miembros. Estos hallazgos dieron lugar a extensas investigaciones que condujeron a la retirada de millones de hamburguesas y comidas preparadas de supermercados de toda Europa. Es por ello que las autoridades reguladoras de Europa realizan programas de seguimiento y vigilancia rutinarios para controlar los alimentos que se encuentran en el mercado y garantizar que cumplen los requisitos de la legislación alimentaria, y que su consumo es seguro (EUFIC, 2013).

El mal etiquetado, la adición de sustancias aditivas que enmascaran el producto real mediante la presencia de especies no declaradas, la sustitución de los animales por proteínas vegetales y etiquetado incorrecto, de modo que el origen real del mismo no sea el expuesto por el producto; es uno de los problemas más graves a los que se enfrentan los consumidores hoy en día. Por lo cual, se hace de imprescindible importancia la existencia de regulaciones nacionales e internacionales que permitan una inspección rápida y eficiente de los productos exportados e importados a nivel mundial con métodos óptimos, garantizando la fiabilidad del producto cárnico comercializado y el derecho de los consumidores (Kitpipit, Sittichan, Thanakiatkrai, 2014).

La elección de un producto por parte del consumidor puede afectar diversos ámbitos como el religioso, la salud y el estilo de vida (Ballin, 2010). 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, Zaragoza, Osta, 2001).

#### **1.4 Autenticación de carnes**

Los productos cárnicos son aquellos que han sido sometidos a un proceso de curado y/o maduración a fin de modificar sus características organolépticas y de conservación. Para ello se someten a procesos de secado, molido, emulsificación, adición de sales y condimentos, cambios de color o una combinación de ellos. Se pueden clasificar en productos sin picar, donde destaca el jamón y el pollo ahumado y, en productos picados o embutidos. El procesado de la materia prima como lo es la carne ya sea de res, cerdo o pollo es el proceso fundamental por medio del cual llega el producto final a la mesa de cada familia. Sin embargo, un paso anterior a esto es el paso del animal vivo al producto procesado que se logra por medio de los mataderos (FAO-PRODAR, 2014). Para disponer de las especies cárnicas es necesario criar de forma adecuada los animales y sacrificarlos en mataderos adecuados.

En Panamá existen veinticuatro mataderos que cuentan con las instalaciones y equipo necesario para operar y elaborar productos solamente en el mercado interno. Todos estos mataderos cuentan con inspección sanitaria y están registrados en el Departamento de Protección de Alimento (DEPA) del Ministerio de Salud. Existen muchos otros mataderos locales que cuentan con instalaciones precarias o denominadas “Planchas de Matanza”, donde se sacrifican animales para consumo local, pero que carecen de las condiciones elementales de sanidad. Solamente los mataderos modernos cuentan con el equipo e instalaciones apropiadas para procesar subproductos no comestibles, entre los cuales están la



carnarina y el cebo industrial esto según la Unidad Regional de (OIRSA, 2011). Es necesario dar un seguimiento desde el origen del alimento hasta llegar al consumidor, con el fin de evitar las adulteraciones y garantizar la autenticidad de los diferentes productos.

La autenticación de carnes se realiza para evitar prácticas fraudulentas como: la sustitución de especies de alto valor por otras de precio inferior en productos alimenticios, la verificación de los porcentajes de cada especie declarados en el etiquetado y la detección de especies no autorizadas (Kitpipit, Sittichan, Thanakiatkrai, 2014). Para la identificación de diferentes especies cárnicas donde desaparecen las características morfológicas que facilitan su identificación es necesaria la aplicación de técnicas modernas.

Año tras año se han ido desarrollando diversas metodologías que permiten una identificación del tipo de carnes presentes en una muestra, de modo que se pueda llevar un control del tipo de alimentos que el consumidor adquiere. Se han utilizado diferentes herramientas como los sistema de trazabilidad que es el seguimiento de un alimento desde su origen hasta que llega al consumidor de manera que se evite la adulteración después del sacrificio dándole un seguimiento a cada una de las cabezas de ganado que han sido trazados. Estos sistemas de trazabilidad son a nivel molecular y han sido estudiados profundamente con el objeto de reducir a un mínimo la adulteración de las especies cárnicas (Chávez et al., 2005).

Los métodos analíticos convencionales más utilizados en la identificación de especies animales en productos cárnicos incluyen diversas técnicas basadas en el análisis de las proteínas, como las electroforéticas, cromatográficas, espectroscópicas e inmunológicas (Ballin, 2010). Las cuales tienen sus limitaciones en cuanto a equipo, calibración, especificidad de los que se quiere realizar y pérdida de la molécula estudiada por desnaturalización térmica. Sin embargo, las técnicas genéticas como la PCR constituyen una herramienta eficaz para la detección e identificación de especies animales en los alimentos.



En la actualidad, estas técnicas genéticas constituyen una de las alternativas más específicas para llevar a cabo la diferenciación de especies animales (Rojas, González, Martín de Santos, 2009). Las técnicas genéticas aplicadas a la identificación de especies se basan, en su mayoría, en la amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y en la posterior utilización de técnicas complementarias como la secuenciación (PCR-secuenciación) o el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Fajardo, 2009).

### **1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la autenticación de carnes**

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Además su misión es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines (Tamay de Dios, Ibarra, Velasquillo, 2013). Una de las ventajas más sobresalientes es la mínima cantidad de muestra requerida para el análisis, la especificidad y rapidez del mismo (Fajardo, 2009).

Para la realización de la técnica de PCR se debe contar con la presencia de ADN de las especies puras que se van a estudiar, para lo cual se requiere de la utilización de una técnica de extracción eficaz que garantice un ADN en óptimas condiciones para las reacciones posteriores. Contar con una técnica efectiva para el proceso de extracción de ADN es un paso crítico en todos los estudios de genética molecular. Contar con protocolos rápidos, fiables y de bajo costo para la extracción de ADN resulta siempre deseable (Kesmen, Sahin, Yetim, 2007).

El ADN puede ser extraído de muchos tipos de materiales biológicos y el éxito del análisis molecular depende de su adecuado aislamiento en términos de cantidad, calidad y pureza; es necesario separarlo del resto de componentes celulares así como del material no biológico que pueda estar presente. (Cummings, 1994). Los protocolos de extracción buscan eliminar o diluir potentes inhibidores de reacciones de amplificación que eviten o dificulten análisis posteriores (Liu y Cordes, 2004).

Existen diferentes tipos de PCR que son aplicados en la actualidad por laboratorios dedicados a la investigación y estudio del ADN, como la PCR in situ, la PCR multiplex, la PCR estándar y otras más que proveen diferentes maneras de análisis dependiendo del caso en estudio que se realice (Bermingham y Luetlich, 2003).

Con el surgimiento de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se formó una verdadera revolución en la biología tanto en la investigación volcada a la comprensión de procesos biológicos como en las áreas aplicadas incluyendo estudios genéticos, diagnóstico y mejora (Mullis y Faloona, 1987).

### **1.5.1 Elementos determinantes para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

#### **1.5.1.1 ADN molde o ADN diana**

Es el DNA a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, el ADN que queremos amplificar. La probabilidad de que la amplificación del ADN tenga éxito va a depender del número de ejemplares del ADN molde. La cantidad total de ADN utilizada normalmente para la PCR está entre 0,05 y 1,0 µg, lo que

permite la detección de ejemplares solos de la secuencia diana (Somma y Querci, S.F.).

### **1.5.1.2 ADN polimerasa**

La enzima ADN polimerasa Taq, que deriva su nombre de la bacteria *Thermus aquaticus*, de la cual fue aislada por primera vez, es termoestable (Saiki et al., 1988). Esta enzima es probablemente la más utilizada a efectos de la PCR y es capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) o sulfato de magnesio  $MgSO_4$  (Somma y Querci, S.F.).

### **1.5.1.3 Cebadores, partidores o primers**

Conocidos como cebadores, partidores o primers, son oligonucleótidos o pequeños fragmentos de ADN complementarios al ADN que se va a amplificar (templado o molde). Estos se unen a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN (Cortazar Martínez, Silva Rincón, 2004). Las enzimas ADN polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de ADN; por lo tanto son necesarios los partidores entre 10 y 30 bases de ADN de cadena sencilla y son los que van a delimitar el fragmento a amplificar.

### **1.5.1.4 Nucleótidos libres o dNTPs**

Nucleótidos libres son los substratos que las enzimas ADN polimerasas van utilizar para sintetizar una nueva cadena de ADN a partir de una cadena molde, incorporándolos al extremo 3' libre del cebador, que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato

(dNTPs). Estos cuatro componentes son los elementos básicos que es necesario incorporar a la reacción para que se complete una PCR (Pérez de Castro, S.F.).

Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: denaturación del ADN molde, hibridación del cebador y extensión del cebador.

#### **1.5.1.5 Denaturación del ADN molde**

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta la temperatura será mayor (Tamay de Dios, Ibarra, Velasquillo, 2013) debido a que estas bases poseen tres puentes de hidrógeno por cada apareamiento en vez de dos como en el caso de A-T. De esta manera se rompen los fuertes puentes de H y aumenta el número de bases desapareadas, separando las cadenas sin romper las uniones entre las bases de la cadena madre y complementaria; además este proceso de desnaturalización depende del tipo de disolvente, de la concentración salina y del pH utilizado (Somma y Querci, SF.). Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas o monohebras que servirán como templado para el siguiente paso.

#### **1.5.1.6 Hibridación del cebador**

En esta fase, los cebadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. La temperatura óptima de hibridación para que se forme el complejo templado-cebadores oscila entre 50-60°C. Cuando se han introducido unas cuantas bases, el enlace iónico entre el ADN molde y el cebador es tan fuerte que ya no se rompe (Somma y Querci, S.F.). Si el diseño de los cebadores es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente (Tamay de Dios, Ibarra, Velasquillo, 2013).

### **1.5.1.7 Extensión del cebador o polimerización**

La tercera etapa donde ocurre la reacción enzimática de polimerización se efectúa a una temperatura de 72°C. La ADN Taq polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Cortazar Martínez, Silva Rincón, 2004).

### **1.5.1.8 Equipo utilizado para realizar la PCR**

El proceso de PCR se lleva a cabo en un equipo conocido como termociclador, el cual está diseñado para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Estos equipos deben tener la capacidad de cambiar las temperaturas rápidamente entre una etapa y otra y mantenerlas en forma estable por el tiempo que se programa. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa (obtenidos a través de una electroforesis) para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios, Ibarra, Velasquillo, 2013).

## II. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La seguridad alimentaria es un tema de interés para todo consumidor. El tener la certeza de que los alimentos consumidos no han sido adulterados es una de las preocupaciones que va en aumento en los últimos años. La sustitución de carnes de una especie por otra de menor calidad y que en algunos casos no son consumidas normalmente por la población, son eventos que se han ido incrementando alrededor del mundo. Los altos costos de algunas especies es una de las principales causas por el cual los vendedores alteran los contenidos cárnicos, sobre todo en aquellas que no conservan las características morfológicas de los músculos, es decir que han sido molidas. Es en este caso donde ocurre el mayor riesgo de adulteración (Linares, Alomar, Gallo, 2012).

Algunas razones por las cuales la autenticación de carnes se hace necesaria son: proporcionar al consumidor la seguridad de que lo que consume es en realidad la especie deseada evitando así el fraude, además de razones religiosas en las cuales no les es permitido el consumo de algunas carnes como el cerdo; y razones de salud (Méndez et al., 2011). También, se puede adicionar el derecho básico que tiene el consumidor de tener la certeza de lo que consume.

La calidad de los productos de origen animal, incluyendo su autenticidad es importante y una exigencia que cada día es más solicitada por parte de los consumidores modernos, los cuales, ejercen presión sobre los entes gubernamentales a fin de que se les garantice la calidad de los mismos, hacen de la autenticación de los mismos una herramienta eficaz para verificar la calidad de los productos (Linares, Alomar, Gallo, 2012).

Es por ello la importancia de la implementación de técnicas de extracción como purificación e identificación del ADN. De manera que se pueda discriminar entre los distintos ADN estudiados. Para así responder a la gran interrogante ¿Qué metodología de extracción de ADN nos permite la implementación de técnicas



moleculares basadas en PCR para autenticar las carnes de mayor consumo en nuestro país?

### III. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

La implementación de técnicas moleculares basadas en PCR permite autenticar carnes entre las especies de bovino (*Bos t. taurus*; *Bos t. indicus*), aviar (*Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo*) y porcino (*Sus scrofa domestica*).

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

- Implementar metodologías de extracción de ADN para autenticar carnes de diferentes especies mediante la técnica de PCR.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Implementar metodologías para la extracción de ADN a partir de muestras de carnes.
- Seleccionar la metodología de extracción de ADN más adecuada mediante la evaluación de la rapidez de extracción, calidad y concentración de ADN.
- Establecer la eficacia del método de extracción seleccionado.
- Aplicar la técnica de PCR para discriminar entre muestras de carne de bovino (*B. taurus*; *B. indicus*), aviar (*G. gallus* y *M. gallopavo*) y porcino (*S. scrofa domestica*).
- Evaluar la capacidad de la técnica de discriminar entre los géneros de procedencia de las muestras de carnes.

- Definir un protocolo para la autenticación de carnes basados en parámetros tales como sensibilidad, facilidad de ejecutar, rapidez, confiabilidad y costos.

## V. COBERTURA

Esta investigación forma parte del proyecto “Autenticación de carnes basada en secuencias específicas de ADN” que desarrolla el CIBQUIA en una de sus líneas de investigación. El proyecto se llevó a cabo con el apoyo del CIBQUIA en materiales, equipos y reactivos. Los aspectos a cubrir corresponden a una temática de inocuidad alimentaria de interés nacional y mundial, y pretende establecer una metodología que permita la autenticación de las carnes de mayor consumo en nuestro país.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 Muestras

Muestras de carnes de diferentes especies y de procedencia conocida se denominaron “muestras puras” (MP). Las mismas se obtuvieron del comercio local teniendo certeza de la especie. Dentro de las muestras se ensayaron carnes de bovino (*B. taurus*; *B. indicus*), aviar (*G. gallus* y *M. gallopavo*) y porcino (*S. scrofa domestica*).

### 6.2 Extracciones de ADN

Para todos los casos de MP se extrajo ADN mitocondrial y/o genómico, por diferentes métodos, entre los que se detallan:

- Modificación del método propuesto por Muston (2011)



- Método referido por el Kit de extracción Axy Prep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®).

Cabe mencionar que debido al elevado tamaño del fragmento amplificado (795 pb), el método Muston (2011) está indicado para analizar productos crudos o curados. Sin embargo, no sería aplicable para el análisis de productos sometidos a tratamientos de procesamiento más intensos como los empleados para la obtención de patés, estofados y conservas donde el ADN está muy degradado (Fajardo et al., 2006; 2008).

### **6.2.1 Método propuesto por Muston, M. (2011)**

1. Se molieron las muestras de carne en nitrógeno líquido con mortero y pistilo. El material pulverizado resultante se utiliza para aislar ADN.
2. Se mezclaron aproximadamente 300 mg de tejido pulverizado con 5 mL de solución amortiguadora de extracción A (Tris – HCl 100mM (pH = 9.0), NaCl 100mM, EDTA 5mM, SDS al 1% y proteinasa K (10mg/mL) 30uL). Incubar a 65°C durante 2 horas.
3. Se extrajo la mezcla anterior dos veces con un volumen igual de fenol / cloroformo (1:1) y dos veces con un volumen igual de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1).
4. Se precipitaron los ácidos nucleicos con isopropanol y degradar el ARN aplicando 100 µg/ml de ribonucleasa A durante 1 hora a 37 °C.
5. Se purificó el ADN mediante extracciones dobles sucesivas con fenol / cloroformo y cloroformo / alcohol isoamílico, respectivamente. Precipitando con isopropanol enfriado con hielo y lavar dos veces con etanol al 70%.
6. Se secó el sedimento finamente y se re suspendió en 100 µl de ddH<sub>2</sub>O.
7. Se utilizó las soluciones de ADN para evaluar el rendimiento, la pureza y la integridad del ADN.

## 6.2.2 Modificación del método propuesto por Muston (2011)

### Método A

1. Aproximadamente 2g se mezclaron con nitrógeno líquido en un mortero y pistilo. El material pulverizado resultante se utilizó para aislar ADN.
2. Se mezcló aproximadamente 100 mg de tejido pulverizado con 500  $\mu$ l de solución amortiguadora de extracción A (Tabla 1). Incubamos a 65°C durante 2 horas.
3. Se extrajo la mezcla anterior dos veces con un volumen igual de cloroformo / alcohol isoamílico (24: 1).
4. Se adicionó 500  $\mu$ l de etanol frío al 100% y 20  $\mu$ l de acetato de sodio. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C.
5. Se centrifugó a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Se descartó el líquido con cuidado y se lavó dos veces con etanol al 70%.
6. Se procedió a secar el sedimento finamente a 50 °C y se re suspendió en 100  $\mu$ l de agua ultrapura.
7. Se utilizaron las soluciones de ADN para evaluar el rendimiento, la pureza y la integridad del ADN.

### Método B

1. Se molieron las muestras de carne en nitrógeno líquido con mortero y pistilo. El material pulverizado resultante se utilizó para aislar ADN.
2. Se mezcló aproximadamente 100 mg de tejido pulverizado con 500  $\mu$ l de solución amortiguadora de extracción B (Tabla 1). Se incubó a 65°C durante 2 horas.
3. Se extrajo la mezcla anterior dos veces con un volumen igual de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1).
4. Se adicionó 500  $\mu$ l de etanol frío al 100% y 20  $\mu$ l de acetato de sodio. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

5. Se centrifugó a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Se descartó el líquido con cuidado y se lavó dos veces con etanol al 70%.
6. Se procedió a secar el sedimento finamente a 50 °C y se re suspendió en 100 µl de agua ultrapura.
7. Se utilizaron las soluciones de ADN para evaluar el rendimiento, la pureza y la integridad del ADN.

**Tabla 1.** Soluciones amortiguadoras de extracción utilizadas en la modificación de la metodología propuesta por Muston, M. (2011)

Reactivo	Concentración final	Solución A	Solución B
Tris - HCl	100 mM	0.8g	0.8g
NaCl	100mM	0.3g	0.3g
EDTA	5mM	1.5g	1.5g
CTAB	1%	---	1.82g
Agua ultrapura		50mL	50mL

### **6.2.3 Método de Axy Prep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®).**

#### **Lisis y homogenización**

1. Se maceró 1g del tejido animal rápida y vigorosamente con 5000  $\mu$ L de PBS. Se recogió 350  $\mu$ l del homogenizado y se añadió 0,9  $\mu$ l de RNasa A.
2. Se adicionó 20  $\mu$ L de Proteinasa K y 150  $\mu$ L de Buffer C-L. Se mezcló inmediatamente en el vórtex por 1 minuto.
3. Se incubó a 56°C por 15 minutos. Se centrifugó brevemente para quitar gotas del interior de la tapa.
4. Se añadió 350  $\mu$ L de buffer P-D y se mezcló por agitación a toda velocidad durante 30 segundos.
5. Se centrifugó a 12000xg por 10 minutos a temperatura ambiente para sedimentar los restos celulares.

#### **Fijación del ADN y lavado en la columna de mini preparación**

6. Se colocó una columna Miniprep en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se pipeteó el sobrenadante clarificado obtenido del paso 7 en la columna de la Miniprep y se centrifugó durante 1 minuto a 12000xg.
7. Se descartó el filtrado del tubo de micro centrífuga de 2 ml. Se colocó la columna de Miniprep de nuevo en el tubo de micro centrífuga de 2 ml. Se pipeteó 500 $\mu$ L de buffer W1 a la columna de Miniprep y se centrifugó a 12.000 xg durante 1 minuto.
8. Se descartó el filtrado y se colocó la columna de Miniprep de nuevo en el tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se adicionó 700  $\mu$ L de buffer W2 y se centrifugó durante 1 minuto a 12.000xg. Se desechó el filtrado desde el tubo de microcentrífuga de 2 ml y se repitió este paso de lavado con una

segunda alícuota de 700  $\mu$ L de buffer W2. Es necesario asegurarse que el etanol se ha adicionado en el concentrado de solución Buffer W2.

9. Se descartó el filtrado desde el tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se colocó la columna de Miniprep de nuevo en el tubo de microcentrífuga de 2 ml y se centrifugó durante 1 minuto a 12000xg.

### **Elución del ADN de la columna de mini preparación**

10. Se transfirió la columna Miniprep en un tubo de micro centrifuga de 1,5 mL limpio. Para eluir el ADN genómico, añadimos 100-200 $\mu$ L de eluyente en el centro de la membrana. Se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 1 minuto a 12.000xg.

### **6.3 Cuantificación de ADN y pureza**

La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro modelo GENESYS 10S, serie 245R05914S, fabricante Thermo Scientific. La concentración de ADN se determinó por medición de la absorbancia en la región UV a 260nm (se utilizó como equivalencia 1 unidad de absorbancia corresponde a 50ng/ $\mu$ L de dsDNA o doble hebra). La pureza de las muestras extraídas fue establecida por la relación 260nm/280nm.

### **6.4 Amplificación por PCR especies-especifica.**

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando los reactivos, polimerasa y metodología modificada propuesta por (Kit de PCR marca Invitrogen®).

#### 6.4.1 Preparación de la mezcla de reacción:

1. Cada tubo de reacción contendrá los componentes indicados en la Tabla 2.
2. Se agitó en agitador mecánico (vortex) y se centrifugó brevemente para unificar la muestra en la parte inferior.

**Tabla 2.** Componentes presentes en cada tubo de reacción con la cantidad a utilizar.

Componentes	Volumen
10X PCR Buffer, sin Mg	1.25 $\mu$ l
10 mM dNTP (mezcla)	1.0 $\mu$ l
50 mM de MgCl <sub>2</sub>	1.0 $\mu$ l
Mezcla de cebadores ( a una concentración de 10 $\mu$ M)	3.0 $\mu$ l
ADN molde	2.0 $\mu$ l
Taq ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.13 $\mu$ l
Agua ultra pura libre de nucleasas	Completar a 12.5 $\mu$ l

#### 6.4.2 Programación del termociclador:

3. Las condiciones de temperatura, tiempos y ciclos del termociclador se establecieron como sigue a continuación:

Denaturación inicial	Denaturación	Hibridación	Elongación	Extensión Final
94°C	94°C	55°C	72°C	72°C
5min	45s	30-60s	90s	5-10min
25-30 ciclos				

Ajustes o variaciones de temperatura y tiempo: Las temperaturas de alineamiento para los diferentes partidores fueron modificados de acuerdo a sus respectivas temperaturas de fusión (T<sub>m</sub>). Igualmente los periodos de polimerización se

ajustaron de acuerdo a las longitudes de los fragmentos esperados en cada reacción de PCR.

#### **6.4.3 Visualización y foto documentación de los productos de PCR**

4. Los productos de PCR fueron visualizados como resultado de la electroforesis en un gel de agarosa con las muestras y marcadores de ADN adecuados de acuerdo a los fragmentos esperados. Cada gel debidamente corrido por electroforesis fue documentado debidamente con un código derivado de la fecha en la cual se realizó y almacenado sin modificación alguna, como respaldo del experimento. Esta actividad es esencial para el correcto registro de los experimento y esencial para demostrar los resultados.

#### **6.5 Optimización de las pruebas de PCR para amplificaciones a partir de ADN de muestras puras de carnes (MP).**

Las MP fueron procesadas con el método de extracción de ADN seleccionado. Las pruebas de PCR fueron realizadas de acuerdo al protocolo descrito previamente, donde los partidores para estas pruebas fueron proporcionadas por referencias de trabajos previos, del CIBQUIA y algunos fueron diseñados en este trabajo. Las combinaciones de partidores se probaron contra las muestras para las cuales se diseñaron y posteriormente se practicaron pruebas de especificidad para evaluar reacciones cruzadas. Una vez seleccionados los partidores específicos sobre los distintos tipos de carnes (MP), se procedió a probarlos con las mezclas y algunos productos del mercado local.

## **6.6 Electroforesis**

Esta técnica fue aplicada después de la extracción de ADN para verificar la calidad y cantidad de ADN (Rotureau et al., 2006). La electroforesis de ácidos nucleicos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN y ARN. En los tampones habitualmente utilizados, los ácidos nucleicos están cargados negativamente y migran hacia el ánodo. Cada molécula aporta una carga negativa (procedente del grupo fosfato), por lo que la relación carga/tamaño es prácticamente constante e idéntica para todas las moléculas, independientemente de su tamaño (un nucleótido tendrá la misma movilidad que un fragmento de doble cadena de 800pb o uno de 5kb) (Aljanabi, 1997).

Se llevó a cabo en geles de agarosa cuyos porcentajes fueron ajustados entre 0.8% y 2% dependiendo del tamaño esperado en las reacciones de PCR o si la muestra proviene de una extracción de ADN.

Como solución amortiguadora se utilizó una solución 1X de tris-HCL, ácido acético y EDTA (solución TAE) a partir de una solución madre TAE 50X.

Los marcadores moleculares para evaluar los tamaños amplificados fueron provistos por Axigen 100bp, Novagen 1000pb, entre otros. La solución amortiguadora de carga fue empleada de acuerdo a las especificaciones que acompañan a cada marcador. El equipo de electroforesis comprendido por las cámaras y fuente de poder fueron Bio Rad-midium.

## **6.7 Evaluación de la capacidad de la metodología aplicada para discriminar diferentes especies en mezclas de carnes.**

En esta evaluación se tomó en consideración distintas mezclas de carnes y se probó la capacidad de la metodología para discriminar carnes de derivadas de



diferentes especies. En el procedimiento se seleccionó el mejor método para realizar la extracción de ADN, el cual, sirvió de molde para las pruebas de PCR. Cada mezcla se realizó por triplicado y por cada PCR se realizó el blanco correspondiente así como los controles positivos. Para estas pruebas se diseñaron hojas de evaluación que permiten establecer la eficiencia de identificación de la técnica.

### **6.8 Pruebas de reacciones múltiples**

1. Se seleccionaron los partidores compatibles tomando en consideración el tamaño de los amplicones cuyo criterio de selección es que los cebadores que generan amplicones de tamaños cercanos no van juntos en la prueba.
2. Para probar los conjuntos de partidores seleccionados se realizaron pruebas de reacción múltiple con ADN de muestras puras siendo la cantidad utilizada de este 2  $\mu$ l.
3. Se calcularon las cantidades de los demás reactivos a utilizar para la PCR con un volumen total de 12.5  $\mu$ l
4. Se realizaron las mismas pruebas ya con los conjuntos de partidores seleccionados utilizando ADN de muestras procesadas para, lo cual se utilizó una cantidad de 4  $\mu$ l de la misma.
5. Se calcularon las cantidades de los demás reactivos necesarios para la PCR con un volumen final de 12.5  $\mu$ l tal como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cantidad a utilizar de cada reactivo para llevar a cabo las pruebas multiplex en muestras puras y productos procesados.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	
	Muestras puras	Productos procesados
10X PCR Buffer, sin Mg	1.25	1.25
10mM dNTP (mezcla)	1.0	1.0
50 mM de MgCl <sub>2</sub>	1.0	1.0
Mezcla de cebadores ( a una concentración de 10 $\mu$ M)	3.0	4.8
ADN molde	2.0	4.0
Taq ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.13	0.13
Agua ultra pura libre de nucleasas	4.12	0.3
<b>Volumen final</b>	<b>12.5 <math>\mu</math>l</b>	<b>12.5 <math>\mu</math>l</b>

6. De esta manera se generaron pruebas de reacciones múltiples a las que cuales se les llamó RM1, RM2, RM3, RM4, RM5 y RM6.
7. La PCR se realizó utilizando los correspondientes partidores específicos y de acuerdo a las siguientes condiciones:

Denaturación inicial	Denaturación	Hibridación	Elongación	Extensión Final
95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
5min	45s	45s	1min	10min
30 ciclos				

## 6.9 Prueba de sensibilidad

1. Con el ADN de las muestras puras de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo* se realizaron cuatro diluciones con su control positivo.
2. Las concentraciones iniciales de las muestras fueron *B. taurus* 49,0 ng/ $\mu$ L, *G. gallus* 31,6 ng/ $\mu$ L, *S. scrofa* 27,9 ng/ $\mu$ L y *M. gallopavo* 59,7 ng/ $\mu$ L.
3. En la Tabla 4 se muestra las concentraciones finales en los tubos de reacción de PCR en las cuales se ensayó la sensibilidad de las pruebas para cada especie.

**Tabla 4.** Concentraciones finales de ADN utilizadas en las pruebas de sensibilidad.

		Concentración de ADN en el tubo de reacción (ng/ $\mu$ L)				
Grupo A	<i>B. taurus</i>	8.0	0.10	0.01	0.001	0.0001
	<i>G. gallus</i>	6.0	0.10	0.01	0.001	0.0001
Grupo B	<i>S. scrofa</i>	4.4	0.05	0.005	0.0005	0.00005
	<i>M. gallopavo</i>	10.0	0.05	0.005	0.0005	0.00005

## **7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 7.1 Muestras seleccionadas

Las muestras fueron seleccionadas como se describe previamente en la metodología, correspondiendo a dos grupos, el primero conformado por muestras puras (MP), con las cuales se calibraron y optimizaron las condiciones para los análisis (Tabla 5). Con las condiciones optimizadas un segundo grupo de muestras correspondientes a productos cárnicos procesados, fueron muestreadas en el comercio local, codificadas y consideradas para aplicarles las pruebas de identificación de especies (Tabla 6).

Tabla 5. Muestras puras utilizadas para el estudio.

Muestra	Especie
1	Res ( <i>B. taurus</i> )
2	Gallina ( <i>G. gallus</i> )
3	Cerdo ( <i>S. scrofa</i> )
4	Pavo ( <i>M. gallopavo</i> )

Tabla 6. Muestras procesadas utilizadas para el estudio.

Cant.	ID	Producto	Contenido cárnico descrito en la etiqueta
1	A	Chorizo	Gallina y pavo
2	B	Chorizo parrillero	Res, cerdo y pavo
3	C	Salchicha	Pavo
4	D	Jamón de pierna	Cerdo
5	E	Hamburguesa	Res
6	F	Hamburguesa	Res
7	G	Bologña	Gallina
8	H	Salchicha ahumada	Res y Cerdo
9	I	Jamonilla	Cerdo
10	J	Jamón de pierna	Cerdo
11	K	Salchichón	Res, cerdo y pavo
12	L	Salchichas cocktail	Gallina y/o pavo
13	M	Salchichas	Gallino y pavo
14	N	Mortadela	Gallina y res
15	O	Salchicha enlatada	Res
16	P	Jamonilla	Gallina

## 7.2 Obtención y purificación de ADN

La obtención del ADN se realizó de dos formas, la primera siguiendo la metodología descrita por el kit de extracción Axy Prep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®), cuya cuantificación y verificación de pureza fue realizada por espectrofotometría obteniendo los valores descritos en la tabla 7 y 8 para muestras puras y la tabla 9 para muestras procesadas. La segunda utilizando dos versiones modificadas de la metodología de Muston, (2011) denotadas como método A y método B (Tabla 10) aplicados a muestras puras. La diferencia entre el método A y B, está en la solución extractora en el cual la solución extractora A tenía los mismos componente que el B exceptuando el CTAB presente en dicha solución B.

La concentración y pureza con ambos métodos de extracción fue buena ya que estos valores se encontraban dentro del rango requerido de 1.7 – 2,0 el cual se midió por la relación 260nm/280nm en donde 260nm es la  $\lambda$  de máxima absorción de ADN y 280nm es la  $\lambda$  de máxima absorción de proteínas y fenol (Rodríguez, 2004). En el caso de la concentración cuando la longitud de la celda donde se disuelve el ADN es de 1 cm la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO) en el caso del ADN una densidad óptica equivale a 50 ng /  $\mu$ L. Sin embargo realizando una comparación entre ambos métodos pudimos determinar que tanto el método Muston, (2011) como el kit de extracción presentan ventajas y desventajas al momento de realizar una extracción.

### Ventajas del Kit de extracción

- 1- Esta extracción se realiza en menos de 3 horas dependiendo del número de muestras, en comparación con el Muston, (2011) que demora aproximadamente 2 días.
- 2- El protocolo a seguir es fácil de ejecutar.
- 3- La calidad y concentración de ADN extraído es buena.

## Ventajas del método modificado del Muston, (2011)

- 1- La extracción por muestra en cuanto a precio es más barato ya que al utilizarse bajas cantidades los reactivos utilizados permiten realizar un sin número de extracciones en comparación con el kit este solamente cuenta con reactivos para realizar 50.
- 2- La calidad y concentración de ADN extraído es buena.

Se compararon los resultados de extracción de esta investigación con algunos trabajos de investigación como el de Rodríguez, (2004), en el cual, utilizan 4 métodos de extracción aplicados a especies animales. Se utilizaron 2 kit los cuales fueron el Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food y el Wizard® DNA Clean-up también se utilizaron dos métodos tradicionales el Método De Desalle y col., (1993) y el Método De Desalle y col., (1993) modificado.

Sus resultados mostraron que en los dos métodos tradicionales obtuvieron una pureza entre 1.6 -1.8 mientras que en solo uno de los kit se obtuvo una pureza buena.

En el caso de la concentración solamente los kit presentaron una buena concentración. Cabe destacar que todos los ADN extraídos con estos 4 métodos estaban degradados y solamente uno de los métodos tradicionales registró amplificación.

Lo cual comparado con nuestros resultados se puede decir que la extracción utilizando tanto el kit de extracción Axy Prep Multi source Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®) como el método modificado de Muston, (2011) son efectivos en muestras cárnicas y no mostraron estar degradados.

De igual manera tomamos como referencia el trabajo de Mafra, (2008), donde se realizaron extracciones de ADN empleando cuatro métodos: NucleoSpin, GeneSpin, CTAB y Wizard, de los cuales, tres metodologías consistían en el uso de kits comerciales el NucleoSpin y GeneSpin y el Wizard donde se utilizan

columnas y resinas. Para los métodos NucleoSpin y GeneSpin de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que eran equivalentes, con menores cambios como el tiempo de lisis de incubación 30-60 min a 65 °C en ambos kits. De los cuatro métodos utilizados con NucleoSpin y GeneSpin se obtuvo mayor concentración de ADN, mientras que con el método del CTAB concentraciones menores. Con el método Wizard se obtuvieron concentraciones bajas para algunas de las extracciones realizadas. Con estos métodos se obtienen relaciones  $A_{260} / A_{280}$  mayores a 1.6 para la mayoría de las muestras. Comparando las metodologías que empleamos: Axy Prep Multi source Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®) y el método modificado de Muston, (2011), se observa claramente que son eficientes al igual que los expuestos por Mafra (2008), donde la concentración fue mayor en los kits NucleoSpin y GeneSpin y la pureza fue buena al aplicar los cuatro métodos.



Tabla 7. Cuantificación de ADN y pureza de las muestras de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo* por el Método referido por el Kit de extracción Axy Prep Multi source Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®). (Primer grupo)

	ADN	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Abs 260/ Abs 280	[ng/ $\mu$ L]
1	<i>B. taurus</i>	1.161	0.613	1.9	58.05
2	<i>G. gallus</i>	0.725	0.380	1.9	36.25
3	<i>S. scrofa</i>	1.202	0.536	2.2	60.01
4	<i>M. gallopavo</i>	1.193	0.658	1.8	59.65

Tabla 8. Cuantificación de ADN y pureza de las muestras de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo* por el Método referido por el Kit de extracción Axy Prep Multi source Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®). (Segundo grupo)

	ADN	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Abs 260/ Abs 280	[ng/ $\mu$ L]
1	<i>B.taurus</i>	0.980	0.508	1.9	49.0
2	<i>G. gallus</i>	0.632	0.325	1.9	31.60
3	<i>S. scrofa</i>	0.558	0.294	1.9	27.90
4	<i>M. gallopavo</i>	1.193	0.658	1.8	59.65

Tabla 9. Cuantificación de ADN y pureza de muestras comerciales por el método referido por el Kit de extracción Axy Prep Multi source Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen®).

Muestras	Contenido que indica la etiqueta	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Abs 260/ Abs 280	[ng/ $\mu$ L]
1	<i>Gallina y pavo</i>	1.063	0.549	1.9	53.15
2	<i>Res, cerdo y pavo</i>	0.683	0.346	1.9	34.15
3	<i>Pavo</i>	0.728	0.399	1.8	36.40
4	<i>Cerdo</i>	0.546	0.276	1.9	27.30
5	<i>Res</i>	0.710	0.372	1.9	35.50
6	<i>Res</i>	0.647	0.357	1.8	32.35
7	<i>Gallina</i>	0.620	0.332	1.9	31.0
8	<i>Res y cerdo</i>	1.039	0.528	1.9	51.95
9	<i>Cerdo</i>	2.329	1.246	1.9	116.45
10	<i>Cerdo</i>	1.654	0.852	1.9	82.70
11	<i>Res, cerdo y pavo</i>	1.320	0.680	1.9	66.0
12	<i>Gallina y/o pavo</i>	- 0.078	- 0.050	1.6	3.9
13	<i>Gallina y pavo</i>	- 0.081	- 0.049	1.6	4.05
14	<i>Res y gallina</i>	- 0.088	- 0.081	1.1	4.4
15	<i>Res</i>	- 0.091	- 0.069	1.3	4.55
16	<i>Gallina</i>	0.497	0.276	1.8	24.85

Tabla 10. Obtención y Cuantificación de ADN utilizando los método A y B modificados referido por Muston, (2011).

Especies	Método A				Método B			
	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	260/280	[ng/ $\mu$ L]	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	260/280	[ng/ $\mu$ L]
<b><i>Bos taurus</i></b>								
1	0.680	0.465	1.5	34.0	1.060	0.460	2.3	53.0
2	0.984	0.570	1.7	49.2	1.456	0.647	2.3	72.8
3	2.104	1.258	1.7	105.2	2.183	1.183	1.8	109.2
4	2.474	1.346	1.8	123.7	2.001	0.983	2.0	100.1
5	1.431	0.825	1.7	71.6	1.187	0.639	1.9	59.4
6	1.428	0.875	1.6	71.4	1.271	0.700	1.8	63.6
<b><i>Gallus gallus</i></b>								
1	1.447	0.619	2.3	72.4	0.864	0.359	2.4	43.2
2	0.654	0.319	2.1	32.7	1.475	0.758	1.9	73.8
3	2.208	1.034	2.1	110.4	1.091	0.614	1.8	54.6
4	2.341	1.328	1.8	117.1	1.312	0.874	1.5	65.6
5	2.353	1.126	2.1	117.7	0.808	0.455	1.8	40.4
6	1.911	0.904	2.1	95.6	0.985	0.756	1.3	49.3
<b><i>Sus scrofa</i></b>								
1	1.152	0.835	1.4	57.6	0.109	0.089	1.2	5.5
2	0.780	0.425	1.8	39.0	0.391	0.200	2.0	19.6
3	0.748	0.387	1.9	37.4	0.471	0.226	2.1	23.6
4	1.713	0.942	1.8	85.7	0.412	0.270	1.5	20.6
5	0.993	0.594	1.7	49.7	0.277	0.118	2.3	13.9
6	0.812	0.519	1.6	40.6	0.320	0.144	2.2	16.0
<b><i>Meleagris gallopavo</i></b>								
1	0.643	0.682	0.9	32.2	0.851	0.422	2.0	42.6
2	2.817	1.724	1.6	140.9	1.049	0.524	2.0	52.5
3	2.571	1.358	1.9	128.6	1.000	0.598	1.7	50.0
4	2.823	1.709	1.7	141.2	0.625	0.360	1.7	31.3
5	1.851	0.965	1.9	92.6	0.838	0.572	1.5	41.9
6	2.851	1.560	1.8	142.6	0.714	0.458	1.6	35.7

### 7.3 Análisis de Varianza de la concentración de ADN.

Al grupo de datos obtenidos de la cuantificación de ADN utilizando el método modificado de Muston, (2011) se les aplicó un análisis estadístico.

Para determinar si los métodos de extracción (A y B modificados referido por Muston, M. (2011)) tienen o no un efecto significativo en la concentración de ADN extraído (variable dependiente), se realizó un análisis de varianza. Mediante el ANOVA se determinó si había o no diferencias significativas entre las medias a diferentes niveles de los factores y si había o no interacciones entre los factores (Tabla 11, ANOVA).

Tabla 11. Análisis de Varianza de la concentración de ADN.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Mínimo cuadrado	Valor de F	Valor p
Efectos principales					
A:Tipo de carne	15575.2	3	5191.74	7.83	<b>0.0003</b>
B:Solucion Ext	15060.9	1	15060.90	22.70	<b>0.0000</b>
Interacciones					
AB	7596.03	3	2532.01	3.82	<b>0.0170</b>
Residuo	26535.2	40	663.38		
TOTAL (Corregido)	64767.4	47			

(Todos los valores de F están basados en las medias de los errores mínimos cuadrados RMSE)

Dado que los valores de  $p < 0.05$ , hay diferencias significativas en las concentraciones de ADN entre los tipos de carne (especies) y entre las soluciones extractoras a un nivel de confianza del 95.0%. Como se puede observar en la interacción de los factores (el efecto de un factor depende del nivel de otro factor, ósea los dos factores influyen en la concentraciones de ADN ya que hay interacción entre los factores).

#### **7.4 Prueba de rango múltiple para la concentración de ADN por tipo de carne (especies) y soluciones extractoras.**

Para determinar las medias que fueron significativamente diferentes se aplicó una prueba de comparación múltiple. En la Tabla 12 (parte A.) se muestran los grupos homogéneos, señalados con la letra X. Los que tienen la "X" en la misma columna son iguales (no existen diferencias estadísticamente significativas), como el caso entre *B. taurus*, *G. gallus* y *M. gallopavo*, a diferencia de *S. scrofa*. El método que se utilizó para discriminar entre los medias fue la prueba de Tukey (HSD). En la Tabla 12, (parte B), se muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco indica los pares con diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95.0%. Mostrándose que *S. scrofa* con cualquiera de las especies resulta significativamente diferente. También, se pueden confirmar los resultados obtenidos en el ANOVA de que existe diferencia significativa dependiendo de la solución extractora que se utilice (Tabla 12, C y D.). Por lo cual se puede inferir que la extracción de ADN a partir de las muestras de *S. scrofa* resulta más compleja y que con la solución extractora A se obtienen mayores concentraciones de ADN.

Tabla 12: Resultados de la prueba de rango múltiple para las concentraciones de ADN por tipo de carne y soluciones extractoras (Method: 95.0 percent Tukey HSD). **A.** Por tipo de carne (especies). **B.** Contrastes entre tipos de carne. **C.** Por soluciones extractoras. **D.** Contrastes entre soluciones extractoras.

**A.**

Tipo de carne	Cantidad	LS Mean	LS Sigma	Grupos homogéneos
<i>S. scrofa</i>	12	34.09	7.43517	X
<i>G. gallus</i>	12	72.72	7.43517	X
<i>B. taurus</i>	12	76.09	7.43517	X
<i>M. gallopavo</i>	12	77.65	7.43517	X

**B.**

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>B. taurus</i> - <i>G. gallus</i>		3.37917	28.1873
<i>B. taurus</i> - <i>M. gallopavo</i>		-1.55417	28.1873
<i>B. taurus</i> - <i>S. scrofa</i>	*	<b>42.0042</b>	28.1873
<i>G. gallus</i> - <i>M. gallopavo</i>		-4.93333	28.1873
<i>G. gallus</i> - <i>S. scrofa</i>	*	<b>38.625</b>	28.1873
<i>M. gallopavo</i> - <i>S. scrofa</i>	*	<b>43.5583</b>	28.1873

\* Indica una diferencia estadística significativa.

**C.**

Solucion Ext	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
"Sol. Ext. B"	24	47.425	5.25746	X
"Sol. Ext. A"	24	82.8521	5.25746	X

**D.**

Contraste	Sig.	Difference	+/- Limits
"Sol. Ext. A" - "Sol. Ext. B"	*	<b>35.4271</b>	15.0271

\* Indica una diferencia estadística significativa.

LS Sigma: Es el error estándar estimado de la media de mínimos cuadrados.

Diferencia: Es la diferencia entre las dos medias de mínimos cuadrados.

Límites: Es un estimador de intervalo de esa diferencia, usando el procedimiento seleccionado de múltiples comparaciones

Para visualizar los resultados presentados en la Tabla 12 se muestran los gráficos de medias de la solución extractoras y las concentraciones de ADN en las diferentes especies de carne con sus intervalos de Tukey HSD al 95.0% de confianza Figuras 1 y 2. En los cuales, se distingue que hay diferencias entre las concentraciones de ADN que se obtienen de las diferentes especies *B. taurus*, *G. gallus* y *M. gallus* con la *S. scrofa*, además las diferencias entre las soluciones extractoras.

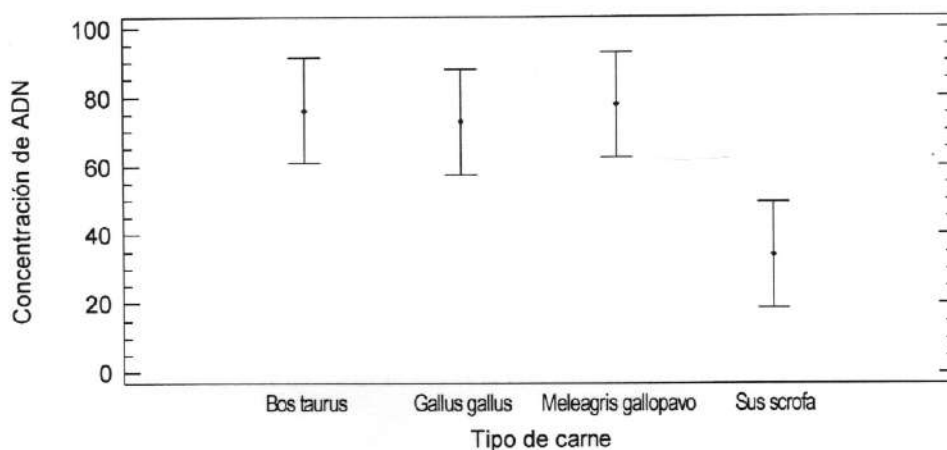


Figura 1. Medias de las concentraciones de ADN en los tipos de carne y el intervalo Tukey HSD al 95.0% de confianza.

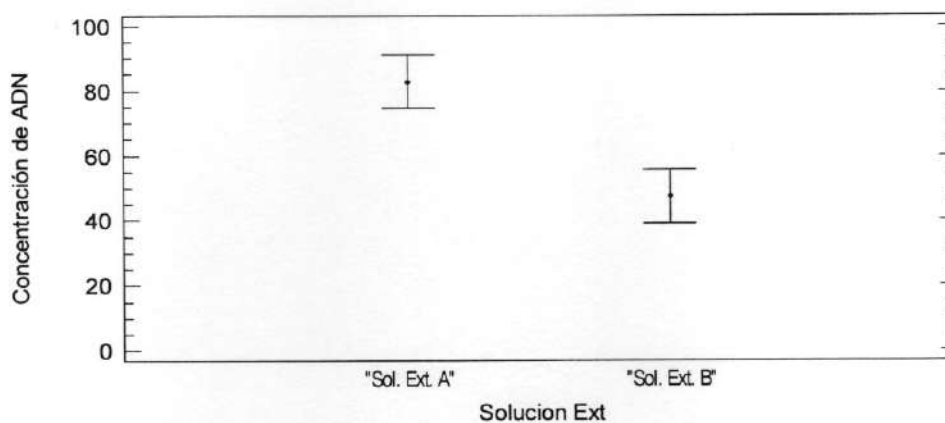


Figura 2. Medias de las concentraciones de ADN de acuerdo los métodos o soluciones extractoras y el intervalo Tukey HSD al 95.0% de confianza.



## 7.5 Pruebas y selección de partidores especie-específicos

Un total de 13 partidores diseñados en el CIBQUIA, fueron probados para identificar las especies de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo* (Tabla 13 y Figuras 3 a 10), inicialmente fueron probados en un primer grupo (Grupo 1) con ocho pares de partidores y posteriormente en un segundo grupo (Grupo2) con los cinco pares restantes. El propósito de las pruebas fue establecer las condiciones de PCR optimizadas y determinar partidores específicos para cada especie. Las condiciones de PCR se modificaron hasta establecer las mejores y los pares de partidores con las características deseadas, es decir que los partidores especie específicos cumplieron el requisito de no reconocer otras especies o generar reacciones cruzadas contra muestras cárnicas de especies puras (Figura 9 y 10, Tabla 13). Durante el proceso de selección de partidores fue necesario emplear el segundo grupo de partidores ya que se descartaron del primer grupo aquellos que producían resultados no específicos o reacciones cruzadas (Tabla 13).

Al utilizar una PCR convencional la forma de visualizar los productos de estos es mediante un gel de agarosa, es por ello la importancia de que los partidores seleccionados amplifiquen tamaños de fragmentos diferentes por menos de 100 a 200 pb entre uno y otro demarera que se puedan observar con claridad en el gel, sin embargo, utilizando otro tipo de PCR como lo es el PCR en tiempo real no es necesario que los partidores identifique fragmentos con tamaños tan diferentes ya que la cuantificación del producto de PCR se realiza al mismo tiempo que la amplificación tal como se presenta en Rodriguez, (2004) en donde utilizaron fragmentos de 96 y 120 pb, lo cual, son muy cercanos y pudieron identificarlos debido que que utilizaban un PCR de mayor capacidad. Sin embargo, en cada uno de estos dos caso la especificidad del partidore es primordial para realizar una identificación de especies siendo la característica principal del mismo que solamente amplifique en la especie para la cual fue diseñado.

Los partidores diseñados amplificaban fragmentos de cada una de las especies específicamente del ADN mitocondrial , como el caso reportado por Rojas, 2008 donde se identificaron aves de diferentes especies, amplificando el gen

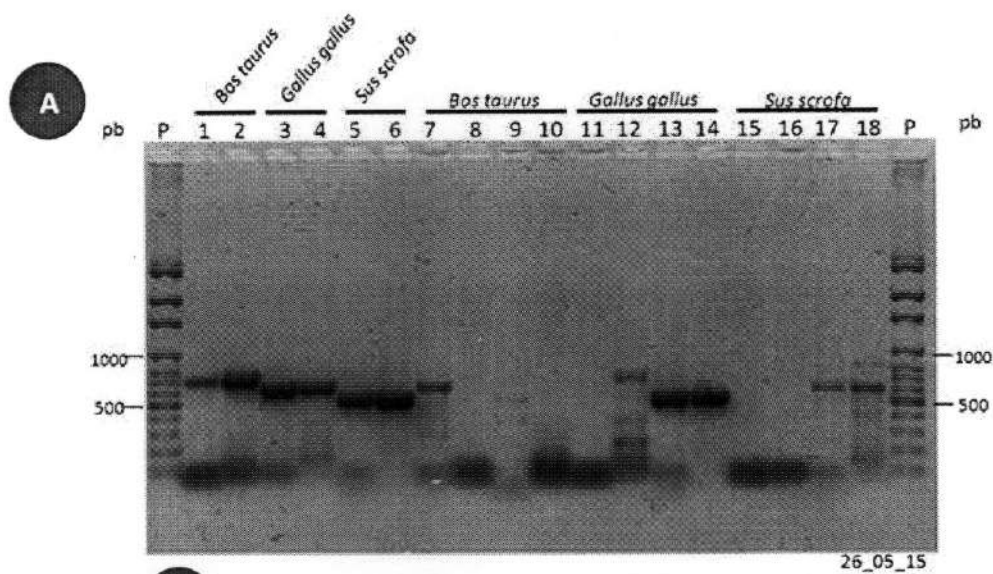
mitocondrial 12S ARNr, donde se realizaban la extracción y autentificaban de distintos productos comerciales como pates, productos picados y demas.

Tabla 13: Selección de partidores especie-específicos.

Especies	Partidores Probados					Figura que respalda la prueba
	ID-CIBQUIA	Amplicón esperado (pb)	Grupo	Especie-especifico		
				Sí	NO	
<i>B. taurus</i>	Bt1F/Bt1R	700	1	•		3
	Bt8F/Bt8R	700	1		•	3,4
	BtF19/BtR19	713	2	•		8 - 9
<i>G. gallus</i>	GgF3/GgR3	600	1		•	3,4
	GgF6/GgR6	600	1		•	3,4
	GgF20/GgR20	618	2		•	8 - 9
	GgF30/GgR30	618	2	•		10
<i>S. scrofa</i>	SsF6/SsR6	500	1		•	3,4
	SsF8/SsR8	500	1		•	3,4
	SsF21/SsR21	458	2	•		8
<i>M. gallopavo</i>	Mg1F/Mg1R	450	1	•		5- 6
	Mg3F/Mg3R	450	1		•	5
	MgF28/MgR28	529	2	•		8 - 9

Los partidores diseñados para las muestras de carne de bovino (*B. taurus*), gallina (*G. gallus*) y porcino (*S. scrofa*) amplificaron específicamente los tamaños esperados, 700, 600 y 500 pares de bases (pb) respectivamente (Figura 3). El partidor Bt1F/Bt1R que fue diseñado específicamente para la identificación de *B. taurus*, no amplifica en las muestras de *G. gallus* y *S. scrofa*, ya que no se observa la presencia de ninguna banda en el carril 11 y 15; sin embargo el partidor

Bt8F/Bt8R amplificó en *G. gallus* como se observa en el carril 12. Los partidores Gg3F/Gg3R y Gg6F/Gg6R fueron diseñados específicamente para amplificar en la región de 600 pb en muestras de *G. gallus*; sin embargo, el par de partidores Gg3F/Gg3R amplifica tanto en la muestra de *B. taurus*, como en la de *S. scrofa*, carril 7 y 17 respectivamente y el par de partidores Gg6F/Gg6R amplificó en la muestra de *S. scrofa* como se observa en el carril 18. En cuanto a los partidores diseñados para la identificación de *S. scrofa* Ss6F/Ss6R y el Ss8F/Ss8R a 500 pb de igual manera se observan reacciones cruzadas, el partidor Ss6F/Ss6R amplifica tanto en *B. taurus* carril 9 como en *G. gallus* carril 13 y el partidor Ss8F/Ss8R amplifica en *G. gallus* carril 14 (Figura 3). Para el primer grupo y de acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 3, el único partidor especie-específicos fue el Bt1F/Bt1R (Tabla 13).



**B**

		Muestras		
		<i>Bos taurus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Sus scrofa</i>
Partidores	Bt1F/Bt1R	1 (700pb)	11	15
	Bt8F/Bt8R	2 (700pb)	12	16
	Gg3F/Gg3R	7	3 (600pb)	17
	Gg6F/Gg6R	8	4 (600pb)	18
	Ss6F/Ss6R	9	13	5 (500pb)
	Ss8F/Ss8R	10	14	6 (500pb)

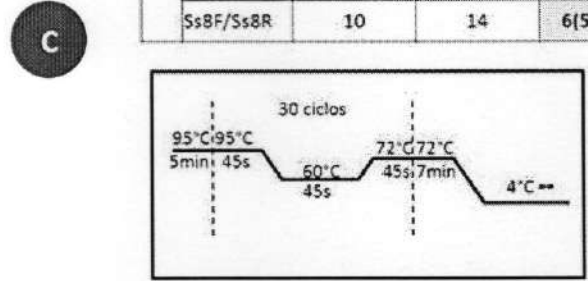
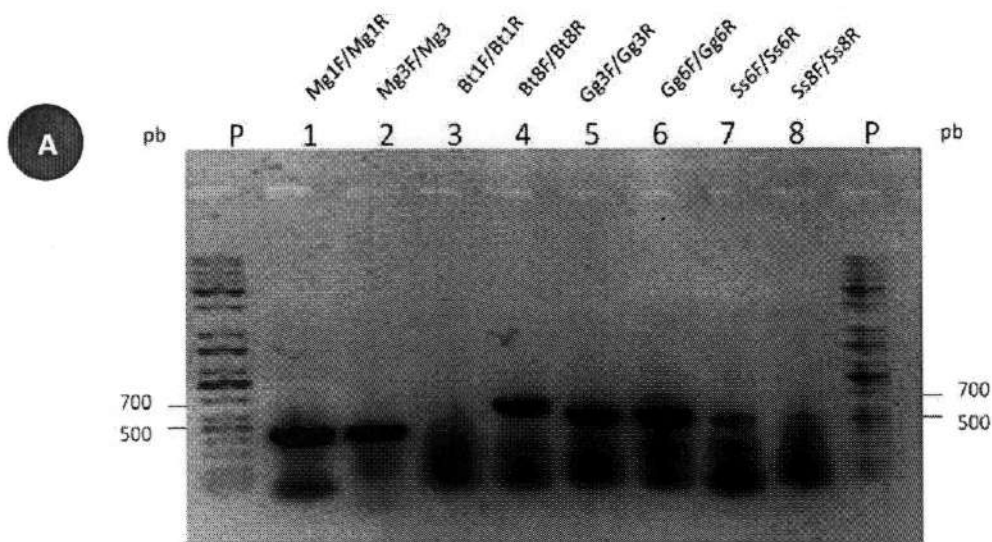


Figura 3. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de ADN de *B. taurus*, *G. gallus* y *S. scrofa*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados, muestras de ADN por especies y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento.

Otras pruebas de partidores fueron realizadas empleando ADN de *M. gallopavo*. Los partidores Mg1F/Mg1R y Mg3F/Mg3R amplificaron el fragmento esperado (450pb). En este experimento también se verificó si los partidores diseñados para otras especies distintas de *M. gallopavo*, amplificaban usando como molde este ADN. Al probar los partidores Bt8F/Bt8R, Gg3F/Gg3R Gg6F/Gg6R y Ss6F/Ss6R, amplificaron con el ADN de *M. gallopavo*; mientras que el Bt1F/Bt1R y Ss8F/Ss8R no mostraron amplificación (Figura 4), confirmando de esta manera que el partidador Bt1F/Bt1R permite discriminar entre las muestras utilizadas. Posteriormente se efectuó las pruebas específicas y de reacciones cruzadas con los partidores de *M. gallopavo*, obteniéndose que el partidador Mg1F/Mg1R fue especie-específico para la identificación de la muestra de pavo (Figura 5 y 6), ya que no se observó ninguna amplificación en las muestras de ADN de las otras especies. Sin embargo el partidador Mg3F/Mg3R amplificó en las demás muestras utilizadas, por lo que se descarta para trabajos donde se requiera especificidad (Figura 5 y Tabla 13).

Una vez realizadas las diferentes pruebas con el primer grupo de partidores se obtuvieron dos pares de partidores específicos, el Bt1F/Bt1R y el Mg1F/Mg1R para la identificación de carne de res y pavo, respectivamente.

Un segundo grupo de partidores fue proporcionado por parte del Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA). Su evaluación, se inició realizando pruebas específicas solamente, es decir cada partidador con la muestra pura (MP) para la cual fue diseñado. Los resultados fueron los esperados, ya que el par de partidores BtF19/BtR19 amplificó a 713 pb en la muestra de *B. taurus*, el par partidores GgF20/GgR20 a 618 pb, el SsF21/SsR21 a 458pb y el MgF28/MgR28 a 529 pb, para las muestras de *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo*, respectivamente (Figura 7).



17\_06\_15

**B**

Partidores	ADN
Mg1F/Mg1R	Meleagris gallopavo 1 (450 pb)
Mg3F/Mg3R	2 (450 pb)
Bt1F/Bt1R	3
Bt8F/Bt8R	4
Gg3F/Gg3R	5
Gg6F/Gg6R	6
Ss6F/Ss6R	7
Ss8F/Ss8R	8

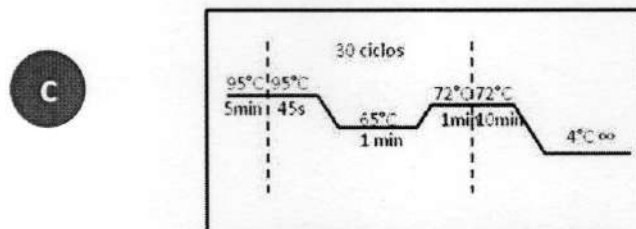
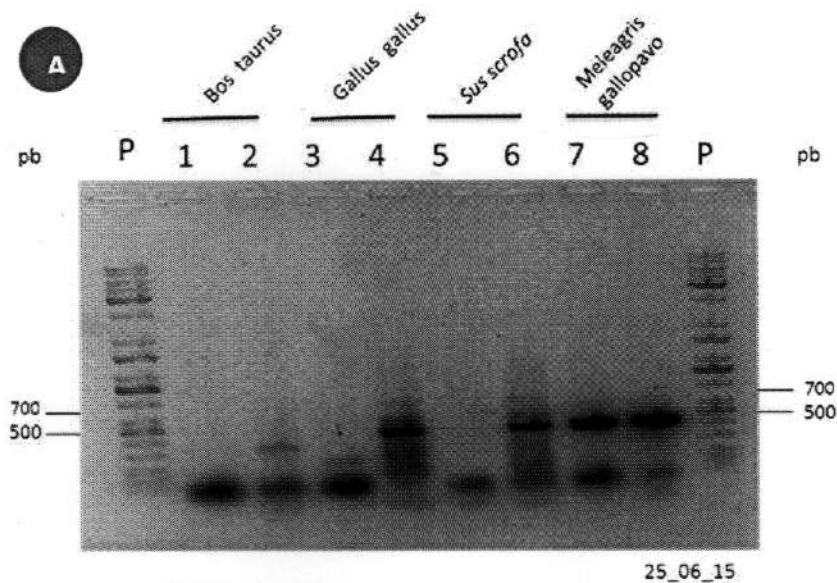


Figura 4. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicada a muestras puras de ADN de *M. gallopavo*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados para identificar muestras de ADN de *M. gallopavo* y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.





**B**

		Partidores	
		Mq1F/Mq1R	Mq3F/Mq3R
Muestras	<i>Bos taurus</i>	1	2
	<i>Gallus gallus</i>	3	4
	<i>Sus scrofa</i>	5	6
	<i>Meleagris gallopavo</i>	7 (450 pb)	8 (450 pb)

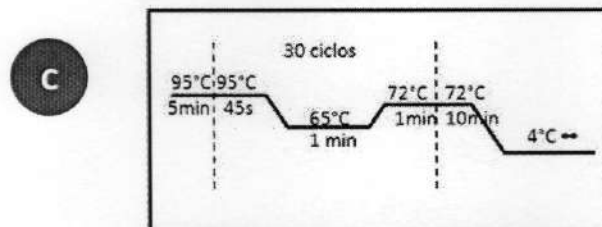
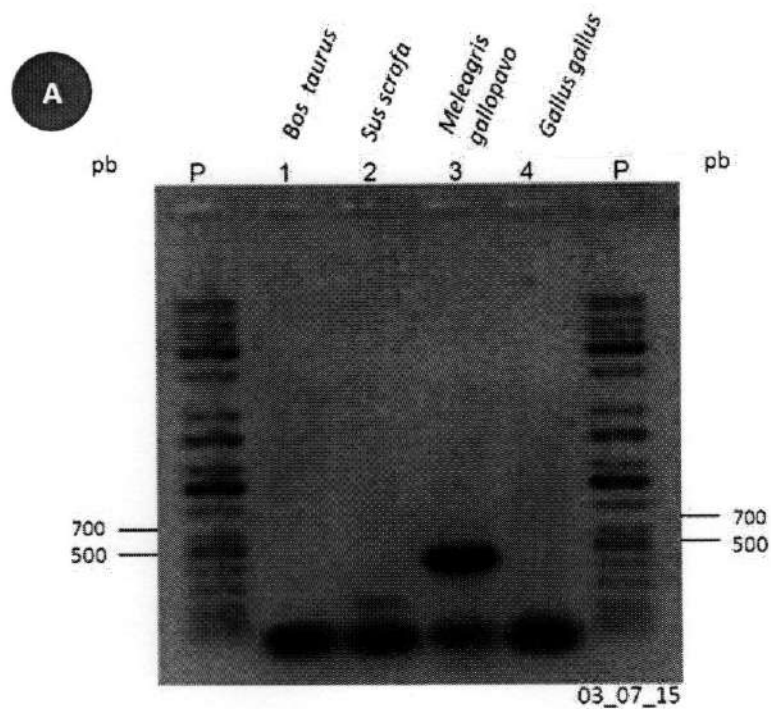


Figura 5. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicada a muestras puras de ADN de *M. gallopavo* y pruebas de reacciones cruzadas aplicadas a muestras de ADN de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados para identificar muestras de ADN de *Meleagris gallopavo*, y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.





**B**

	Muestras			
Partidor	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>	<i>Gallus gallus</i>
Mg1F/Mg1R	1	2	3 (450pb)	4

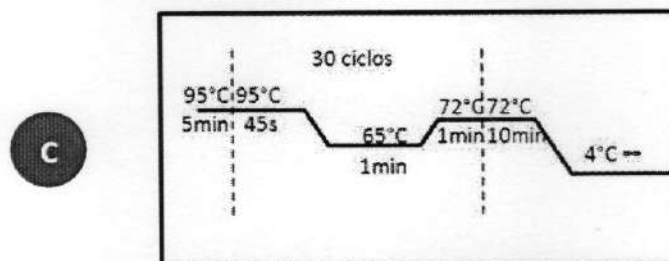
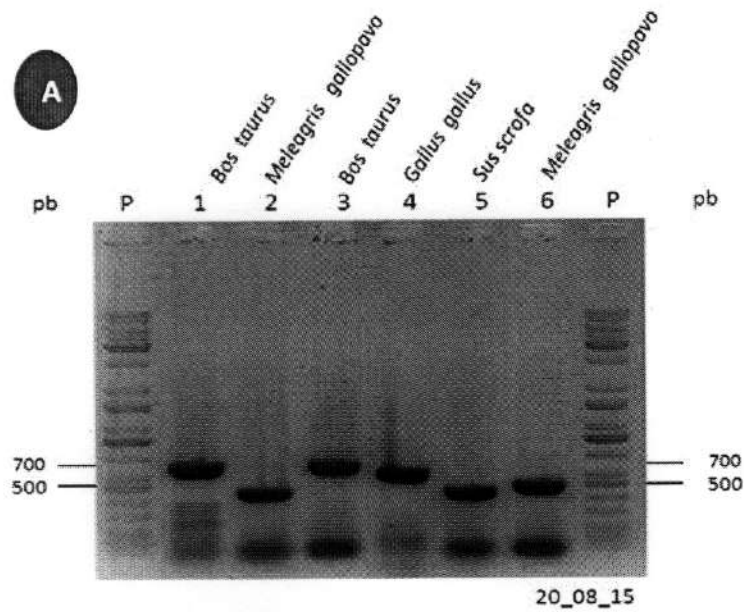


Figura 6. Prueba para selección de partidor especie específico aplicada a la muestra pura de *M. gallopavo* y pruebas de reacciones cruzadas aplicadas a muestras de ADN de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción del partidor utilizado para identificar muestras de ADN de *M. gallopavo* y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.



**B**

Partidores	Muestras
Bt1F/Bt1R	1 <i>Bos taurus</i> (700 pb)
Mg1F/Mg1R	2 <i>Meleagris gallopavo</i> (450 pb)
BtF19/BtR19	3 <i>Bos taurus</i> (713 pb)
GgF20/GgR20	4 <i>Gallus gallus</i> (618 pb)
SsF21/SsR21	5 <i>Sus scrofa</i> (458 pb)
MgF28/MgR28	6 <i>Meleagris gallopavo</i> (529 pb)

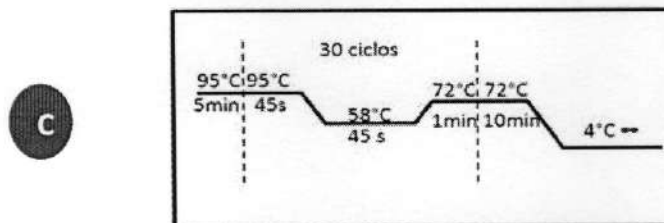
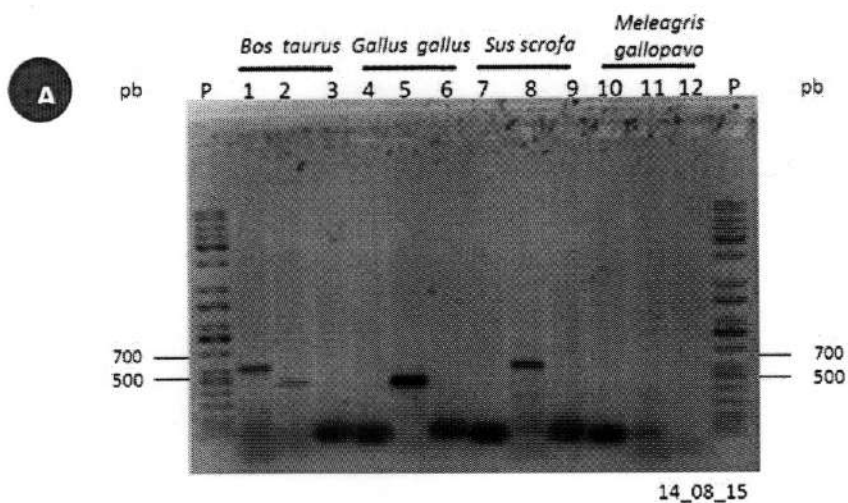


Figura 7. Pruebas para selección de segundo grupo de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados para identificar muestras de ADN de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo* y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.

Se realizaron las pruebas de reacciones cruzadas para el segundo grupo de partidores, donde BtF19/BtR19 diseñado específicamente para la identificación de *B. taurus* a un tamaño de 713pb no presentó reacciones cruzadas, ya que no se observó amplificación en las muestras de las otras especies (Figura 8); sin embargo, el par de partidores de *G. gallus* GgF20/GgR20, amplificó tanto en la muestra de res como en la de cerdo, lo que significa que no muestra especificidad, al igual que el par partidores de cerdo SsF21/SsR21, el cual amplificó con las muestras de *B.taurus* y *G. gallus*. mostrando una fuerte banda (Figura 8). En este punto se procedió a realizar nuevas extracciones, extremando las condiciones para eliminar posibles contaminaciones de una especie con otra y se solucionaron problemas asociados al cambio de enzima (Ver la sección 7.7), con lo cual, el par de partidores SsF21/SsR21 resulto especie específico. El partidore diseñado para la identificación de *M. gallopavo* MgF28/MgR28 a una región de 529 pb no mostró reacciones cruzadas como se observa en la Figura 8, al igual que el par de partidores BtF19/BtR19.

En la selección de los partidores especie-específicos se escogieron finalmente los siguientes partidores: BtF1/BtR1, BtF19/BtR19, GgF30/GgR30, SsF21/SsR21 y MgF28/MgR28. Pruebas adicionales se realizaron para establecer su especificidad como se muestra en las Figuras 9 y 10.



**B**

		Muestras			
		<i>Bos taurus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>
Partidores	BtF19/BtR19	—	4	7	10
	GgF20/GgR20	1	—	8	11
	SsF21/SsR21	2	5	—	12
	MgF28/MgR28	3	6	9	—

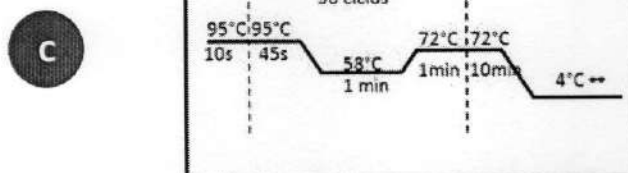
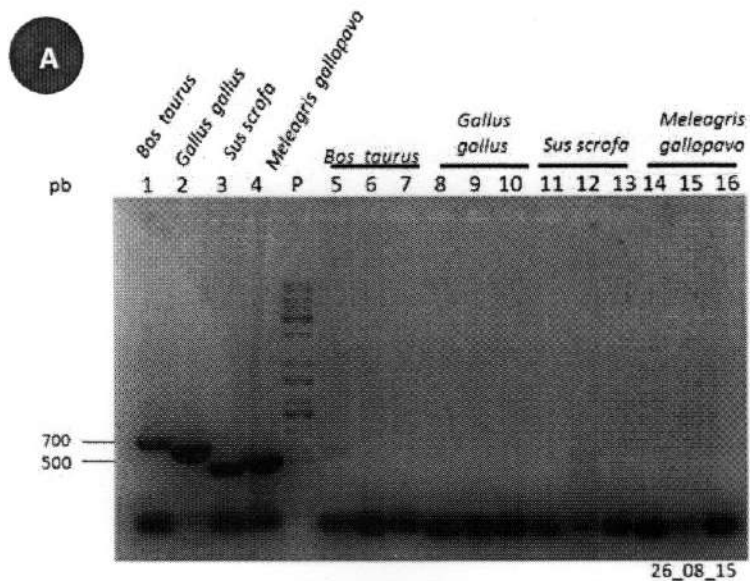


Figura 8. Pruebas de reacciones cruzadas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo* utilizando los nuevos partidores. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados, muestras de ADN por especies y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.



**B**

Partidores	Muestras			
	<i>Bos taurus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>
BtF19/BtR19	1 (713 pb)	8	11	14
GgF20/GgR20	5	2 (618 pb)	12	15
SsF21/SsR21	6	9	3 (458 pb)	16
MgF28/MgR28	7	10	13	4 (529 pb)

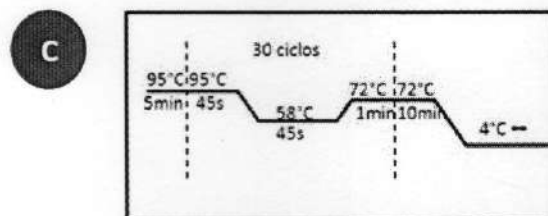
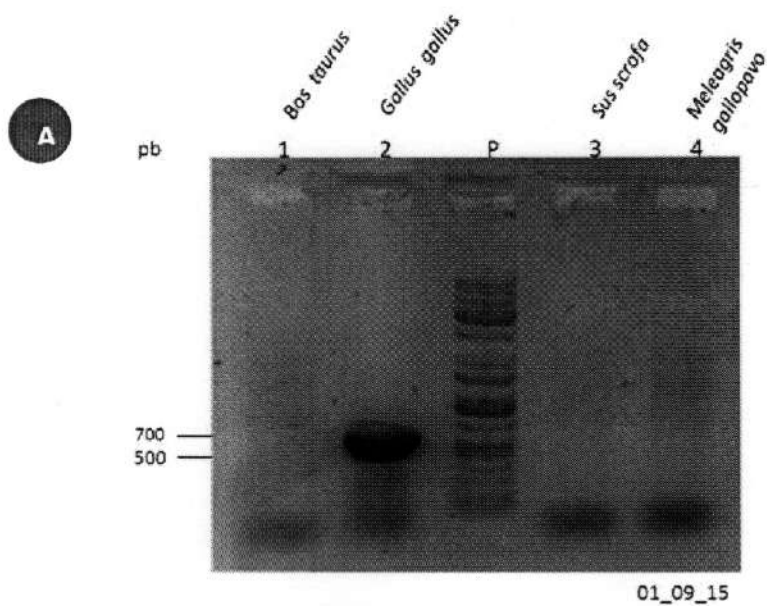


Figura 9. Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de ADN de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados, muestras de ADN por especies y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.



**B**

Partidor	Muestras			
	<i>Bos taurus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>
GgF30/GgR30	1	2 (697 pb)	3	4

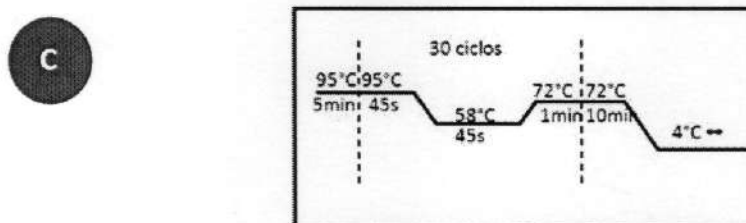


Figura 10. Prueba para selección de partidor especie específico aplicadas al par de partidores GgF30/GgR30 diseñado para identificar *M. gallopavo*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción del partidor utilizado, muestras de ADN por especies y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.

## 7.6 Sensibilidad de las pruebas de PCR para detectar las especies

Con estos ensayos se buscó determinar la concentración más pequeña que puede detectarse mediante la metodología empleada, es decir, la concentración mínima de ADN con la cual se pudiesen amplificar por PCR. Para llevar a cabo esta prueba se realizaron diluciones de ADN de las diferentes especies, para *B. taurus* y *G. gallus* se utilizaron concentraciones finales de 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 ng/μL mientras que para *S. scrofa* y *M. gallopavo*, las concentraciones empleadas fueron 0.05, 0.0051, 0.0005 y 0.00005 ng/μL. Los resultados se presentan en las Figuras 11, 12 y 13. Se pudo establecer que el par de partidores con mayor sensibilidad fue el que identifica *G. gallus* es decir el Gg30F/Gg30R, ya que como se muestra en la Figura 12 el mismo amplificó hasta una concentración de 0,0001 ng/μL de ADN seguido por el de pavo Mg28F/Gg28R que detecta hasta una concentración de 0,0005 ng/μL de ADN tal como se muestra en la Tabla 14 (Figura 11). Para *S. scrofa* no fue posible la detección en las diluciones, indicando que es más difícil la detección de esta especie.

Se comparó los resultados con otras investigaciones como Kesmen (2007) donde se registran sensibilidades en diluciones de 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ng/μL para las mismas muestras cerdo, res, gallina y pavo las cuales son mucho menores que las nuestras lo que nos indica que nuestros partidores son más sensibles y detectan concentraciones más bajas.

Para mejorar la sensibilidad se debe hacer uso de otro tipo de técnica como la PCR anidada en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Esta PCR brinda una alta sensibilidad en comparación con la PCR convencional.

Trabajos evaluando la sensibilidad de las metodologías de PCR para la autenticación de carnes como los presentados por Kesmen, (2009), realizaron diluciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 ng/ μL de ADN para muestras de caballo, burro, cerdo, bovino, ovino, pollo y pavo. Para cada una de las

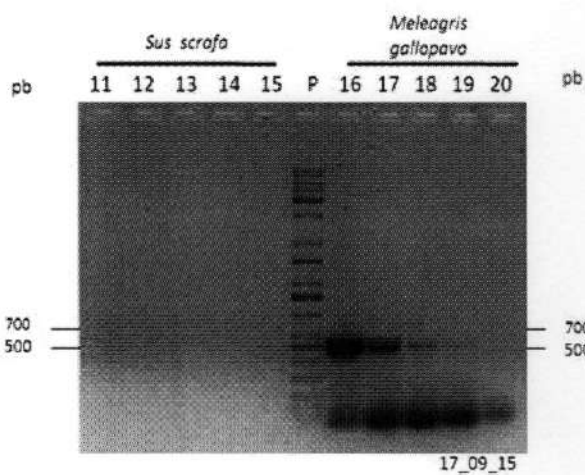
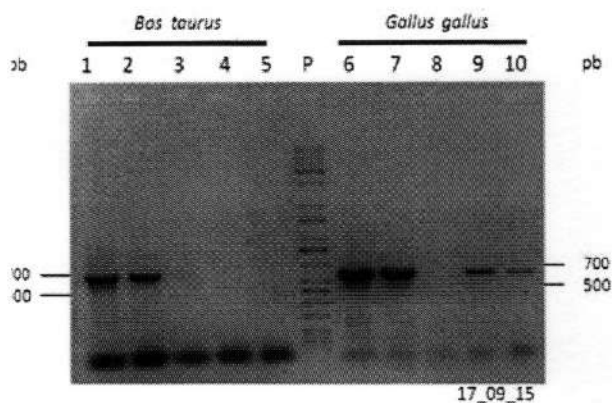


especies lograron determinar hasta una concentración de 0.0001 ng/  $\mu$ L de ADN, en nuestra investigación, los partidores que identifican la muestra de *Gallus gallus* presenta igual sensibilidad que este trabajo.

Es importante tomar en cuenta que a pesar que los partidores probados por Kesmen, Gulluce, Sahin y Yetim, (2009) son más sensibles, con nuestros partidores se logra identificar concentraciones muy bajas de ADN en diferentes productos procesados como mostraremos más adelante.

La sensibilidad de los partidores es un aspecto importante en la identificación de especies en productos comerciales ya que cuanto más sensibles se garantizará la detección cuando las concentraciones sean muy bajas y aumentará la confiabilidad de las detecciones disminuyendo posibles falsos negativos. En nuestro caso, la metodología implementada, nos permite identificar hasta 0.0001 ng/  $\mu$ L para *Gallus gallus*, no obstante para las otras especies se obtuvo una sensibilidad menor.

En las muestras comerciales las proporciones de las distintas carnes que lo componen varían y además las materias primas sufren una serie de transformaciones, es importante contar con una gran sensibilidad, pero sin descuidar que los partidores sean altamente específicos.



**A**

Muestra	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)				
	8.0	0.10	0.01	0.001	0.0001
<i>Bus taurus</i>	1	2	3	4	5

**B**

Muestra	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)				
	6.0	0.10	0.01	0.001	0.0001
<i>Gallus gallus</i>	6	7	8	9	10

Muestra	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)				
	4.4	0.05	0.005	0.0005	0.00005
<i>Sus scrofa</i>	11	12	13	14	15

Muestra	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)				
	10.0	0.05	0.005	0.0005	0.00005
<i>Meleagris gallopavo</i>	16	17	18	19	20

**C**

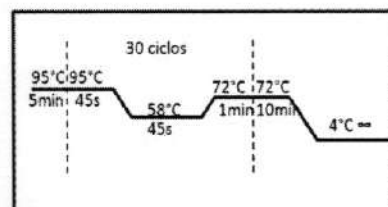
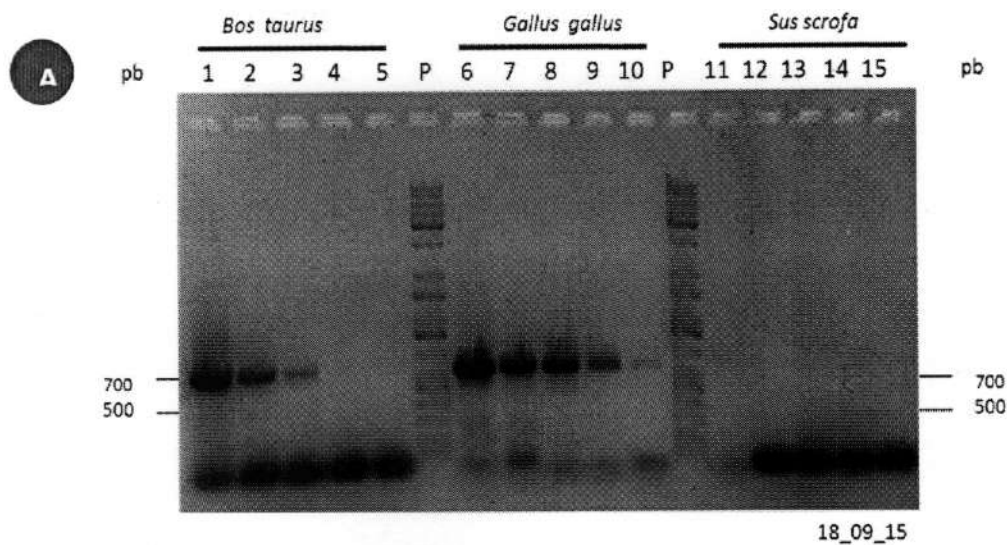


Figura 11. Pruebas de sensibilidad aplicada a las muestras puras de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo* con distintas cantidades de ADN. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de las muestras con sus respectivas diluciones y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento.



**B**

Muestra	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)				
	8.0	0.10	0.01	0.001	0.0001
<i>Bos taurus</i>	1	2	3	4	5
<i>Gallus gallus</i>	6	7	8	9	10
<i>Sus scrofa</i>	11	12	13	14	15

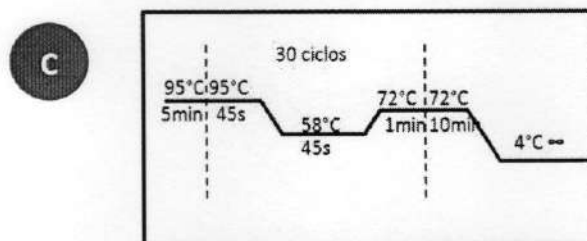


Figura 12. Pruebas de sensibilidad aplicada a las muestras puras de *B. taurus*, *G. gallus* y *S. scrofa*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de las muestras con sus respectivas diluciones y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento.

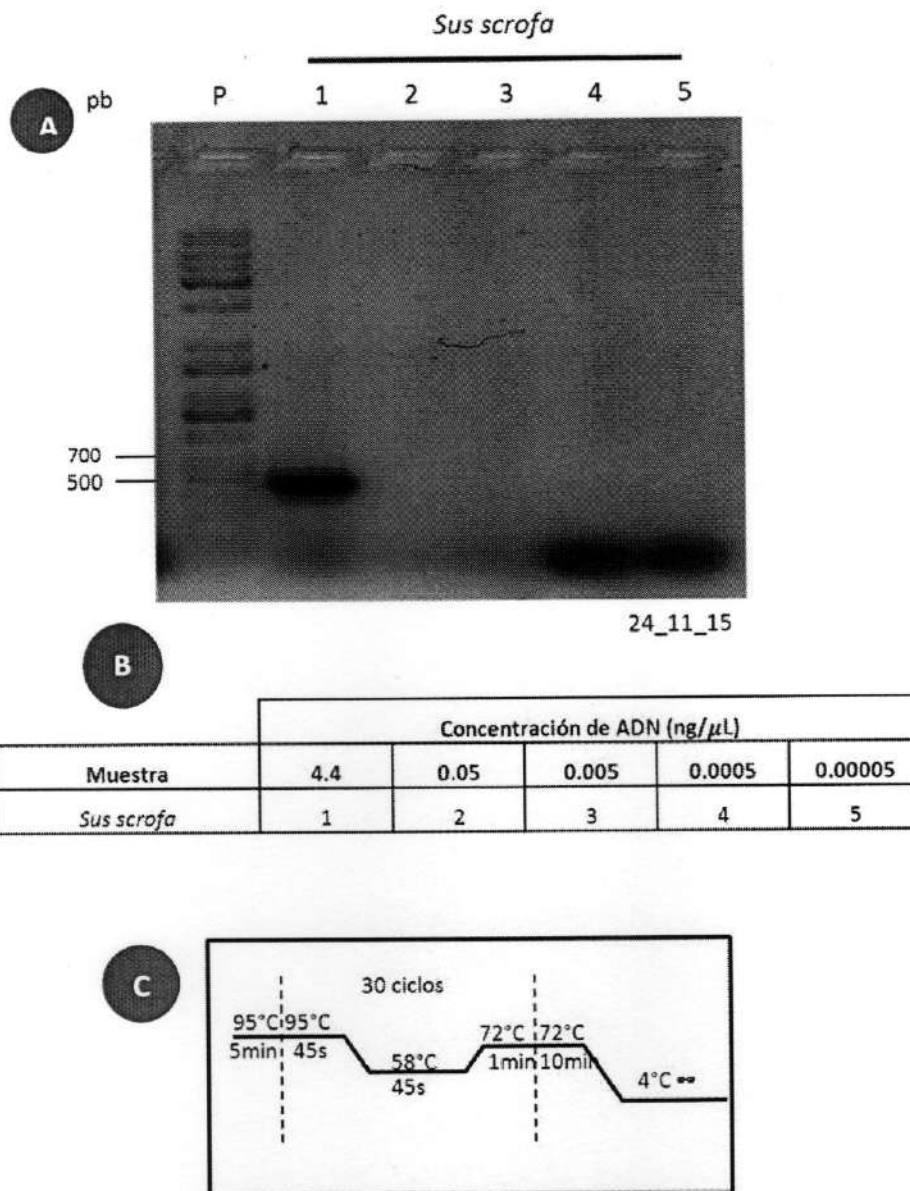


Figura 13. Prueba de sensibilidad aplicada a la muestras pura de *S. scrofa*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la muestra con sus respectivas diluciones y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento.

Tabla 14. Resultados de sensibilidad aplicada a las pruebas de PCR.

<i>B. taurus</i>					
ng/uL	8.0	0.10	0.01	0.001	0.0001
Detección =>	•	•	•		

<i>G. gallus</i>					
ng/uL	6.0	0.10	0.01	0.001	0.0001
Detección =>	•	•	•	•	•

<i>S. scrofa</i>					
ng/uL	4.4	0.05	0.005	0.0005	0.00005
Detección =>	•				

<i>M. gallopavo</i>					
ng/uL	10.0	0.05	0.005	0.0005	0.00005
Detección =>	•	•	•	•	

En el caso de *S. scrofa* que según los resultados no muestra una sensibilidad considerable en comparación con los demás se haría necesario examinar concentraciones entre 0.05 y 0.1 ng/ $\mu$ L.

## 7.7 Autenticación de las especies en muestras de productos procesados

Una vez cuantificado el ADN extraído de las 16 muestras comerciales (Tabla 15) se procedió a la identificación de las especies cárnicas presentes y se compararon los resultados obtenidos con sus respectivas etiquetas, manteniendo los respectivos controles positivos para cada especie (Figuras 14 a la 18; Tabla 15).

Se realizaron pruebas inicialmente para 6 productos comerciales y se compararon con los contenidos plasmados en cada una de sus etiquetas (Tabla 15). En la primera prueba individual los resultados obtenidos mostraron algunas diferencias con el contenido expuesto en la etiqueta, por ejemplo en la muestra A solo se identificó gallina, mientras que su etiqueta indica que contiene gallina y pavo. Para la muestra B se identificó gallina, cerdo y pavo, sin embargo, la etiqueta dice que contiene res en lugar de gallina. La muestra C y F fueron consistentes con lo indicado por la etiqueta. En la muestra E no se observó ninguna amplificación (Figura 14). Es importante resaltar que para esta prueba utilizamos  $2 \mu\text{L}$  de ADN, por lo cual, las pruebas se repitieron, duplicando la cantidad de ADN a  $4 \mu\text{L}$ . De esta forma, en la muestra A se identificó gallina y pavo como dice la etiqueta, en la muestra B y D los resultados obtenidos fueron consistentes con la primera prueba, es decir que identificamos gallina, cerdo y pavo en la muestra B y gallina y cerdo en la muestra D, en el caso de la muestra E se identificó solamente res que es el contenido mostrado es la etiqueta como se observa en la Figura 15. Aunque las muestras C y F no presentaron variación con el contenido que dice la etiqueta en la primera prueba, se verificó utilizando  $4 \mu\text{L}$  de ADN y en el caso de la muestra C se logró identificar gallina y pavo y para la muestra F solo se identificó res como se observa en la Figura 16. Basados en los resultados de sensibilidad realizados previamente, es importante considerar que para las muestras que contengan *S. scrofa* o *B. taurus*, el método de identificación requerirá mayor proporción de ADN para obtener respuesta. Los análisis de las muestras desde G a P se representan en las figuras 17, 18 y la tabla 16, algunas inconsistencias se observaron en cuanto al contenido representado en las etiquetas y los resultados de las autenticaciones.

Se analizaron productos cárnicos comerciales que fueron sometidos a procesos de pasteurización, molido, entre otros, y fue posible autenticar determinando las especies cárnicas presentes en los mismo, lo cual, nos comprueba que a pesar del procesado las moléculas de ADN no se encontraban degradadas. Y encontramos que 9 de 16 muestras contenían adulteración como se muestra en la tabla 15, y de estas 9 adulteraciones. Donde 7 de ellas fueron por la adición de gallina por lo que al ser una carne de menor valor se hace común su uso en estos tipos de productos.

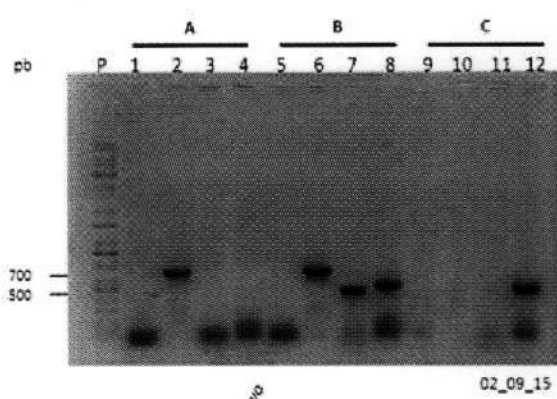
Uno de los aspectos complejos en este tipo de estudio comienza con el diseño de partidores, según lo reportado por Kesme, (2007) al momento de diseñar los partidores que identifican las especies selectivamente es más difícil diseñarlos en especies parecidas por ejemplo en el caso de las aves en la cual existen muchas variedades, ya que existen la tendencia de que su genoma sea bastante parecido, por lo cual, se hace necesario buscar regiones en las que difieren y amplificarlas de manera que puedan ser especie específicos. En el caso de Kesme, (2007) ellos realizaron un ensayo de PCR específico de la especie para la detección carne de cerdo, caballo y burro en salchichas cocidas y lograron discriminarlas.

Rojas, (2008) realizó un estudio sobre autenticación de carne y productos cárnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz y pintada mediante una técnica de PCR con cebadores especie-específicos con ADN extraído utilizando un kit de extracción. A diferencia de nuestro trabajo ellos diseñaron partidores especie específicos que amplificaban tamaños muy cercanos entre ellos, los cuales, iban de 129 a 141pb, además ellos realizaron secuenciación de los productos de PCR purificados. También cabe destacar que la cantidad de volumen total en el tubo de reacción fue mayor de 25 $\mu$ L y 40 ciclos, con lo cual, el sistema que implementamos requiere de menor consumo de reactivos, ya que el volumen total de reacción es de 12.5  $\mu$ L.

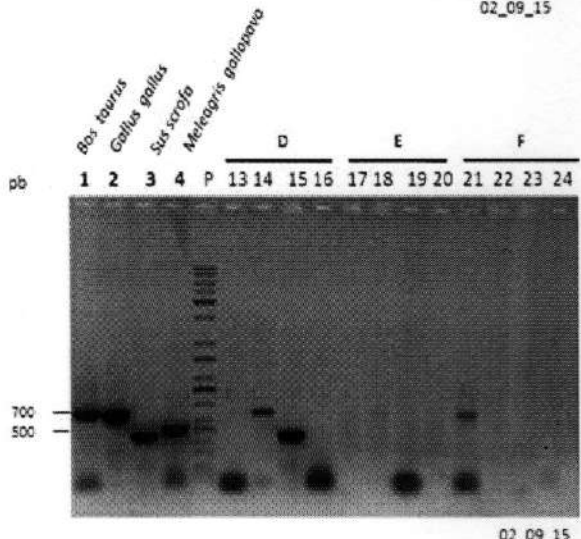


Tabla 15. Identificación de especies en los contenidos cárnicos de los productos procesados.

ID	Producto	Contenido cárnico descrito en la etiqueta	Especies identificadas				Fig. de referencia
			<i>B. taurus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>S. scrofa</i>	<i>M. gallopavo</i>	
A	Chorizo	Gallina y pavo		•		•	14,15
B	Chorizo parrillero	Res, cerdo y pavo		•	•	•	14, 15
C	Salchicha	Pavo		•		•	14, 16
D	Jamón de pierna	Cerdo		•	•		14, 15
E	Hamburguesa	Res	•				14, 15
F	Hamburguesa	Res	•				14, 16
G	Bologña	Gallina		•	•		17
H	Salchicha ahumada	Res y Cerdo	•	•	•		17
I	Jamonilla	Cerdo			•		17
J	Jamón de pierna	Cerdo		•	•		17
K	Salchichón	Res, cerdo y pavo		•	•		17
L	Salchichas cocktail	Gallina y/o pavo		•			18
M	Salchichas	Gallino y pavo		•			18
N	Mortadela	Gallina y res		•			18
O	Salchicha enlatada	Res		•			18
P	Jamonilla	Gallina		•			18



**A**



**B**

Muestras	Partidores			
	BtF19/BtR19	GgF30/GgR30	SsF21/SsR21	MgF28/MgR28
A	1	2	3	4
B	5	6	7	8
C	9	10	11	12
D	13	14	15	16
E	17	18	19	20
F	21	22	23	24
<i>Bos taurus</i>	1	---	---	---
<i>Gallus gallus</i>	---	2	---	---
<i>Sus scrofa</i>	---	---	3	---
<i>Meleagris gallopavo</i>	---	---	---	4

**C**

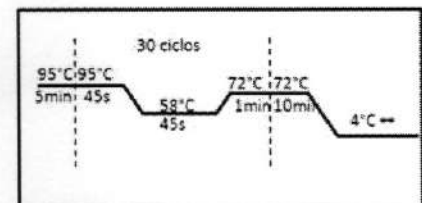
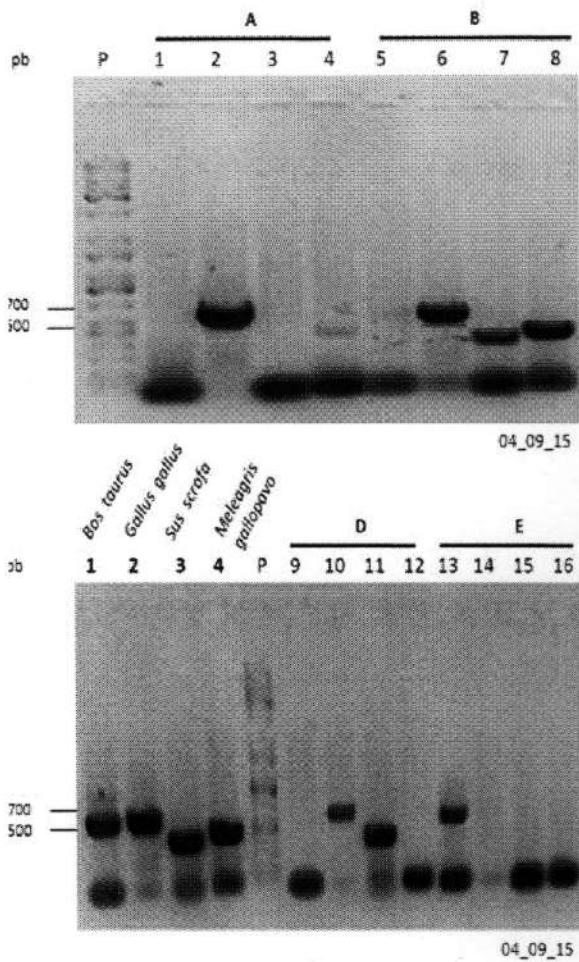


Figura 14. Prueba realizada en diferentes productos procesados de la localidad utilizando 2  $\mu$ L de ADN. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento.



**A**

**B**

Muestras	Partidores			
	BtF19/BtR19	GgF30/GgR30	SsF21/SsR21	MgF28/MgR28
<b>A</b>	1	2	3	4
<b>B</b>	5	6	7	8
<b>D</b>	9	10	11	12
<b>E</b>	13	14	15	16
<i>Bos taurus</i>	1	---	---	---
<i>Gallus gallus</i>	---	2	---	---
<i>Sus scrofa</i>	---	---	3	---
<i>Meleagris gallopavo</i>	---	---	---	4

**C**

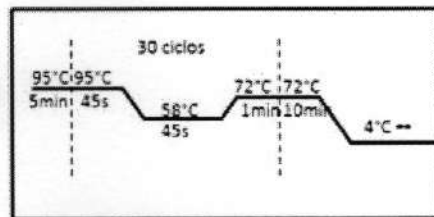
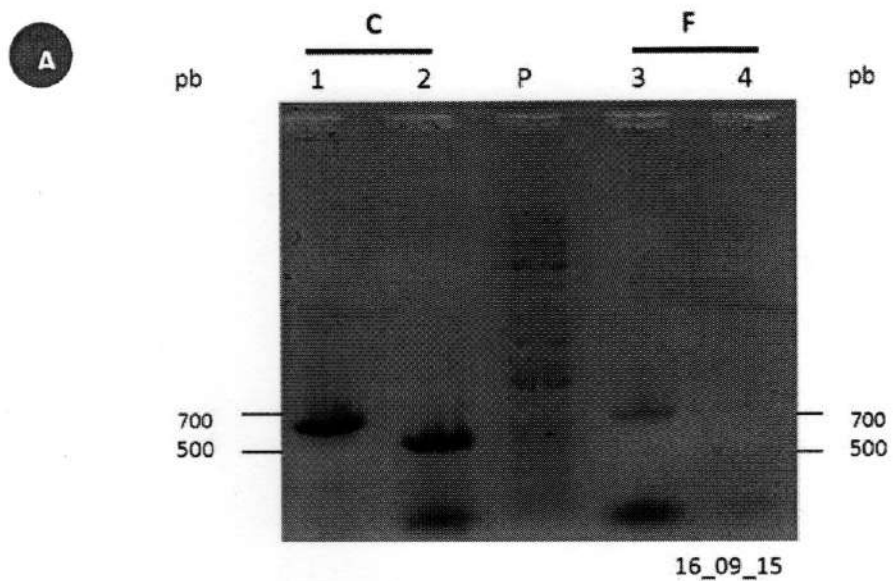


Figura 15. Prueba realizada en diferentes productos procesados de la localidad utilizando 4  $\mu$ L de ADN. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento.



**B**

Muestras	Partidores		
	BtF19/BtR19	GgF30/GgR30	MgF28/MgR28
C	---	1	2
F	3	4	---

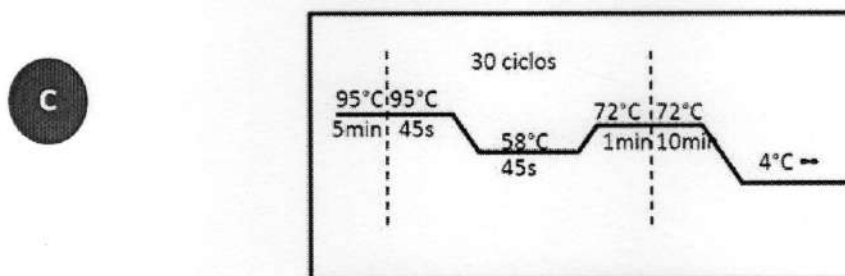


Figura 16. Prueba de detección de ADN de *Bos taurus*, *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo* para muestras C y F utilizando 4  $\mu$ L de ADN. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento.

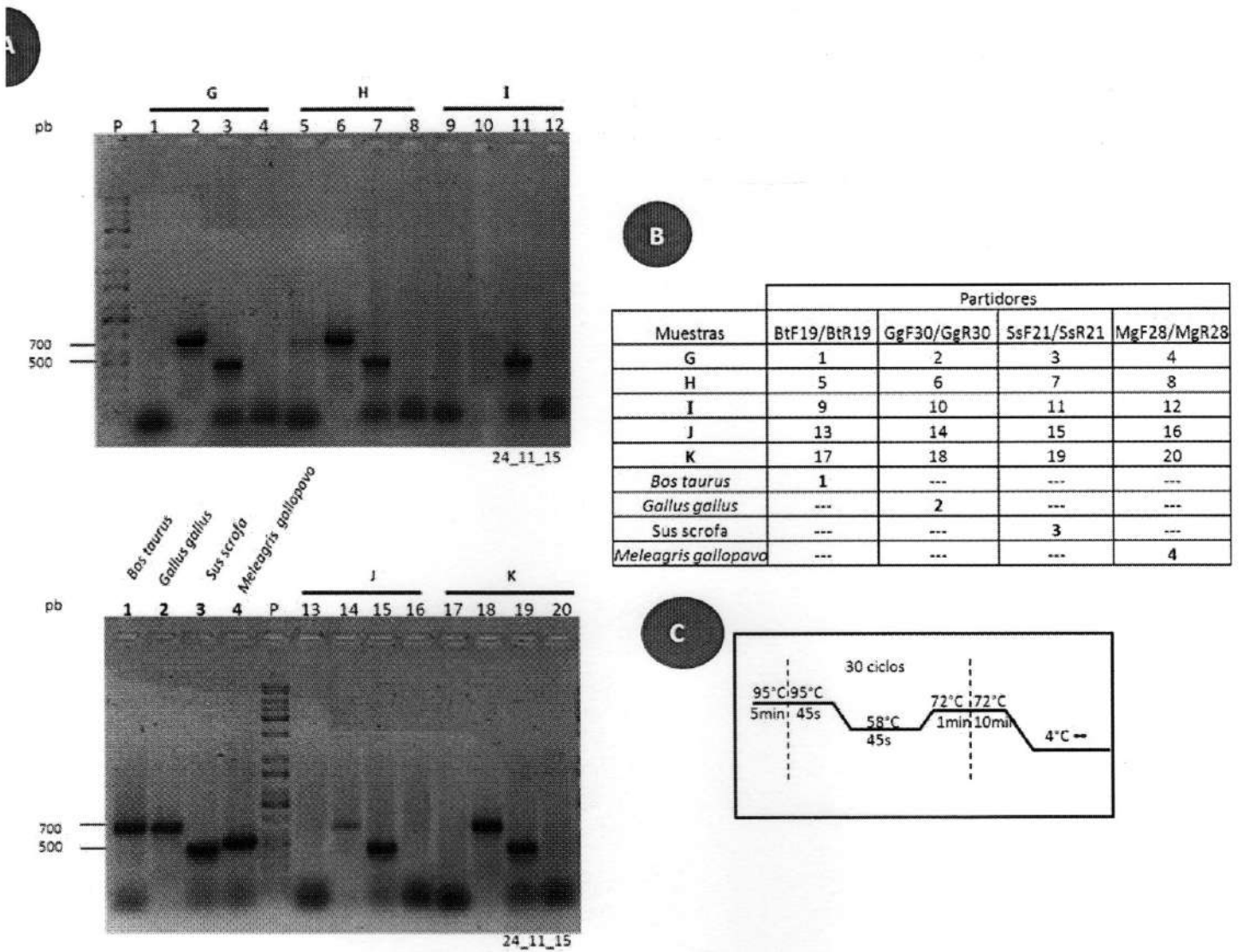
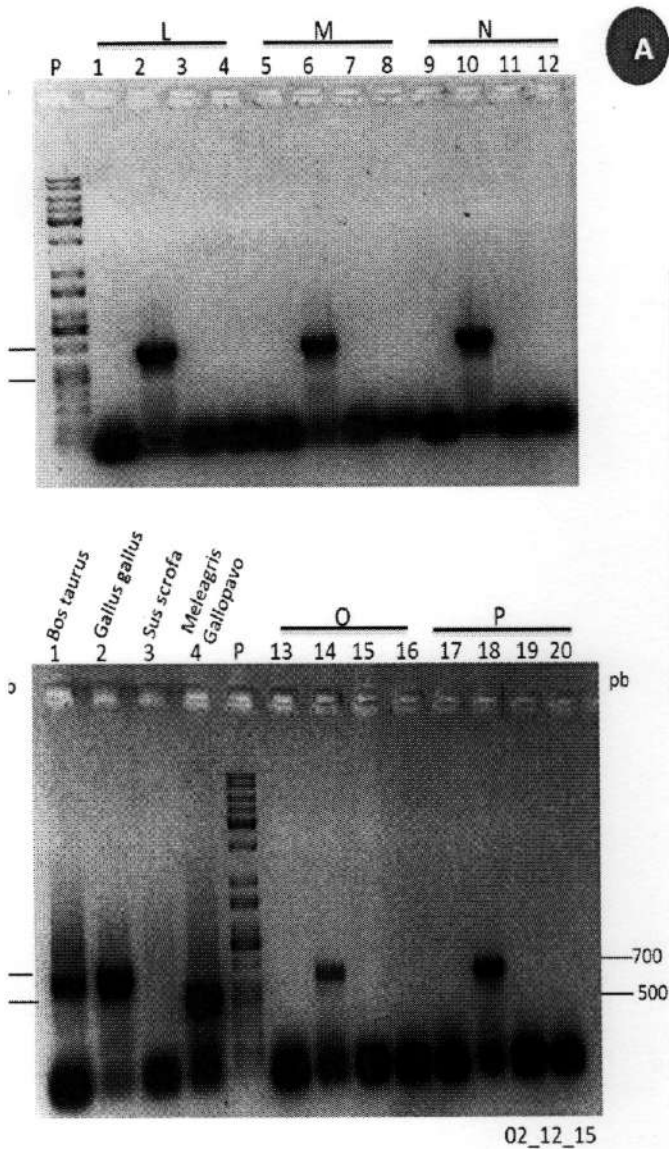


Figura 17. Prueba realizada en diferentes productos procesados de la localidad utilizando 4  $\mu$ L de ADN. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento.



**B**

Muestras	Partidores			
	BtF19/BtR19	GgF30/GgR30	SsF21/SsR21	MgF28/MgR28
L	1	2	3	4
M	5	6	7	8
N	9	10	11	12
O	13	14	15	16
P	17	18	19	20
<i>Bos taurus</i>	1	---	---	---
<i>Gallus gallus</i>	---	2	---	---
<i>Sus scrofa</i>	---	---	3	---
<i>Meleagris gallopavo</i>	---	---	---	4

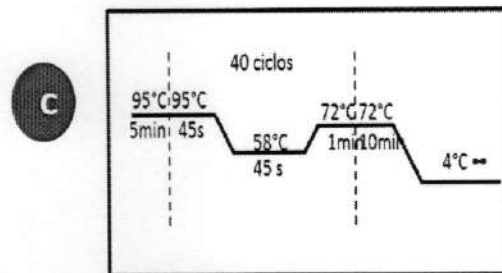


Figura 18. Prueba realizada en diferentes productos procesados de la localidad utilizando 5  $\mu$ L de ADN. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para este experimento



## 7.8 Reacciones múltiples para identificar especies en productos cárnicos

Las reacciones múltiples de PCR o “Multiplex PCR” en inglés, consisten en amplificar varios fragmentos en el mismo tubo de reacción, para detectar en forma simultánea varias especies. Estas reacciones presentan ventajas como la disminución del tiempo para obtener los resultados, disminución de la cantidad de reactivo y puede recurrirse a ellas cuando se manejen un gran número de muestras. No obstante, no basta con mezclar los pares de partidores correspondientes para obtener los resultados ya que hay aspectos como la compatibilidad de los partidores que pueden disminuir la capacidad de detectar una especie. Para contar con una reacción múltiple válida fue necesario hacer las correspondientes pruebas primero con muestras puras y mezclas de estas (Figura 19 y 20).

Uno de los aspectos básicos considerados fueron los tamaños de los fragmentos que se obtendrían en cada reacción, ya que una de las condiciones obvias es que los productos de PCR, por cada reacción debe producir distinto tamaño para poder visualizarlos en los respectivos geles de electroforesis, sin que ellos se traslapen.

Se seleccionaron los partidores de las especies considerando los tamaños de los amplicones o productos de PCR, quedando las pruebas denotadas como “RM#” (Tabla 16) y conformadas en pares o dúplex para res/cerdo, res/pavo, gallina/cerdo, gallina/pavo; y una PCR triple para res, cerdo y pavo. Obteniéndose, reacciones múltiple con buenos resultados, entre ellas las denotadas como RM2, RM3, RM4 y RM5 (Figura 20 y Tabla 16) y otras pruebas que no produjeron una adecuada identificación como las reacciones RM1 y RM6.



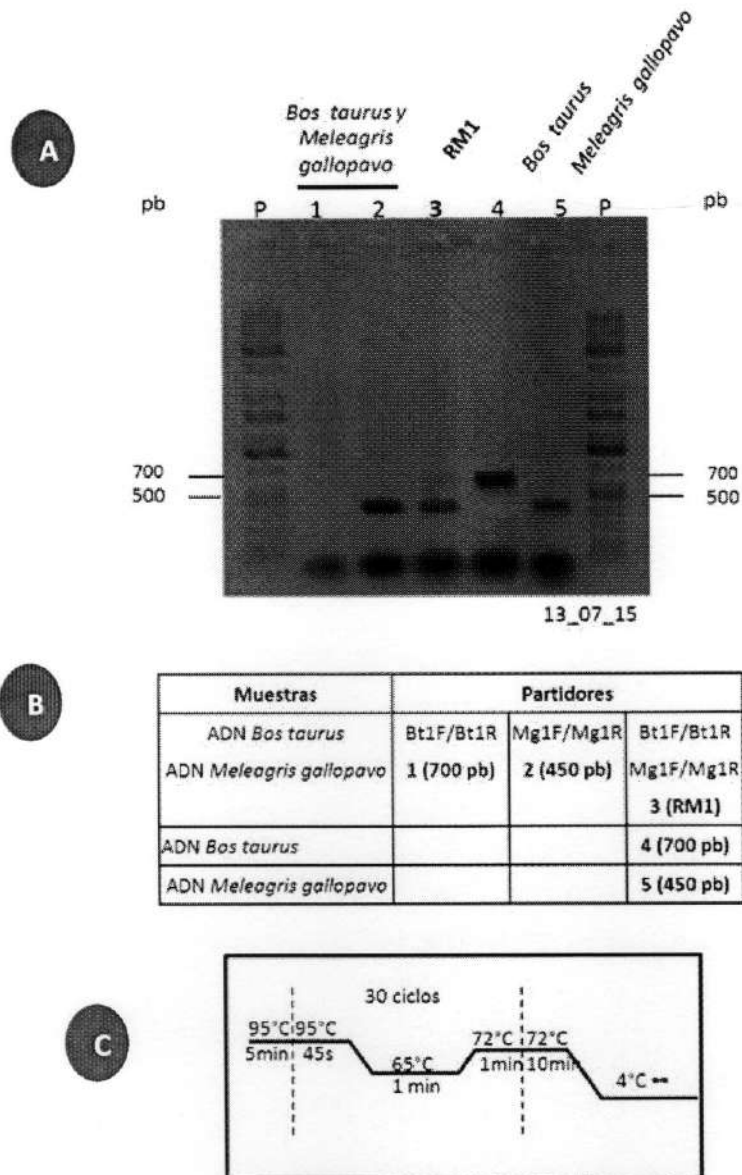


Figura 19. Pruebas múltiples aplicadas a las muestras puras de ADN de *B. taurus* y *M. gallopavo* con sus partidores especie específicos. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados, muestras de ADN por especies y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.

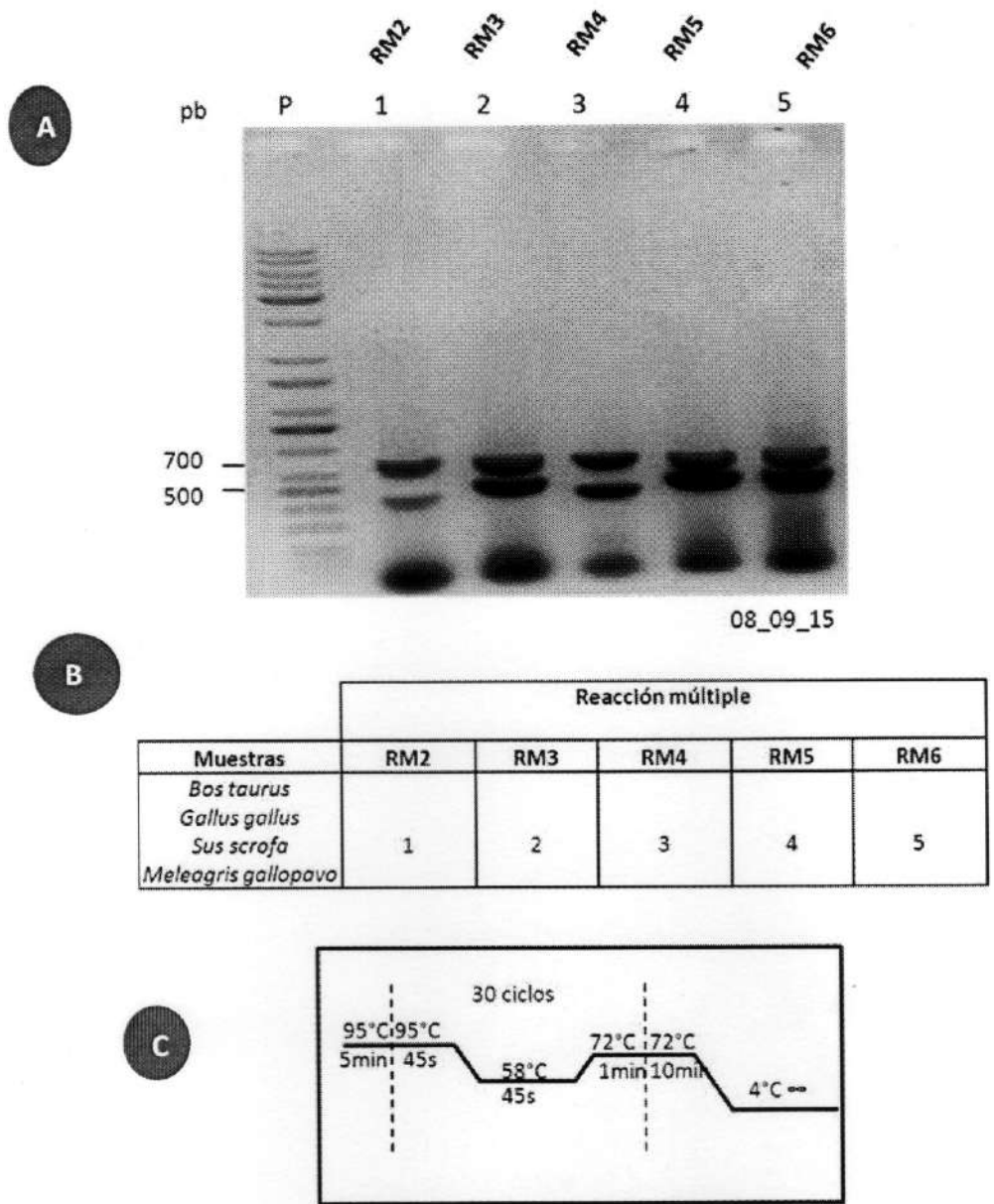


Figura 20. Pruebas múltiples aplicadas a las muestras puras de ADN de *B. taurus*, *G. gallus*, *S.scrofa* y *M. gallopavo* con sus partidores especie específicos. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados, muestras de ADN por especies y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.

Tabla 16: Pruebas para establecer las reacciones múltiples.

Reacción Múltiple		Especies				Fig.
		<i>B. taurus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>S. scrofa</i>	<i>M. gallopavo</i>	
<b>RM1</b>	Especies que identifica =>	•			•	19
	Partidores utilizados =>	Bt1F/Bt1R			Mg1F/Mg1R	
	Amplicón esperado =>	700pb			450pb	
<b>RM2</b>	Especies que identifica =>	•		•		20
	Partidores utilizados =>	BtF19/BtR19		SsF21/SsR21		
	Amplicón esperado =>	713pb		458pb		
<b>RM3</b>	Especies que identifica =>	•			•	20
	Partidores utilizados =>	BtF19/BtR19			MgF28/MgR28	
	Amplicón esperado =>	713pb			529pb	
<b>RM4</b>	Especies que identifica =>		•	•		20
	Partidores utilizados =>		GgF30/GgR30	SsF21/SsR21		
	Amplicón esperado =>		697pb	458pb		
<b>RM5</b>	Especies que identifica =>		•		•	20
	Partidores utilizados =>		GgF30/GgR30		MgF28/MgR28	
	Amplicón esperado =>		697pb		529pb	
<b>RM6</b>	Especies que identifica =>	•		•	•	20
	Partidores utilizados =>	BtF19/BtR19		SsF21/SsR21	MgF28/MgR28	
	Amplicón esperado =>	713pb		458pb	529pb	

Es importante resaltar que los 6 partidores especie específico seleccionados de los 13 que fueron diseñados, fueron probados juntos en dupleta hasta dar con los que amplificaran de especies a la vez. En el caso de la RM1 se utilizó el partidor BF1F/Bt1R a 700pb con Mg1F/Mg1R a 450 pb a pesar que estos amplifican tamaños muy diferentes y que podrían visualizarse en un gel este solo registro amplificación de un partidor por lo que no fue elegido para pruebas posteriores lo cual se debe a principalmente a que uno de ellos no hibrido con el ADN molde.

En el caso de las reacciones múltiples de RM2, RM3, RM4, RM5 (Figura 20) contra mezclas de carnes se observa el tamaño correspondiente a los fragmentos esperados. Para RM6 que consiste en una reacción triple, solo se observan dos bandas, posiblemente por el traslape de las bandas de 458pb y 529pb que al estar muy cercanas en tamaño no se lograron resolver en las condiciones usadas para la electroforesis en el gel de agarosa.

Estos resultados obtenidos de la PCR múltiple los comparamos con los reportados por Ghovvati (2009), donde realizaron detección simultánea utilizando tres conjuntos de cebadores para identificar especies de *B. taurus*, *G. gallus* y *S. scrofa* a un tamaño de 104, 183 y 290pb, respectivamente. Mediante PCR múltiple identificaron claramente los tres fragmentos de amplificación, a diferencia de la prueba triple realizada en nuestra investigación, no permitió identificar las 3 especies, sin embargo, se logró optimizar las pruebas para la identificación de especies en pares.

Existen varios factores a considerar cuando realizamos un PCR múltiple entre ellos la cantidad y concentración de ADN, partidores y en el caso de la visualización de los productos de PCR, la cantidad que se carga en el gel de agarosa para el revelado del mismo, ya que al generar bandas de un grosor considerable se dificulta diferenciarlas de manera que al disminuir la cantidad de muestra cargada en el gel podríamos distinguir mejor las bandas de las especies cárnicas, obteniendo resultados más claros siendo esta una opción para mejorar su visualización.

Las reacciones múltiples aplicadas a muestras puras, con concentraciones conocidas nos permitieron obtener resultados fiables, optimizar las condiciones de PCR y de visualización de los productos, para posteriormente aplicar las pruebas a productos procesados.

Dichos productos procesados son obtenidos después de varios procesos industriales en donde se cambian sus características morfológicas y estos pueden ser identificadas también utilizando PCR con reacciones múltiples, no obstante las proporciones entre las carnes que las conforman son variables y muchas veces desconocida, por lo que se hace necesario incrementar la concentración de ADN, de manera que la especie de menor proporción pueda ser amplificada y no sean enmascaradas. Es por ello que en lugar de 2 $\mu$ L de ADN que es la cantidad que se utiliza en la mayoría de las pruebas esta se duplico a 4 $\mu$ L

De las reacciones múltiples probadas la RM3 y RM4 pueden usarse para identificar cualquiera de las cuatro especies seleccionadas para este estudio, por lo que, se aplicaron estas pruebas a las 16 muestras de productos procesados (Figura 21, Tabla 16).

Al aplicar la PCR múltiple en diversos productos procesados se observa claramente que la mayoría de las alteraciones en productos cárnicos ocurre por la adición de gallina, lo cual no se registra en el etiquetado. Estos resultados fueron comparados con un trabajo expuesto por Ghovvati (2009), donde el 40% de las muestras de salchichas y el 30% de las muestras de fiambre estaban contaminados con residuos de aves de corral que no están en conformidad con los ingredientes mencionados por la empresa; en contraste con los obtenidos resultados obtenidos en nuestro trabajo de investigación, donde la mayor parte de las adulteraciones se dan por la adición de *G. gallus*.

A su vez también Rojas, (2008) mediante reacciones múltiples identificaron aves de caza en productos comerciales con tres pares de partidores y expresaron que el límite para que esta tenga éxito es de tres pares de partidores. En nuestro caso cuando se utilizaron tres pares de partidores, el resultado pudo verse traslapado, es decir, los tamaños al ser muy cercanos uno de otro y correr las muestras por

electroforesis, no se separaron completamente. Para lo cual, se requiere realizar algunos ajustes como aumentar la concentración del gel de garosa y el dar mayor tiempo a la electroforesis para obtener una mayor resolución.

En la Tabla 17 se presenta una comparación entre los dos tipos de pruebas de PCR realizadas, compuestas por las reacciones independientes y las reacciones múltiples. Tal como se muestra en la Tabla 17 en el caso de las muestras B, C, E, L, M, N, O y P presentaron resultados consistentes utilizando ambos métodos lo cual quiere decir que las concentraciones de ADN de las distintas especies que estuvo presente en las muestras comerciales tuvo que ser dentro del límite de detección de los partidores para que pudiesen identificarlas y amplificar. Sin embargo en las demás muestras se presentaron inconsistencias relacionadas con la incapacidad de identificar algunas especies lo que puede deberse a que la sensibilidad de detección en la reacciones múltiples puede ser menor que en las reacciones solas.



Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos con reacciones independientes y reacciones múltiples.

		Reacciones independientes				Reacción múltiple			
						RM3		RM4	
		<i>B. taurus</i>	<i>M. gallopavo</i>	<i>G. gallus</i>	<i>S. scrofa</i>	<i>B. taurus</i>	<i>M. gallopavo</i>	<i>G. gallus</i>	<i>S. scrofa</i>
		BtF19/BtR19	MgF28/MgR28	GgF30/GgR30	SsF21/SsR21	BtF19/BtR19	MgF28/MgR28	GgF30/GgR30	SsF21/SsR21
		713pb	697pb	458pb	529pb	713pb	529pb	697pb	458pb
MUESTRAS	A		•	•				•	
	B		•	•	•		•	•	•
	C		•	•			•	•	
	D			•	•				•
	E	•				•			
	F	•				•		•	
	G			•	•			•	
	H	•		•	•	•		•	
	I				•				•
	J			•	•				•
	K			•	•			•	
	L			•				•	
	M			•				•	
	N			•				•	
	O			•					
	P			•				•	



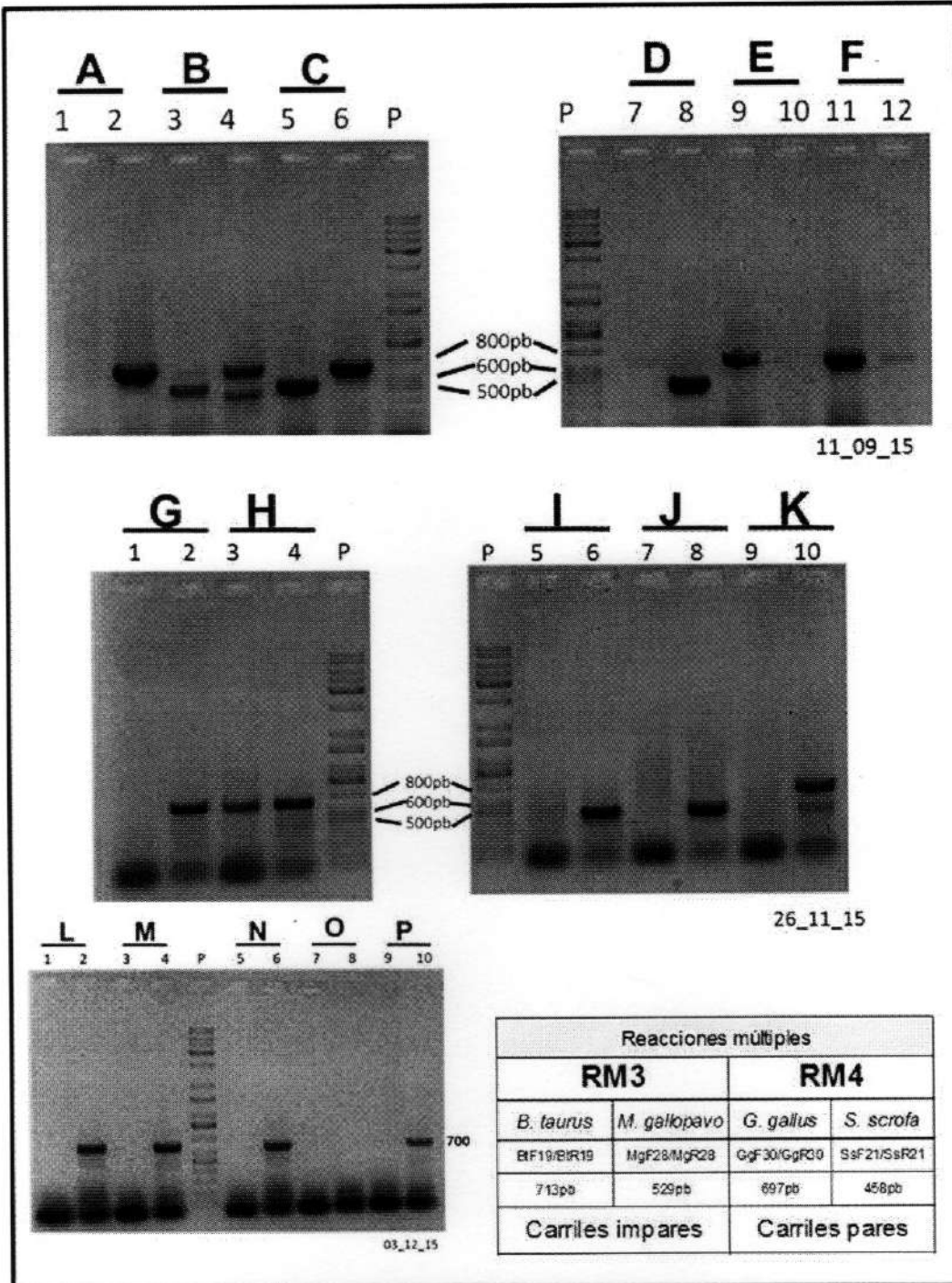


Figura 21. Reacciones múltiples RM3 y RM4 para identificar especies en muestras de ADN de productos procesados con contenidos cárnicos.

## VIII CONCLUSIONES

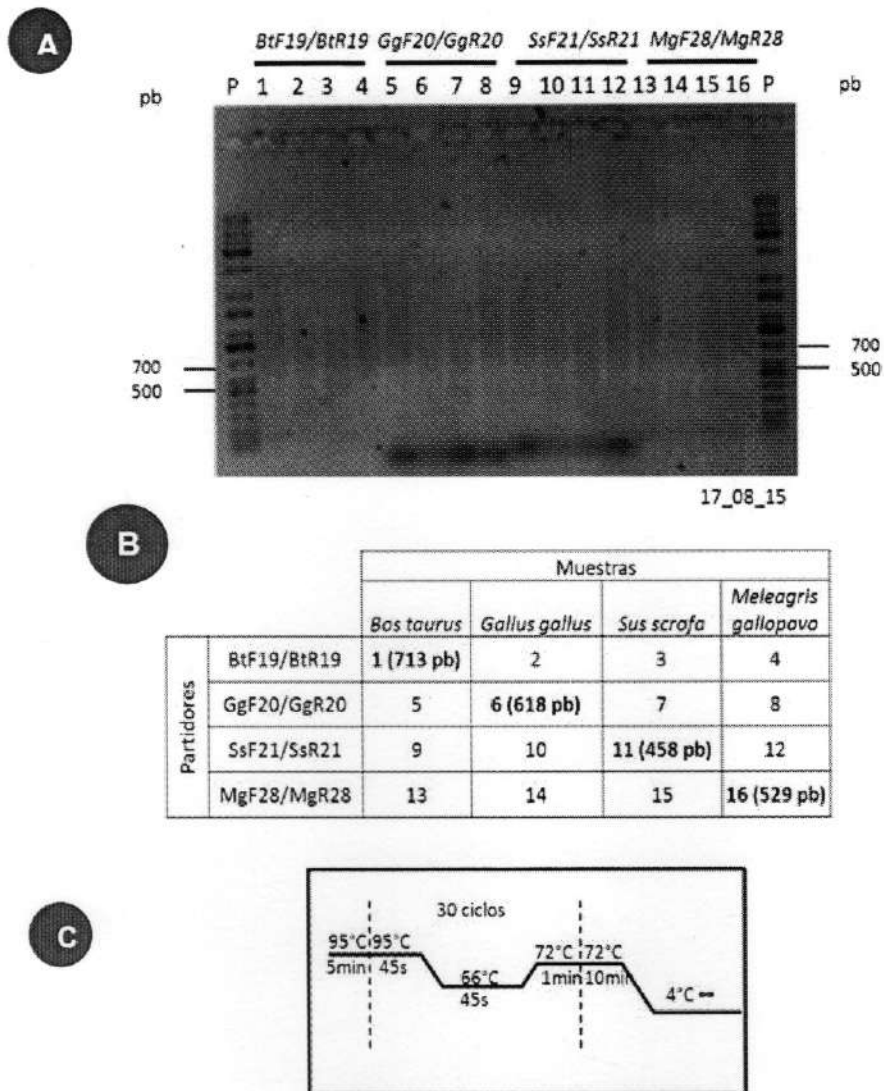
- Para la selección de los partidores y optimización de las condiciones de PCR se realizaron múltiples pruebas y repeticiones de los protocolos hasta seleccionar los cuatro partidores especie específicos y se determinaron las condiciones óptimas de PCR para obtener los resultados esperados.
- Las pruebas de sensibilidad desarrolladas nos permitieron determinar el alcance de detección de ADN de los partidores especie específicos siendo el de *G. gallus* el más sensible detectando hasta una concentración de 0.0001 ng/μL de ADN.
- Con las pruebas de identificación de especies implementadas se determinó cuáles de estas están presentes en las 16 muestras de productos procesados y así compararlo con el contenido expuesto en sus etiquetas encontrando inconsistencias en 9 de estos productos tanto nacionales como importados.
- Los partidores especie específicos que fueron seleccionados nos permitieron desarrollar la prueba de PCR múltiple tomando como criterio de selección de los conjuntos, la diferencia de los tamaños de los amplicones de cada partidor.
- Con los conjuntos de partidores seleccionados se aplicaron pruebas tanto en muestras puras como procesadas lo cual nos permitió tener un bajo consumo de reactivos y un menor tiempo de análisis de un número dado de muestras.
- De las 6 reacciones múltiples aplicadas en muestras puras las reacciones RM3 y RM4 fueron óptimas para aplicarlas en las muestras de productos procesados tomando como referencia la compatibilidad entre los partidores.

## IX ANEXOS

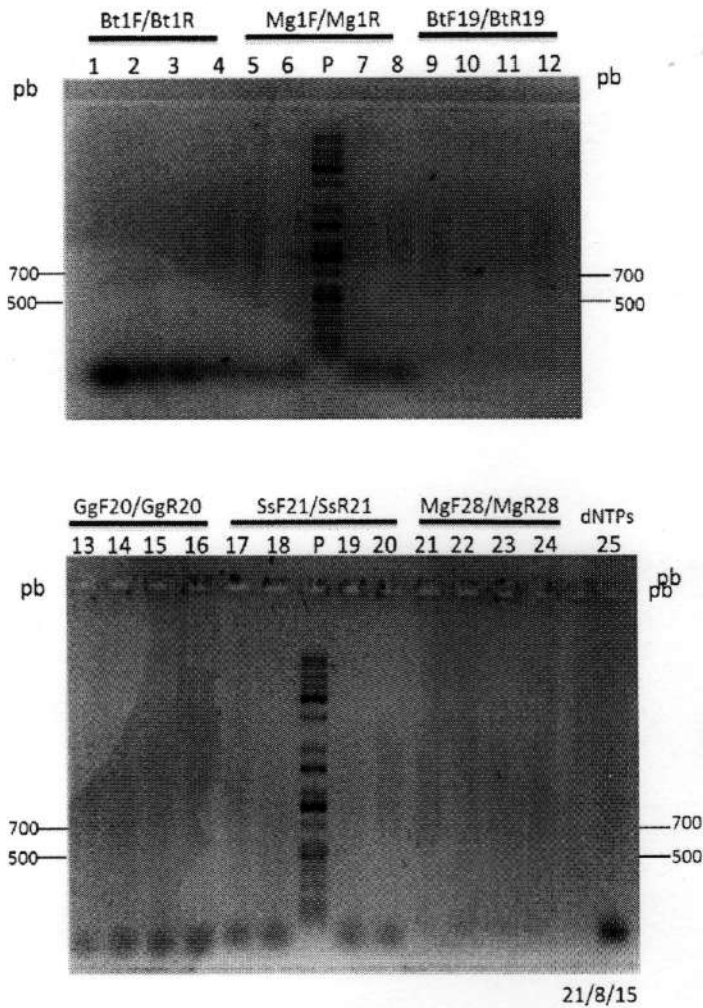
### **Pruebas adicionales para optimizar reacciones de PCR y resolución de problemas.**

Durante el desarrollo de los experimentos algunos resultados (Figuras 22, 23, 24 y 25) fueron completamente desconcertantes, en donde ni en los controles positivos se obtuvo amplificación. Para contestar a la interrogante de qué estaba sucediendo y luego de revisar diferentes aspectos que influyen en el éxito de la PCR, uno de las variables que había cambiado en ese momento fue la enzima polimerasa utilizada (Invitrogen®, por dos enzimas de la marca IBIS®). En el experimento diseñado para verificar la solución amortiguadora que contenía Mg, cofactor indispensable para la reacción se detectó que el problema radicaba en el amortiguador, el cual carecía del magnesio requerido (Figura 24). Fueron seleccionados un par de partidores previamente probados con su respectivo molde de ADN (*B. taurus*), en el experimento se determinó claramente que solamente al adicionar  $MgCl_2$ , la polimerasa amplificaba.

En las identificaciones de especies también es importante mencionar que el manejo de las muestras desde la extracción y posterior manipulación de las muestras de ADN, debe hacerse procurando evitar las contaminaciones de las muestras puras, para lo cual, durante el desarrollo de los experimentos también, realizaron renovaciones de las extracciones de ADN para mantener la integridad de las muestras puras.



**Figura 22.** Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados, muestras de ADN por especie y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.

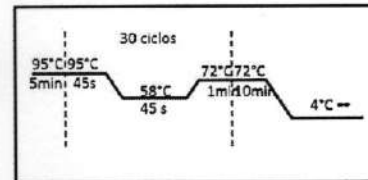


**A**

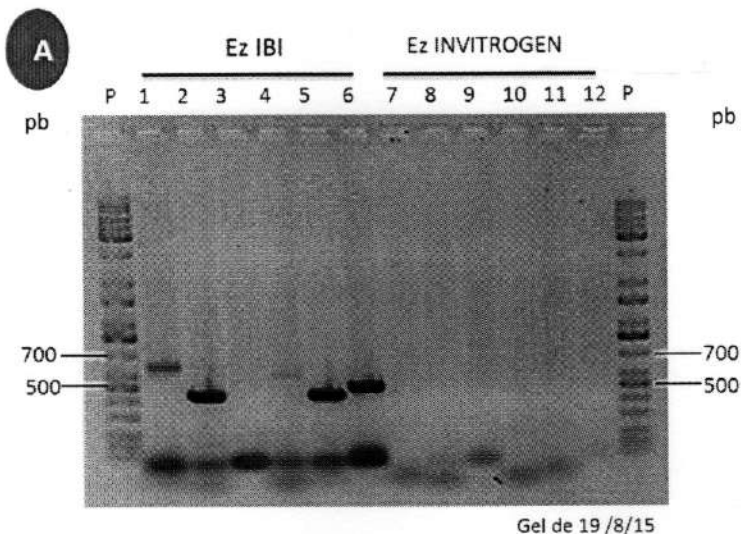
**B**

Partidor	ADN			
	Bt	Gg	Ss	Mg
Bt1F/Bt1R	1(700pb)	2	3	4
Mg1F/Mg1R	5	6	7	8(450pb)
BtF19/BtR19	9(713pb)	10	11	12
GgF20/GgR20	13	14(618pb)	15	16
SsF21/SsR21	17	18	19(458pb)	20
MgF28/MgR28	21	22	23	24(529pb)

**C**

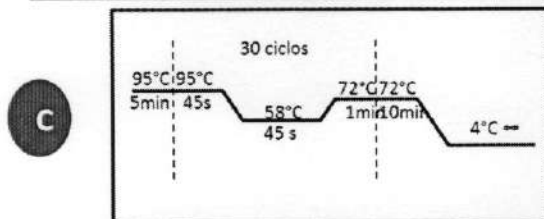


**Figura 23.** Pruebas para selección de partidores especie específicos aplicadas a las muestras puras de ADN de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados, muestras de ADN por especies y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.

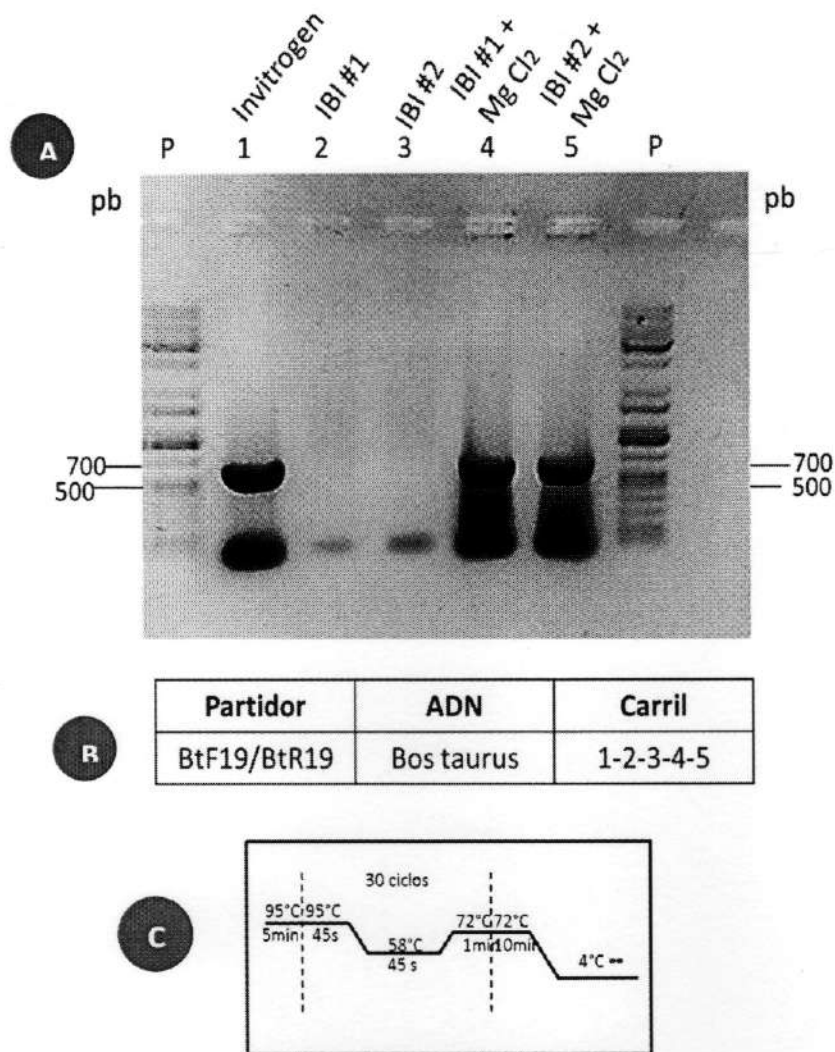


**B**

Partidor	Muestra	EZ IBI	EZ Invitrogen
Bt1F/Bt1R	Bt	1(700pb)	7(700pb)
Mg1F/Mg1R	Mg	2(450pb)	8(450pb)
BtF19/BtR19	Bt	3(713pb)	9(713pb)
GgF20/GgR20	Gg	4(618pb)	10(618pb)
SsF21/SsR21	Ss	5(458pb)	11(458pb)
MgF28/MgR28	Mg	6(529pb)	12(529pb)



**Figura 24.** Prueba de enzimas IBI e INVITROGEN con partidores especie-específicos en ADN de *B. taurus*, *G. gallus*, *S. scrofa* y *M. gallopavo*. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos. **B.** Descripción de la combinación de partidores utilizados y el número de carril que le corresponde en el gel. **C.** Condiciones de PCR para los partidores usados en este experimento.



**Figura 25.** Comprobación la capacidad de polimerización de enzimas polimerasas empleadas de diferentes marcas comerciales y pruebas de soluciones amortiguadoras para las reacciones adicionando Mg en forma de  $MgCl_2$  En **A**. **B**. **C**. se muestran las electroforesis en gel de agarosa con las combinaciones de partidores y las condiciones de PCR, respectivamente.



## X. REFERENCIAS

Aljanabi, S.M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692-4693.

Aranguren-Mendez, J., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil- Ontiveros, Y., Yáñez, L., Borjas, L., Zabala, W., (2009). Identificación de especies en productos de origen animal mediante PCR. *FCV –LUZ/ (19)2:159-164*.

Ballin, N.Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 89:577-587

Bermingham, N., Luetlich, K., (2003). Polymerase Chain Reaction and its Application. *Current Diagnostic Pathology* 9:159-164

Boari, R., Chuard, N., Fernández, V., Pouiller, P. (2013). Mercado internacional de las carnes bovina, porcina y aviar. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina. Edición Barzola.

Calvo, J.H., Zaragoza, P., OSTA, R. (2001). Technical Note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *Journal of Animal Science* 79:2108-2112.

Contraloría, INEC, 2013. Existencia, Sacrificio y Exportación de Ganado Vacuno, Porcino y Aviar en la república de Panamá, por provincia y comarca indígena. Publicado el 21 de mayo del 2011 en :[https://www.contraloria.gob.pa/inec/publicaciones/Publicaciones.aspx?ID\\_SUBCATEGORIA=13&ID\\_PUBLICACION=589&ID\\_IDIOMA=1&ID\\_CATEGORIA=4](https://www.contraloria.gob.pa/inec/publicaciones/Publicaciones.aspx?ID_SUBCATEGORIA=13&ID_PUBLICACION=589&ID_IDIOMA=1&ID_CATEGORIA=4)

Cortazar Martínez, A., Silva Rincón, E.P., (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. PCR. Recuperado de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>

Cota-Rivas, M., Vallejo-Cordoba, B. (1997). Capillary electrophoresis for meat species differentiation. *Journal of Capillary Electrophoresis* 4:195-199

Cummings, A.S., Thorgaard, G.H. (1994). Extraction of DNA from fish blood and sperm. *Biotchniques* 17:426.

Chávez R., Felmer R., Floody H., Catrileo A., Sagredo B., Iraira S., Folch C. (2005). Implementación de un Sistema de Trazabilidad Molecular de la carne Bovina: selección de la muestra biológica definitiva, y evaluación práctica en una planta de procesamiento de carne. Laboratorio de Biotecnología Animal, Instituto de Investigaciones Agropecuaria.

Fajardo, V. (2009). Autenticación de Carnes Procedentes de Especies de Caza Mayor por Técnicas Genéticas. 14-18

FAO-PRODAR, 2014. Fichas técnicas de Procesados de Carnes. Publicado en: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/inpho/documents/PROCESADOS-CARNES.pdf>

Ghovvati, S., Nassiri, M.R., Mirhoseini, S.Z., Heravi Moussavi, A., Javadmanesh., (2009). Fraud identification industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 20:696-699.

Hargin, K.D. (1996). Authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science* 43:277-289

Hernández-Chávez, J.F., González-Córdoba, A.F., Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G.R., Camou, J.P., Vallejo-Córdoba, B. (2007). Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados térmicamente. *NACAMEH* (1)2:97-109

Kesmen, Z., Sahin, F., Yetim, H., (2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages 77:649-653

Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., Yetim, H., (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Science 82:444-449.

Kitpipit T., Sittichan K., Thanakiatkrai P., (2014). Direct-Multiplex PCR Assay for Meat Species Identification in Food Products. Food Chemistry 163:77–82

Linares W., Alomar D., Gallo C. (2012). Potencial Uso de Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarojo cercano (NIRS) para identificación de Charqui de bovino, llama y caballo. Vet (Mex),(2)43:133-141

Liu, Z.J., Cordes, J.F., (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238:1-37.

Mafra, I., Silva, S.A., Moreira, E.J.M.O., Ferreira da Silva, C.S., Oliveira, M.B.P.P. (2008). Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. Food Control, 19, 1183–1190.

Mullis K., Faloona F. (1987). Specific síntesis of DNA in Vitro via a polymerase catalysed chain reaction. Methods enzymol.335-340.

Musto, M., (2011). DNA Quality and Integrity of Nuclear and Mitochondrial Sequences from Beef Meat as Affected by Different Cooking Methods 523-528.

OIRSA, 2011. Descripción y Análisis de los Principales Actores que Conforman la Cadena Agroalimentaria de Carne Bovina y Productos Cárnicos – Panamá. Publicado en: <http://www.rastreabilidad.org/cadena.php?id=141&s=9>

Pérez de Castro, Ana María. S.F. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR. Recuperado de

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%F3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf?sequence=1>

Rodríguez, J.J., (2008). La carne como alimento. EROSKI CONSUMER. Disponible en <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2006/02/01/22212.php>

Rodríguez, M., (2004). Utilización de Técnicas Genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e Inmunológicas (Elisa), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en foie gras. 117-124.

Rojas M., González I., Martín de Santos R., (2009). Identificación de Carnes Procedentes de Aves de Caza y de la Avicultura Alternativa Mediante una Técnica de PCR en Tiempo Real. (3)2:79-89.

Rotureau B., Ravel C., Couppie P., Pratlong, F., Nacher, M., Dedet, J.P., (2006). Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis to identify the main New World Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. J. Clin. Microbiol. 44:459-467.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science. 239, 487.

Smith, L., (2013). Francia investiga un supuesto fraude en el caso de la carne de caballo. Publicado en la página web de CNN (Mex.) el 12 de febrero del 2013. <http://mexico.cnn.com/salud/2013/02/14/francia-investiga-un-supuesto-fraude-en-el-caso-de-la-carne-de-caballo>

Somma, M., Querci, M., S.F. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión nº 6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C., (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. (2)2:70-78.