



Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.

**“DETECCIÓN DE ADULTERACIÓN DE CARNE CRUDA Y
PROCESADA TÉRMICAMENTE MEDIANTE UN
PROTOCOLO ANALÍTICO POR qPCR MÚLTIPLE”**

POR:

JOSÉ ISIDRO MÉNDEZ ROMERO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA.

DICIEMBRE DE 2014

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José Isidro Méndez Romero, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.




Dr. Aarón Fernando González Córdova
Director de tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesora



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor



Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
Asesora



Dra. Armida Sánchez Escalante
Asesora



Dr. Juan Pedro Camou Arriola
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por permitirme realizar mi formación como Maestro en Ciencias.

Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Animal

A mi Director de tesis, **Dr. Aarón Fernando González Córdova** que me dio todo su apoyo, también por su gran paciencia y dedicación que hizo de esta maestría una gran experiencia.

A los miembros del comité de tesis: **Dra. Belinda Vallejo Galland, Adrián Hernández Mendoza, Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán, Dra. Armida Sánchez Escalante** y el **Dr. Juan Pedro Camou Arriola** por su apoyo en el desarrollo y culminación de todo el presente estudio.

A la Coordinación de Posgrado del CIAD por el apoyo económico para parte de los gastos que representaba llevar a cabo la estancia de investigación en el extranjero.

A **Cesare Camma** y **Marco Di Domenico** por su apoyo técnico y conocimientos brindados durante la estancia de investigación que realicé en el Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise "Giuseppe Caporale", Teramo, Italia.

Al **M. en C. Ricardo Reyes Díaz** por la revisión y el asesoramiento para la culminación de este escrito de tesis.

Agradezco a el **IBQ. José Daniel Wicochea Rodríguez** y al **MVZ. Christian Gómez Pineda** por el apoyo profesional que aportaron en el desarrollo del presente trabajo.

Un agradecimiento especial a mi novia **Giovana López García** por todos los buenos momentos que pasamos juntos durante la maestría.

DEDICATORIA

A mis padres Ana María Romero Moyao e Isidro Méndez Nava y a mi hermana Ana María Méndez Romero que me apoyaron siempre moral y económicamente cuando tuvieron la oportunidad.

“ Para hacer una manzana primero debes crear un universo ”

Carl Sagan

*“ Si tengo mil ideas y sólo una termina por funcionar, me siento
satisfecho ”*

Alfred Nobel

“ Si buscas resultados distintos no hagas siempre lo mismo ”

Albert Einstein

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Carne y Productos Cárnicos.....	4
2.1.1. Características y tipos de productos cárnicos.....	5
2.1.2. Comercialización y consumo de carne y productos cárnicos.....	8
2.2. Adulteración de Productos Cárnicos por Sustitución de Especies	11
2.2.1. Adulteración de productos cárnicos de res con carne de caballo	12
2.2.2. Adulteración de productos cárnicos con soya.....	14
2.3. Aseguramiento de la Calidad	16
2.4. Técnicas Analíticas para Determinar la Adulteración por Sustitución de Especies en Productos Cárnicos.....	18
2.4.1. Técnicas basadas en el análisis de proteínas	20
2.4.1.1. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima.....	20
2.4.1.2. Electroforesis capilar.....	21
2.4.2. Técnicas basadas en el análisis de ADN.....	22
2.4.2.1. Fundamento de la amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	24
2.4.2.2. PCR-Electroforesis Capilar en Gel.....	26
2.4.2.3. PCR en Tiempo Real Cuantitativa	26

	Página
2.3.2.4. Tipos de moléculas fluorescentes empleadas en la qPCR	29
2.4. Identificación y Cuantificación del ADN de Múltiples Especies	
Mediante qPCR	33
III. HIPÓTESIS.....	37
IV. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo General	38
4.2. Objetivos Específicos	38
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1. Estrategia Experimental	39
5.1. Reactivos y Materiales	41
5.2. Obtención de las Muestras.....	41
5.3. Elaboración de Estándares de Res, Caballo y Soya	43
5.4. Preparación de Homogeneizados de Muestras Comerciales.....	43
5.5. Extracción de ADN	45
5.6. Cuantificación y Determinación de la Pureza del ADN Total.....	46
5.7. Selección de Cebadores y Sondas de Hidrólisis Taqman.....	48
5.8. Diseño del Control de Amplificación Interna.....	48
5.9. Construcción de Curvas Estándar para Res, Caballo y Soya	51
5.10. Composición de las Mezclas de Reacción y Condiciones de Amplificación del ADN.....	51
5.11. Optimización de la Concentración de ADN, Cebadores y Sondas Taqman Específicos.....	52
5.12. Elaboración de Curvas Estándar para qPCR Múltiplex	53

	Página
5.13. Cuantificación de la Proporción de Res, Caballo y Soya en los Estándares y en las Muestras de Productos Cárnicos Comerciales	53
5.14. Límite de Detección y de Cuantificación.....	55
5.15. Análisis Estadístico.....	55
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	56
6.1. Calidad y Concentración del ADN Extraído.....	56
6.2. Control de Amplificación Interna.....	60
6.3. Eficiencia de las Curvas Estándar de Res, Caballo y Soya.....	62
6.4. Ensayo qPCR múltiple.....	67
6.6. Detección y Cuantificación Simultánea de ADN en Estándares de Homogeneizados de Res, Caballo y Soya	77
6.7. Cuantificación de Muestras Comerciales Mediante el Sistema qPCR Multiplex	81
VII. CONCLUSIONES.....	85
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	86

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Precios al consumidor de productos cárnicos de pollo, cerdo y res comercializados en México para el 2013.....	9
Tabla 2. Productos cárnicos comerciales analizados en el presente estudio	42
Tabla 3. Mezclas experimentales de homogeneizados de res, caballo y soya	44
Tabla 4. Secuencias nucleotídicas de los cebadores y sondas Taqman específicos para res, caballo y soya	49
Tabla 5. Diluciones seriadas realizadas para la construcción de la curva estándar triple	54
Tabla 6. Concentraciones de ADN obtenidas de homogeneizados	57
Tabla 7. Valores de eficiencia, pendiente y coeficiente de determinación obtenidos de la optimización de la concentración de cebadores y sondas en qPCR individual	63
Tabla 8. Valores de Ct de la curva estándar triple de res, caballo y soya	72
Tabla 9. Cuantificación simultánea de estándares de homogeneizados de res, caballo y soya sin tratamiento térmico.....	78
Tabla 10. Cuantificación simultánea de estándares de homogeneizados de res, caballo y soya con tratamiento térmico.....	79
Tabla 11. Proporción de ADN de res, caballo y soya presente en los productos cárnicos comerciales analizados mediante el ensayo qPCR múltiplex	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Productos cárnicos típicos regionales de México	7
Figura 2. Comparación entre los métodos de análisis de proteínas y los de análisis de ADN para la identificación de especies.....	19
Figura 3. Técnicas basadas en la PCR que han sido empleadas en la identificación de especies en productos cárnicos	23
Figura 4. Curva típica de amplificación de PCR tiempo real.....	28
Figura 5. Curva estándar qPCR típica	30
Figura 6. Mecanismo de acción de las sondas Taqman.	32
Figura 7. Estrategia experimental general	40
Figura 8. Diseño del control de amplificación interna.....	50
Figura 9. Curvas de amplificación obtenidas a partir de las diluciones seriadas del IAC	61
Figura 10. Curvas de amplificación del ensayo qPCR individual	65
Figura 11. Curva estándar (Ct vs concentración de ADN) del ensayo qPCR individual.....	66
Figura 12. Prueba de reacción cruzada entre los cebadores de res, caballo y soya	68
Figura 13. Curvas estándar triple.....	70
Figura 14. Curva de calibración triple. a) ADN de caballo, b) ADN de res y c) ADN de soya.....	73
Figura 15. Correlación entre el valor real y el valor medido mediante el ensayo múltiple en la cuantificación de muestras triples de ADN en diferentes proporciones (50,25, 10 y 1%).	75

RESUMEN

La adulteración de productos cárnicos con carne de caballo o proteína de soya, es una práctica común que genera competencia desleal entre los procesadores de estos alimentos y sobre todo afecta a los consumidores debido al fraude económico que representa dicha acción, ya que el consumidor paga por un producto y recibe otro de menor calidad o precio. Asimismo, los productos adulterados representan un riesgo potencial a la salud de los consumidores, debido a la calidad desconocida de la materia prima utilizada en su elaboración y/o a la presencia de alérgenos no declarados en la etiqueta del producto. La técnica de PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) ha sido utilizada exitosamente para la identificación y cuantificación simultánea de diferentes especies presentes en alimentos crudos y/o procesados. No obstante, en la actualidad no existe evidencia sobre el potencial de su uso para la identificación y cuantificación simultánea de carne de res y caballo y soya en productos cárnicos. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar un protocolo analítico para identificar y cuantificar simultáneamente la proporción de carne de res, caballo y soya en mezclas de carne cruda y procesada térmicamente, mediante la técnica de qPCR múltiple. El protocolo analítico desarrollado permitió identificar satisfactoriamente a las dos especies bajo estudio (res, caballo) y soya, incluso en las mezclas procesadas térmicamente a 121 °C/15 min. El límite de detección del protocolo fue 250 pg para ADN de res y caballo, mientras que para soya fue 25 pg. Adicionalmente, se aplicó el protocolo desarrollado para el análisis de productos cárnicos procesados comerciales, detectándose adulteración con carne de caballo, así como la presencia de soya. La adición de carne de caballo y soya no se encontró declarada en la lista de ingredientes de los productos cárnicos procesados analizados en el presente.

Palabras clave: ADN, qPCR, detección y cuantificación, caballo, soya.

ABSTRACT

The adulteration of beef meat products with horse meat or soy protein, is a common practice that creates unfair competition between food producers and mainly affects consumers due to economic fraud representing such action, because the consumer pays for and obtains a product of lesser quality or another price. Also, adulterated products represent a potential health risk to consumers, due to the unknown quality of the raw material used in its preparation and/or the presence of undeclared allergens in the product label. The real-time quantitative PCR (qPCR) has been successfully used for simultaneous identification and quantification of different species present in raw foods and/or processed. However, currently there is no evidence on the potential use for the simultaneous identification and quantification of beef and horse meat and soybean products. The aim of this study was to develop and validate an analytical protocol to identify and simultaneously quantify the proportion of beef, horse and soy protein mixtures raw and thermally processed by multiplex qPCR. The analytical protocol developed successfully identify allowed under the three species studied (beef, horse and soybeans), even in thermally processed mixtures at 120 °C/15 min. The detection limit of the protocol was 250 pg for beef and horse DNA, whereas this one was determined at 25 pg for soy. Subsequently, the quantification of the proportion of DNA in beef and horse meat mixtures with and without treatment was achieved. Additionally, the use of this protocol in the analysis of meat, commercial products allowed to determine adulteration with horsemeat in 44% of beef meat products, as well as the use of soy in 70% of the products analyzed in which was not declared their presence.

Keywords: DNA, qPCR, quantification of proportions, beef, horse, soy

I. INTRODUCCIÓN

La adulteración de productos cárnicos es una práctica muy común que se realiza al modificar deliberadamente, la composición intrínseca de un producto, con el objetivo de obtener un lucro indebido (Ballin *et al.*, 2009). Dicha práctica se realiza para incrementar rendimientos a menores costos de producción y/o enmascarar alteraciones o contaminaciones en los alimentos. La matriz alimentaria en los productos cárnicos es muy compleja y permite la incorporación de ingredientes no permitidos, similares o sucedáneos (Fajardo *et al.*, 2010).

Uno de los ejemplos más comunes de la adulteración es la sustitución de componentes proteicos propios del alimento genuino, por otras especies animales o vegetales de menor costo, para la obtención de un mayor beneficio económico (Fajardo *et al.*, 2006; Hernández-Chávez *et al.*, 2012). Cuando dicha modificación (sustitución o adición) no se especifica debidamente en el etiquetado del producto se convierte en una práctica fraudulenta (Ducauze, 2006).

Como respuesta a las prácticas de adulteración, se han establecido diferentes metodologías analíticas para verificar la autenticidad de los productos cárnicos mediante la cuantificación de la proporción en que se encuentra la carne o material proteico de las especies que constituyen el producto; la mayoría de éstas técnicas basadas en el análisis de proteínas (González-Córdova *et al.*, 1998; Vallejo-Cordoba *et al.*, 2009; Asencio *et al.*, 2008).

En un nuevo enfoque analítico, otro tipo de metodologías se han desarrollado y aplicado exitosamente para la identificación de especies animales y/o vegetales en los productos cárnicos. Éstas son basadas en la detección de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), presentes en el alimento bajo estudio, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ballin *et al.*, 2009; Botero *et al.*, 2011).

Las metodologías basadas en el análisis de ADN cumplen mejor el propósito de identificación de especies debido a que son más sensibles, específicas, y a que el ADN es menos termolábil que las proteínas, lo cual permite el obtener mejores resultados con productos cárnicos procesados térmicamente (Herzalah, 2012; Mohamad *et al.*, 2013). Dentro de estas metodologías, las basadas en el empleo de la técnica PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) son las más exitosas para la cuantificación de la proporción de las especies animales y/o vegetales presentes en un alimento. Actualmente, gracias al empleo de sondas de hidrólisis, como las sondas Taqman específicas para especie, se ha facilitado detectar y cuantificar, de manera simultánea, varias especies en una misma reacción, llamándosele en tal caso “qPCR múltiple”, con la cual ha sido posible cuantificar hasta siete especies distintas a partir de una misma reacción (Köppel *et al.*, 2010). Adicionalmente, el uso de esta técnica permite disminuir el gasto de reactivos y tiempo de operación respecto a la qPCR individual, ya que se analizan más especies con el empleo de menos reacciones (Ghovvati *et al.*, 2009).

Actualmente, en algunos países de la Unión Europea, el empleo de la qPCR ha provisto la evidencia necesaria a las autoridades alimentarias reglamentarias para detener este tipo de fraude, de tal forma que ha sido posible determinar el patrón característico de dichas prácticas, o incluso detectar la sustitución y/o adición de especies no aptas para el consumo humano, como es el caso de animales medicados o especies no comerciales (FSAI, 2013; EURL, 2014).

Por otra parte, en México las Normas Oficiales Mexicanas, como la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 y la NOM-030-SCFI-2006, establecen los lineamientos a seguir para el etiquetado de todos los productos cárnicos comercializados en el territorio nacional. Sin embargo, la omisión de información en la etiqueta de los productos es común. Por ejemplo, existen antecedentes del empleo de carne de caballo o proteína de soya para la adulteración de productos cárnicos como carne de hamburguesas y varios tipos de embutidos (González-Córdova *et al.*, 1998; Flores-Munguía *et al.*, 2000) lo cual, además de implicar un fraude por el lucro indebido, podría poner en riesgo la salud del consumidor. Sin embargo, después de una búsqueda bibliográfica exhaustiva llevada a cabo en el presente año, no se encontraron protocolos basados en qPCR múltiple enfocados a la identificación y cuantificación de manera simultánea de dicha adulteración.

En base a lo anterior, el objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un protocolo analítico para identificar y cuantificar simultáneamente la proporción de carne de res, caballo así como soya en mezclas de carne cruda y procesada térmicamente, mediante la técnica de qPCR múltiple utilizando cebadores y sondas Taqman específicos para cada especie.

II. ANTECEDENTES

2.1. Carne y Productos Cárnicos

La carne y los productos cárnicos son alimentos altamente consumidos por la población humana debido a sus características sensoriales y de composición. El *Codex Alimentarius* (Código de Alimentos) de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) define a la carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin” (FAO, 2013). Por lo tanto, la carne debe estar libre de medicamentos suministrados a los animales antes del sacrificio y de cualquier otra sustancia que pueda comprometer la salud del consumidor (Pussa *et al.*, 2013), de lo contrario este alimento podría volverse un alimento altamente peligroso para la salud pública (Marques *et al.*, 2011).

La carne está compuesta de manera general por: agua, proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos que la vuelven un alimento altamente nutritivo (Pereira y Vicente, 2013). Desde el punto de vista nutricional, los componentes más importantes de la carne son sus proteínas de alta calidad, ya que contienen todos los aminoácidos esenciales, así como minerales y vitaminas que son altamente biodisponibles (Lawrie *et al.*, 1998; Lombardi-Boccia *et al.*, 2005; FAO 2013).

Adicionalmente, las proteínas de origen animal poseen mayor digestibilidad y son más biodisponibles que las proteínas de origen vegetal

(Hoffman y Falvo, 2004). Lo anterior hace de la carne y los productos cárnicos, la fuente más importante de estas biomoléculas, reafirmando su importancia en la dieta humana. Por otra parte, este hecho también ha vuelto a la carne el producto pecuario de mayor valor económico (Caldentey y Giménez, 2004; Weiss *et al.*, 2010). Ésto conlleva a que los consumidores de bajos recursos económicos, difícilmente pueden adquirir una gran variedad de productos cárnicos para incluirlos en su dieta. Sin embargo, en mayor o menor medida la carne es un alimento altamente consumido en el mundo (FAO 2013).

De acuerdo a organismos nacionales e internacionales, las fuentes más frecuentes de suministro de carne son las especies de animales domésticos como el ganado vacuno, porcino y las aves de corral, y en menor medida, los búfalos, ovejas, cabras y caballos (FAO, 2013; SAGARPA, 2012). El tipo de animal utilizado depende generalmente de la región en la que se comercialice la carne.

2.1.1. Características y tipos de productos cárnicos

La elaboración de productos cárnicos se emplea para aprovechar al máximo la carne y subproductos del sacrificio de animales para consumo. Así, los productos cárnicos pueden ser elaborados con carne del músculo, grasa, otros tejidos animales como vísceras y sangre (Price, 1994). Particularmente, en México, los productos cárnicos pueden contener proteínas de origen vegetal como la soya (NOM-051-SCFI/SSA1). Adicionalmente, para otorgarles características especiales, estos productos son tratados física y/o químicamente. Algunos de estos procesos son: salazón y curado, sazonado y aplicación de ingredientes no cárnicos, embutido, secado y fermentación, ahumado, tratamiento térmico (pasteurización y esterilización) (Price, 1994; Resurrección *et al.*, 2004).

Los distintos tipos de componentes y tratamientos térmicos por medio de los cuales son elaborados los productos cárnicos generan sabores característicos que son formados principalmente por las reacciones de Millard y la degradación de lípidos, lo que genera una gran cantidad de compuestos volátiles relacionados directamente con el sabor del alimento (Mottram, 2007). Adicionalmente, estos compuestos pueden reaccionar con los aditivos de la carne, modificando el perfil general de compuestos que contribuyen al sabor de un producto cárnico en particular (Mottram, 1998). Por otra parte, los componentes de estos alimentos no deben afectar la salud del consumidor, por ello a menudo se realiza la reformulación de productos cárnicos con la finalidad de obtener un alimento más saludable (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2001).

En algunas zonas geográficas existen productos cárnicos, que con el paso del tiempo se han vuelto típicos de esa región, estos se caracterizan por un determinado proceso o por el tipo de ingredientes empleados para su elaboración que generalmente pertenecen a la misma zona (Quintero-Salazar *et al.*, 2011). Por ello, este tipo de productos representa una herencia cultural, geográfica e histórica para las regiones en donde son producidos. En México existe una gran variedad de este tipo de alimentos regionales. Algunos de ellos se presentan en la Figura 1. Los embutidos como el chorizo son altamente producidos en el centro del país, en donde es elaborado con un típico color verde que lo caracteriza e identifica a nivel nacional (Austria-Magaldi, 2007; Quintero-Salazar *et al.*, 2011). La carne cecina de res es producida en la región Huasteca y en algunas estados como Morelos (Reyes-Cano *et al.*, 1994). Por otra parte, el noroeste del país presenta una alta producción de carne de res y cerdo; por ello, en algunas estas regiones es común la elaboración de carne machaca hecha con carne seca de res desmenuzada (Mateo *et al.*, 2009).



Carne Machaca



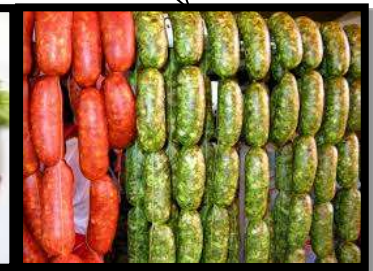
Carne Seca



Chilorio



Cecina



Chorizo

Figura 1. Productos cárnicos típicos regionales de México

2.1.2. Comercialización y consumo de carne y productos cárnicos

La comercialización de la carne se trata con suma atención, ya que debido a su composición, es un alimento altamente perecedero, debido a que posee una alta actividad de agua y a que está compuesta por proteínas y lípidos que favorecen el crecimiento de microorganismos que la deterioran y que además pueden comprometer la salud del consumidor (Marques *et al.*, 2011).

En los países industrializados la carne fresca procede en su mayor parte de modernas instalaciones de sacrificio, y durante su despiece, transporte y comercialización, se le aplica una cadena de frío ininterrumpida que impide su degradación y el crecimiento microbiano (Maldonado-Siman *et al.*, 2014). En los países en desarrollo, la distribución de carne fresca sigue realizándose en los mercados tradicionales de productos frescos o en puestos callejeros (FAO, 2013). En México, el sacrificio de animales para abasto se ha llevado a cabo desde hace varios años en plantas Tipo Inspección Federal (TIF), en rastros municipales y particulares, y en mataderos clandestinos (Manzano y Aluja, 1998; Maldonado *et al.*, 2005).

El precio de la carne depende del tipo de la especie así como del corte que se elija. En la Tabla 1 se muestran los precios de tres especies altamente consumidas en México como son pollo, el cerdo y la res, en donde se observa que las diferencias de los precios entre las especies presentan diferencias de hasta 400 %. Las cifras mostradas son los precios promedio obtenidos de 19 ciudades del país en un estudio realizado por la Procuraduría Federal del Consumidor a finales del año 2013.

Tabla 1. Precios al consumidor de productos cárnicos de pollo, cerdo y res comercializados en México para el 2013

Producto	Precio promedio por Kilo (\$)
Carne de cerdo	
Pernil con hueso	53.71
Espinazo	61.49
Molida o pulpa molida	62.92
Milanesa	66.08
Carne de Pollo	
Entero con vísceras o tipo súper	34.67
Pierna o bate	47.43
Pechuga con hueso o anatómica	71.30
Carne de res	
Retazo con hueso o cocido comercial	61.99
Molida de res	73.69
Falda o para deshebrar	93.53
Bistec de espaldilla	95.07
Carne para asar	95.86
Bistec diezmillo	96.58
Milanesa	97.66
Molida Top Sirloin	98.48
Chuleta, o chuleta costilla	112.75
Filete limpio	259.08

Fuente: PROFECO, 2013

El consumo de carne en México y el mundo ha aumentado en los últimos años, y se espera siga incrementando, especialmente en países en desarrollo, debido al aumento en el ingreso económico disponible de la población (FAO, 2013). Uno de los tipos de carne más consumida en el mundo es la carne de res; es después de la carne de aves de corral, la más comercializada en México, con una producción estimada en 2013 de 1808.28 millones de toneladas (AMEG, 2014). Para el mismo año, México tuvo un consumo *per cápita* de 16.9 Kg, superior al de muchos otros países en vías de desarrollo (SAGARPA, 2012). Cabe señalar que, actualmente en algunos países de Europa y Asia, la carne de caballo se ha vuelto una alternativa al consumo de carne de res.

El consumo de carne de caballo se ha aumentado con el paso del tiempo en los países de la Unión Europea, como una alternativa al consumo de la carne de res, debido principalmente a que tiene bajo contenido de grasas (Lorenzo *et al.*, 2014). El consumo frecuente de carne de caballo está relacionado con importantes beneficios a la salud debido a que contribuye a reducir el colesterol de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), y es fuente de ácidos grasos como el omega 3, lo que favorece la disminución de enfermedades cardiovasculares (Bó *et al.*, 2013).

En México el consumo de carne de caballo es actualmente considerado como un tema tabú, muy probablemente debido al desconocimiento de la población sobre los beneficios del consumo de este tipo de carne. Por lo tanto, en el país este tipo de carne se produce en su mayoría con fines de exportación a diversos países de Europa y Asia como Rusia, Bélgica, Holanda y Japón; ocupando el segundo lugar a nivel mundial en exportación de carne de esta especie, sólo después de China (SAGARPA, 2012). Estas exportaciones representaron para el año 2012 un ingreso económico por más de 68 millones de dólares por el envío y venta de carne de caballo.

2.2. Adulteración de Productos Cárnicos por Sustitución de Especies

La adulteración de productos cárnicos es una práctica ampliamente extendida en todo el mundo, que afecta seriamente la calidad de los productos cárnicos, dificulta la justa comercialización y podría poner en grave riesgo la salud de los consumidores. Ésta consiste en alterar la composición intrínseca de un producto con el objetivo de obtener lucro indebido, generalmente mediante el empleo de materias primas de menor valor económico a los registrados en su etiqueta (Ballin, 2010). La falta de coherencia entre la composición de estos productos y la información incluida en su etiqueta implica un incumplimiento de Normas Oficiales como la NOM-030-SCFI-2006 y NOM-213-SSA1-2002, entre otras, lo que puede catalogarse jurídicamente como un fraude (Ducauze, 2006). Según el artículo 35 del Reglamento de la Ley General de Salud (LGS), un producto o materia prima se considera alterado, cuando por efecto de cualquier causa, haya sido objeto de modificaciones en su composición intrínseca, lo que puede reducir su aporte nutritivo, lo conviertan en nocivo para la salud o que modifique sus características fisicoquímicas u organolépticas, rebasando los límites autorizados por las Normas Oficiales Mexicanas (LGS, 2004). Por tales motivos, cuando se logra comprobar la adulteración de los alimentos, la práctica amerita sanciones administrativas o jurídicas.

La sustitución de especies en productos cárnicos, es uno de los tipos más frecuentes de adulteración, probablemente debido a que en estos alimentos la carne es la materia prima y por lo tanto la adición o sustitución con carne de especies de menor valor económico, disminuye considerablemente los costos de producción (Fajardo *et al.*, 2008). Este fraude se ha comprobado en varios países del mundo, tales como: México, Estados Unidos de América, Brasil, Turquía, Suiza y El Reino Unido (Ballin, 2010).

Uno de los casos de sustitución de especies que actualmente ha llamado la atención de los consumidores es la adulteración de productos cárnicos de res con carne de caballo. Más allá de un tema tabú, la presencia de carne no reportada podría implicar un riesgo a la salud debido a la calidad desconocida de la materia prima. Estudios al respecto han demostrado que la carne de especies no reportadas en la etiqueta de productos cárnicos, frecuentemente contienen drogas veterinarias, o no poseen la calidad microbiológica necesaria (Premanandh, 2013; Püssa, 2013). En otra vertiente, otro tipo de adulteración bastante común, pero poco estudiado en México, es la sustitución total o parcial de proteínas de origen animal por proteínas de origen vegetal, específicamente con soya (González-Córdova *et al.*, 1998).

2.2.1. Adulteración de productos cárnicos de res con carne de caballo

A principios del año 2013, la Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda (FSAI, por sus siglas en inglés) dio a conocer a la opinión pública una serie de reportes que evidenciaron la adulteración con carne de caballo en productos cárnicos de res en algunos países de la Unión Europea, tales como Irlanda, Italia, España y Bélgica (FSAI, 2013). Las autoridades británicas declararon que se identificó la presencia de carne de caballo en carne para hamburguesa, y en algunos casos dichos productos estaban elaborados con 100% de carne de caballo; aun cuando estaban etiquetadas como únicamente elaboradas con carne de res. Por medio de los análisis realizados, se demostró la adulteración con carne de caballo en más del 37 % de los productos (FSAI, 2013). Otros productos que dieron resultados positivos en la presencia de carne de caballo fueron: lasaña, carne mechada, carne picada, espagueti a la boloñesa, carne de res Angus, los cuales eran comercializados por las principales cadenas comerciales del país. Adicionalmente, todos los productos previamente mencionados fueron retirados del mercado a causa del riesgo potencial que representaban para la salud pública, debido la calidad desconocida de la carne de caballo utilizada para la adulteración.

Este hecho creó una alarma alimentaria entre los consumidores en toda la Unión Europea, ya que, meses después se declaró que en la carne se encontró la presencia de una droga de uso veterinario llamada “fenilbutazona”, un antiinflamatorio utilizado comúnmente en caballos de carreras, el cual está prohibido para el uso en animales que serán dispuestos para la obtención de carne y productos cárnicos, ya que su presencia en grandes cantidades compromete la salud del consumidor (FSAI, 2013).

Por otra parte, en Turquía Ayaz *et al.* (2005) analizaron diversos productos cárnicos y determinaron la presencia de carne de caballo no declarada en carne cruda comercializada como carne de res.

En México, también se ha reportado la presencia de carne de caballo no declarada en la etiqueta de productos cárnicos. Flores-Munguia *et al.* (2000) evidenciaron este fraude en productos, tales como carne molida para hamburguesa y chorizo, comercializados en estados del Noroeste del país. En este estudio se encontró que el 39 % de las muestras de carne para hamburguesa contenían carne de caballo no reportada, mientras que el 11 % de las muestras de chorizo presentaban este mismo problema de adulteración. Por otra parte, Macías *et al.* (2000) realizaron un estudio para determinar la adulteración con carne de caballo en productos cárnicos comercializados en distintos tipos de carnicerías en el Norte del país, tales como: selectas, comerciales y populares. Estos autores no encontraron la sustitución fraudulenta de carne de caballo en las carnicerías de tipo selecta y comerciales. No obstante, en las carnicerías populares se determinó la adulteración del 57.1 % de los productos cárnicos, los que eran promocionados como elaborados con 100 % carne de res.

Es importante destacar que la carne de caballo por sí misma, no es un alimento peligroso, sin embargo, cuando es utilizada para la adulteración, se desconoce por completo su calidad sanitaria, hecho que sí pone potencialmente en riesgo la salud de los consumidores, ya que dicha carne se encuentra fuera de toda normatividad.

2.2.2. Adulteración de productos cárnicos con soya

Las proteínas vegetales como la soya también han sido ampliamente utilizadas en la adulteración de productos cárnicos (Belloque *et al.*, 2013). La soya es consumida de manera común en Latinoamérica, ya que representa parte importante de la dieta de la población, esto último debido a su bajo costo y alto aporte nutricional (Lombardi-Boccia *et al.*, 2005; Torres y Tovar-Palacio, 2009). A pesar de ello, la FAO recomienda consumir mínimo 20 g de proteína animal al día para evitar la malnutrición o subnutrición, debido a que éstas son consideradas de mayor calidad que las de origen vegetal, las cuales carecen de ciertos aminoácidos esenciales (FAO, 2013). Sin embargo, al igual que las especies animales, cuando la proteína de soya no es declarada en la etiqueta del producto o se encuentra en proporciones superiores a la cantidad máxima permitida, se incurre en un fraude.

En Brasil, Macedo-Silva *et al.* (2001) determinaron la presencia de soya en carne molida para hamburguesas que se encontraban expandidas como elaboradas con carne de res, cerdo o pollo. Estos autores determinaron que el 30.8 %, de un total de 39 productos analizados se encontraban adulterados con soya en proporciones superiores a las permitidas.

En la República-Checa, un estudio realizado por Renčová y Tremlová, (2009) demostró la adulteración con soya en diferentes marcas comerciales de salamis y chorizos. En este estudio, se encontró que el 84 % de los productos analizados dieron positivo para la presencia de soya, la cual no se encontraba reportada en la etiqueta de los productos.

Actualmente, la industria de alimentos en México utiliza a la soya como ingrediente en gran variedad de productos cárnicos comerciales como: salchichas, jamones y chorizos. No obstante, debido a que se ha comprobado que causa alergia a ciertos sectores de la población, la presencia de esta proteína siempre debe ser declarada en la etiqueta del producto. Adicionalmente, en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 se indica que el máximo

porcentaje de soya permitido en un producto ``cárnico`` es del 2%. Sin embargo, debido a su bajo costo ha sido encontrada excediendo los porcentajes registrados en la etiqueta, o presentándose en productos en los que incluso no se encontraba reportada (González-Córdova *et al.*, 1998).

También se ha evidenciado la presencia de soya no declarada en diversos alimentos, tales como: atún enlatado (Rodríguez, 2008; Ballin, 2010) así como chorizo etiquetado como elaborado exclusivamente con carne de cerdo (González-Córdova *et al.*, 1998).

La proteína de soya contiene fracciones que son altamente tóxicas para ciertos sectores de la población (Belloque *et al.*, 2011). Diversos estudios médicos en México, han reportado una reacción inmunológica anormal a esta proteína en pacientes hospitalizados por intoxicación con alimentos (Morfin-Maciel y Castillo-Morfin, 2011; García *et al.*, 2012). Un estudio realizado por Rodríguez-Ortiz *et al.* (2009) en el Centro Regional de Alergias e Inmunología Clínica de Monterrey, Nuevo León, México, se determinó que en los casos de alergia a leguminosas y cereales, la alergia a la soya es la más frecuente, superando a los casos de alergia provocada por consumo de trigo o cebada.

Debido a lo anterior, la omisión de la declaración de la presencia de proteína de soya en alimentos como son los productos cárnicos, es un riesgo latente para la salud de los consumidores presentan reacciones adversas a este tipo de proteína. De igual manera, en productos etiquetados como formulados con determinada proporción de proteína de soya como fuente de proteína o aditivo, debe declararse la proporción utilizada, ya que de lo contrario se considera también una adulteración (Belloque *et al.*, 2013).

2.3. Aseguramiento de la Calidad

En México existen Normas Oficiales que especifican las características ideales de los centros de sacrificio en el país, la información que debe contener la etiqueta de la carne y los productos cárnicos resultantes, así como del almacenamiento y manejo de estos alimentos, todo lo anterior con la finalidad de asegurar la justa comercialización y proteger la salud del consumidor. Algunas de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) que aplican en el contexto de los productos cárnicos son emitidas por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) que mantiene constante vigilancia en cuanto a la inocuidad de la carne y sus productos. Debido a las implicaciones que pueden tener la carne y sus productos en la salud de los consumidores, algunas NOM son emitidas por instituciones como la Secretaria de Salud (SSA), la cual además se ha encargado de la elaboración de manuales sobre el manejo adecuado de la carne. Todas las NOM emitidas son fundamentadas en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización (LFMN, 2012) y la Ley General de Salud (LGS, 2008).

Las principales normas oficiales sobre productos cárnicos son las siguientes: La NOM-051-SCFI/SSA1-2010 y NOM-030-SCFI-2006, que establecen las especificaciones sanitarias y la información comercial que debe ser declarada en la etiqueta del producto. Por lo tanto, cuando estas NOM no se cumplen para un producto cárnico, el consumidor corre el riesgo de que ciertos ingredientes no estén debidamente registrados en su etiqueta, y que la carne no posea la inocuidad necesaria para el consumo humano. Por otra parte, la NOM-213-SSA1-2002 establece entre sus lineamientos que los ingredientes descritos en la etiqueta del producto deben estar respaldados o aceptados por instituciones de reconocimiento nacional o internacional. Adicionalmente, la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 también establece que en los productos cárnicos deben ser declaradas las proporciones en las que se encuentran los ingredientes del alimento, debido a la importancia que tienen en las

características sensoriales y el valor económico del producto cuando se emplean especies de diferente precio.

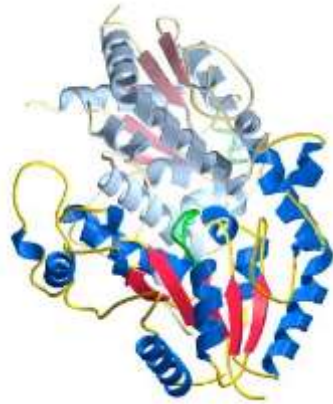
En términos generales, el objetivo primordial del aseguramiento de la calidad en la producción, manejo y comercialización de la carne y productos cárnicos es garantizar su inocuidad, permitir la competencia justa entre sus productores y expendedores, así como asegurar que el consumidor pueda obtener la información de estos productos por medio de su etiqueta. Esto último es un factor muy importante, ya que permite que el consumidor decida la aceptación o rechazo de un alimento en función de los componentes del alimento, considerando aquellos que no sean de su agrado, o inclusive que puedan poner en riesgo su salud.

Actualmente, según las normas oficiales vigentes, los productos en los cuales la composición se describe por completo, se conocen como auténticos. Así, un producto cárnico auténtico es aquel que posee en su composición las características que el consumidor espera de él, no posee encubrimientos de daños o adición de sustancias no declaradas y sus componentes están debidamente declarados en la etiqueta del producto (Luthy, 1999; Hernández-Chávez *et al.*, 2007). En base a la definición anteriormente descrita, el caso contrario sería un producto no auténtico o adulterado, lo cual constituye un fraude al consumidor. Un caso particular es el de los alimentos típicos regionales, en los cuales el término "auténtico" abarca el hecho de que sean elaborados con los ingredientes típicos de la región (Ilbery y Kneafsey, 1999). Así, estos alimentos podrían considerarse no auténticos si son elaborados, por ejemplo, con las mismas especies animales pero pertenecientes a una región distinta. No obstante la adulteración por sustitución de especies es una práctica común, difícil detectar, ya que los productos cárnicos son matrices complejas y es muy difícil determinar a simple vista las especies que pueden llegar a componer al alimento. Por tal motivo, se han implementado técnicas analíticas que permitan determinar si un producto se encuentra adulterado (La Neve *et al.*, 2008).

2.4. Técnicas Analíticas para Determinar la Adulteración por Sustitución de Especies en Productos Cárnicos

La detección de una adulteración por sustitución de especies en productos cárnicos requiere del empleo de técnicas analíticas que permitan identificar moléculas características de la especie bajo estudio, ya sea de origen animal o vegetal, y que puedan estar presentes en el alimento. Según sea el propósito del análisis será el tipo de técnica analítica empleada, ya que existen técnicas analíticas basadas en la identificación de analitos que son degradados durante el procesamiento térmico al que se someten ciertos productos cárnicos durante su elaboración, por lo tanto aunque la técnica sea muy específica y sensible, si el analito es afectado, la metodología no puede ser aplicada para el análisis de ese alimento (Ballin *et al.*, 2009; Sentandreu y Sentandreu, 2014; Bottero y Dalmaso, 2011).

Las técnicas convencionalmente utilizadas para la identificación de especies, y la determinación de su proporción en el alimento, son las que se basan en el análisis de las proteínas específicas (marcadores proteicos) de la especie a identificar (Asensio *et al.*, 2008). Sin embargo, en la actualidad las técnicas en el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los componentes biológicos del alimento en estudio, han ido superando la precisión y sensibilidad respecto a las basadas en proteínas (Radonić *et al.*, 2004; Mafra *et al.*, 2008). En base a lo anterior, las técnicas de análisis de moléculas específicas de ADN (marcadores genéticos) pueden ser consideradas como una herramienta confiable para la autenticidad de alimentos, incluso en aquellos procesados térmicamente (Herzallah, 2012), en los cuales su análisis por técnicas convencionales resultaba problemático. En la Figura 2 se muestran las principales ventajas y desventajas del empleo de técnicas basadas en el análisis de proteínas y ADN para la identificación de especies animales y vegetales.



Métodos basados en el análisis de proteínas	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rapidez ➤ Bajo costo ➤ Sencillez ➤ Amplia disponibilidad de datos 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dificultad para analizar muestras procesadas térmicamente ➤ Necesario el buen estado de las muestras ➤ Interpretación de datos compleja ➤ Las proteínas varían en los diferentes tejidos

Métodos basados en el análisis de ADN	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Baja cantidad de muestra necesaria ➤ Análisis de muestras procesadas térmicamente ➤ Posibilidades cuantitativas 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Relativamente caros ➤ Personal especializado ➤ Menos información disponible



Figura 2. Comparación entre los métodos de análisis de proteínas y los de análisis de ADN para la identificación de especies
 Fuente: Modificado de Fajardo *et al.*, 2008

2.4.1. Técnicas basadas en el análisis de proteínas

Las proteínas que forman parte de las diferentes especies de los seres vivos tienen características únicas que se conservan entre los individuos pertenecientes a una misma especie, tales como la secuencia aminoácidos, su conformación y su respuesta a un determinado antígeno o tipo de proteínas (Sentandreu y Sentandreu, 2011). Dichas características pueden ser identificadas por medio de técnicas tales como: cromatografía de líquidos (Chou *et al.* 2007), electroforesis capilar (Cota-Rivas y Vallejo-Córdoba, 1997) inmunoensayos con antígenos específicos (Macedo-Silva *et al.*, 2000; Asensio *et al.*, 2008). Algunos investigadores en México han reportado protocolos de identificación de perfiles proteicos de carne de caballo, pollo, avestruz y proteína de soya, especies que por su abundancia y bajo costo pueden ser utilizadas para la adulteración de productos cárnicos (Meza-Márquez, *et al.*, 2010; Vallejo-Córdoba *et al.*, 2010). Sin embargo, la gran mayoría de las proteínas se desnaturalizan en los alimentos que son procesados térmicamente (Belloque *et al.*, 2013).

2.4.1.1. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima. En México, la técnica analítica establecida para la identificación de especies de carne y productos cárnicos es el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), que es una técnica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como el cambio de color cuando el reconocimiento antígeno-anticuerpo se lleva a cabo. Para la identificación de especies en carne y productos cárnicos por medio de esta técnica, se utilizan antígenos específicos para cada especie, los cuales interaccionan con los anticuerpos correspondientes (Giovannacci *et al.*, 2004).

Existen protocolos basados en la técnica ELISA para la cuantificación de la proporción de especies presentes en el alimento en estudio (Macedo-Silva *et*

al., 2011). Sin embargo, en el caso de los productos cárnicos procesados térmicamente, la interacción entre el anticuerpo del inmunoensayo y el antígeno, se ve seriamente afectada, lo que imposibilita la identificación de las especies bajo estudio y, por lo tanto, la cuantificación de las mismas en el alimento (Bottero y Dalmaso, 2011). Además, se ha reportado que los cambios llevados a cabo en el alimento procesado térmicamente pueden llegar a generar resultados falsos positivos debido a la probable pérdida de especificidad entre el antígeno del alimento y el anticuerpo de la especie a identificar (Picos, 1998).

2.4.1.2. Electroforesis capilar. Una situación similar sucede con la identificación de especies por medio del análisis de perfil proteico a través de técnicas más sensibles y robustas que el ELISA, como la electroforesis capilar. Mediante esta técnica se identifica a las especies mediante su perfil proteico (Vallejo-Córdoba *et al.*, 2005; Kvasnička, 2005). Con el empleo de la electroforesis capilar se han establecido sistemas analíticos para la identificación de especies cárnicas por medio de análisis multivariado aplicado a la electroforesis capilar en gel con gradiente desnaturizante (ECG-SDS) (Cota-Rivas y Vallejo-Córdoba, 1997), así como la diferenciación de especies como res y avestruz mediante el análisis de sus proteínas solubles por medio de la electroforesis capilar con gradiente desnaturizante (EC-SDS) (Vallejo-Córdoba *et al.*, 2010). Sin embargo, mediante la electroforesis capilar, al igual que con las técnicas espectrofotométricas, se pueden llegar a obtener perfiles proteicos muy complejos, lo que dificulta la correcta identificación de especies (Vallejo *et al.*, 2005). Además, los cambios que sufren las proteínas por el tratamiento térmico imposibilitan detectar a las proteínas debidamente, dificultando la cuantificación de la proporción en la cual se encuentra la especie de interés en un alimento, aun cuando el perfil proteico no sea muy complejo (Calvo *et al.*, 2001).

Debido a lo anterior, las técnicas analíticas aplicadas en el análisis de proteínas para la identificación de especies no son aptas para utilizarse con los productos cárnicos que poseen un tratamiento térmico. Adicionalmente, cuando

la identificación se ve afectada, por causa-efecto la cuantificación de la proporción de dichas proteínas también se ve perjudicada, lo que impide la correcta cuantificación de dichas proporciones. Por tal motivo, resulta necesario emplear otro tipo de técnicas basadas en moléculas que resistan los tratamientos térmicos a los que se somete la carne y los productos cárnicos, y así conocer el origen de la proteína utilizada en la elaboración del alimento.

2.4.2. Técnicas basadas en el análisis de ADN

El análisis de moléculas de ADN en la autenticación de alimentos, específicamente mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha superado los problemas de las técnicas basadas en el análisis de proteínas, ya que permite realizar la identificación de especies en alimentos procesados a temperaturas superiores a las de esterilización (121° por 15 min), y sólo se requiere una pequeña cantidad de muestra para el análisis (Lockley y Bardsley, 2000; Fajardo *et al.*, 2010; Bottero y Dalmaso, 2011). Adicionalmente, la variabilidad genética del ADN permite, mediante la PCR, el reconocimiento específico de regiones de ADN presentes en los seres vivos (Ballin *et al.*, 2009; Galiberti *et al.*, 2013). En la Figura 3, se muestran algunas de las técnicas empleadas en la identificación de especies en productos cárnicos.

La identificación de especies mediante PCR se realiza identificando regiones del ADN que sólo posean las especies de interés, sin importar la complejidad de la muestra, como la cantidad de especies que puedan componerla. Las regiones del ADN empleadas para la identificación de especies son conocidas como marcadores genéticos, ``blancos'', o también llamados *targets* (Lockley y Bardsley, 2000; López-Andreo *et al.*, 2005; Fajardo *et al.*, 2010).

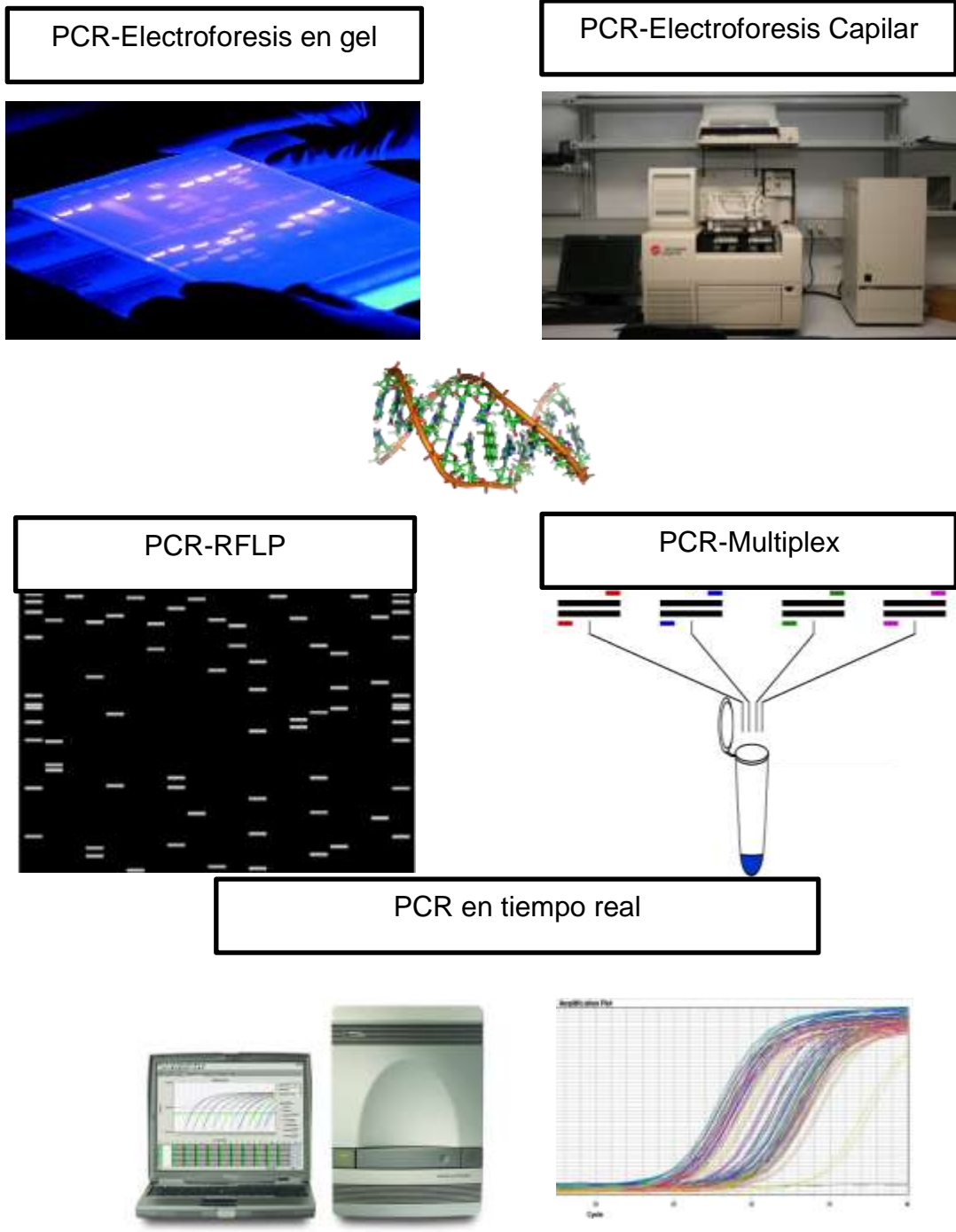


Figura 3. Técnicas basadas en la PCR que han sido empleadas en la identificación de especies en productos cárnicos (Ballin *et al.*, 2009). *RFLP significa Polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado.

2.4.2.1. Fundamento de la amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. La PCR es una reacción enzimática mediante la cual es posible generar, *in vitro*, una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN de interés, facilitando su análisis por medio de técnicas electroforéticas o espectrofluorométricas (Kubista *et al.*, 2006; Arya *et al.*, 2009).

Los componentes básicos de una reacción de PCR son: los cebadores también conocidos como ``*primers*´´, que son oligonucleótidos sintéticos (secuencias cortas de los nucleótidos G, C, T y A) diseñados para unirse o ``hibridar´´ en los extremos de la secuencia de ADN de interés, se utilizan dos cebadores para cada secuencia, uno por cada hebra del ADN, el que hibrida en la cadena 5´→3´ se le conoce como cebador sentido, directo, o ``*forward*´´ y al que hibrida en la cadena 3´→5´ es llamado cebador antisentido, reverso o ``*reverse*´´, la enzima ADN polimerasa que genera las copias de la secuencia delimitada con los cebadores a partir del ADN molde, una solución amortiguadora de pH, el cloruro de magnesio (MgCl₂), y la muestra del ADN a analizar (Kubista *et al.*, 2006).

Actualmente existe una gran cantidad de mezclas PCR pre-elaboradas, que contienen todos los componentes básicos para llevar a cabo la reacción, excepto el ADN y los cebadores (Applied Biosystems, 2012). Estas mezclas para PCR, conocidas como *Master Mix* han sido utilizadas ampliamente en diversos estudios enfocados en la identificación de especies (Köppel *et al.*, 2011; Alí *et al.*, 2012). El uso de dichas mezclas implica realizar menos pasos durante la elaboración de la mezcla de reacción, disminuyendo el tiempo invertido y el riesgo de contaminación de los reactivos (Köppel *et al.*, 2009).

La reacción en cadena llevada a cabo por la ADN polimerasa se logra al someter a la mezcla de reacción a una serie de cambios de temperatura llamados ``ciclos´´. Un ciclo consiste generalmente en tres temperaturas, la primera favorece desnaturalización parcial del ADN, es decir, la separación de las dos hebras que lo constituyen; la segunda temperatura permite el alineamiento de los cebadores en ambas hebras del ADN en su secuencia

de nucleótidos correspondiente; y finalmente, la tercera temperatura es la de elongación, en la cual la ADN polimerasa comienza la síntesis de la nueva cadena de nucleótidos. La primera temperatura es conocida como desnaturalización y siempre suele ser de 95 °C debido a que es la requerida para separar la doble hélice del ADN y permitir la posterior hibridación de los cebadores. No obstante, las segunda y tercer temperatura, conocidas como de alineamiento y elongación, respectivamente dependen principalmente de factores como la temperatura de alineamiento de los cebadores, la longitud del fragmento de ADN a sintetizar y el tipo de ADN polimerasa utilizando (Kubista *et al.*, 2006).

En cada ciclo de PCR producen nuevas copias de ADN, y considerando que cada nueva copia sirve de molde para la generación de una nueva, durante el transcurso de estos ciclos de temperatura que suelen ser de 25 a 40, se obtiene una gran cantidad de copias de la secuencia inicial. Dichos cambios de temperatura se llevan a cabo en un equipo llamado termociclador que realiza los cambios de temperatura rápidamente, y la cantidad de ciclos utilizada en la mayoría de los protocolos PCR es de 30 a 40 ciclos (Delidow *et al.*, 1993; Kubista *et al.*, 2006).

El producto resultante de la PCR puede ser analizado por medio de electroforesis en gel o electroforesis capilar. Ésta última ha sido utilizada para la cuantificación de la proporción de especies en alimentos (Rodríguez 2008; Hernández-Chávez *et al.*, 2011). Por otra parte, actualmente, una variante de la PCR, es la PCR en tiempo real que permite la detección del producto amplificado durante el transcurso de la reacción. Este hecho sitúa a esta técnica como la mejor técnica para la cuantificación de la proporción en que se encuentra una determinada especie componiendo a un alimento (Fajardo *et al.*, 2008). En este contexto, cuando la PCR en tiempo real es utilizada para realizar la cuantificación pasa a ser denominada como PCR tiempo real cuantitativa (qPCR) (Bustin *et al.*, 2009).

2.4.2.2. PCR-Electroforesis Capilar en Gel. La PCR-electroforesis capilar en gel (PCR-EG), ha jugado un papel importante en el desarrollo de metodologías para la identificación y cuantificación de la proporción de especies en alimentos crudos y procesados térmicamente (Rodríguez, 2008; Hernández-Chávez *et al.*, 2011). Rodríguez en el 2008, logró identificar la presencia de proteína de soya en atún enlatado mediante la cuantificación de las copias de ADN presentes en el producto PCR amplificado con esta metodología. Hernández-Chávez *et al.* (2011), desarrollaron una metodología cuantitativa basada en PCR-EG, mediante la cual se logró la identificación de hasta un 1% de la presencia de cerdo y pavo en muestras sometidas a tratamiento térmico.

Sin embargo, actualmente existen metodologías más aptas para la determinación de las proporciones cárnicas de las distintas especies que pueden llegar a componer a los productos cárnicos (Bottero y Dalmaso, 2011). Cómo las metodologías basadas en qPCR, que han permitido detectar hasta un 0.001% de una especie en un alimento (Ballin *et al.*, 2009). Mediante la qPCR la amplificación y el análisis de la muestra se realizan dentro de un mismo equipo, disminuyendo tiempo de operación y el riesgo de contaminaciones en el laboratorio por el manejo de los productos PCR (Arya *et al.*, 2009)

2.4.2.3. PCR en Tiempo Real Cuantitativa. La qPCR es una variante de la PCR convencional que funciona bajo el mismo fundamento de amplificación de ADN (uso de cebadores directo y reverso, ADN polimerasa, etc.) pero a diferencia de ésta última, en la qPCR, se agregan, además, a la mezcla de reacción moléculas fluorescentes que se unen al producto PCR formado. Además, el análisis se realiza dentro de un termociclador capaz de detectar y analizar la fluorescencia emitida por las moléculas fluorescentes de la reacción.

La fluorescencia es detectada en cada ciclo de la reacción de PCR y está relacionada directamente con la cantidad del producto formado (Wittwer *et al.*, 1998). Por tal motivo, a esta variante de la PCR se le conoce como PCR en

tiempo real, ya que la detección del producto se realiza al mismo tiempo que se genera. Los valores de fluorescencia (RFU) son graficados contra los ciclos en los cuales fueron registrados como se observa en la Figura 4, a éste gráfico se le conoce como curva de amplificación. La cantidad de producto formado durante los primeros ciclos es muy baja y no puede distinguirse del "ruido de fondo" o *background*. Para distinguir entre el ruido de fondo y la amplificación del ADN se fija un valor de fluorescencia a partir del cual se considerará una amplificación como positiva, este valor es conocido como umbral de detección. Una curva de amplificación de PCR tiempo real consta de dos fases principales, la fase de incremento exponencial del producto amplificado y la fase estacionaria. La posibilidad de analizar la fase exponencial de la amplificación del producto PCR, es el hecho que vuelve a la PCR en tiempo real una técnica que permite cuantificar la cantidad del ADN amplificado. Por tal motivo, a esta técnica también se le conoce como PCR en tiempo real cuantitativa o qPCR (Bustin et al., 2009; Rodríguez-Lazaro y Hernández, 2013).

La diferencia de la cantidad de ADN entre muestras con diferente fase exponencial se determina conociendo el número de ciclos que necesita el producto PCR para alcanzar un umbral de detección previamente establecido. De esta manera, una muestra que requiere más ciclos para ser detectada contiene una menor cantidad del ADN de interés y viceversa. El número de ciclos que requeridos para que una muestra alcance el umbral de detección es conocido como ciclo del umbral de detección o Ct, por sus siglas en inglés. La posibilidad de conocer el valor de Ct hace de la qPCR una técnica excepcional para la cuantificación del ADN y considerablemente más certera que la PCR convencional, ya que con esta última se relaciona la concentración del producto formado al final de la reacción con la cantidad del ADN de interés. Lo cual no siempre es cierto, ya que la cantidad de producto formado puede ser afectado por factores como: la cantidad de cebadores, moléculas fluorescentes o dNTP's (Kubista et al., 2006).

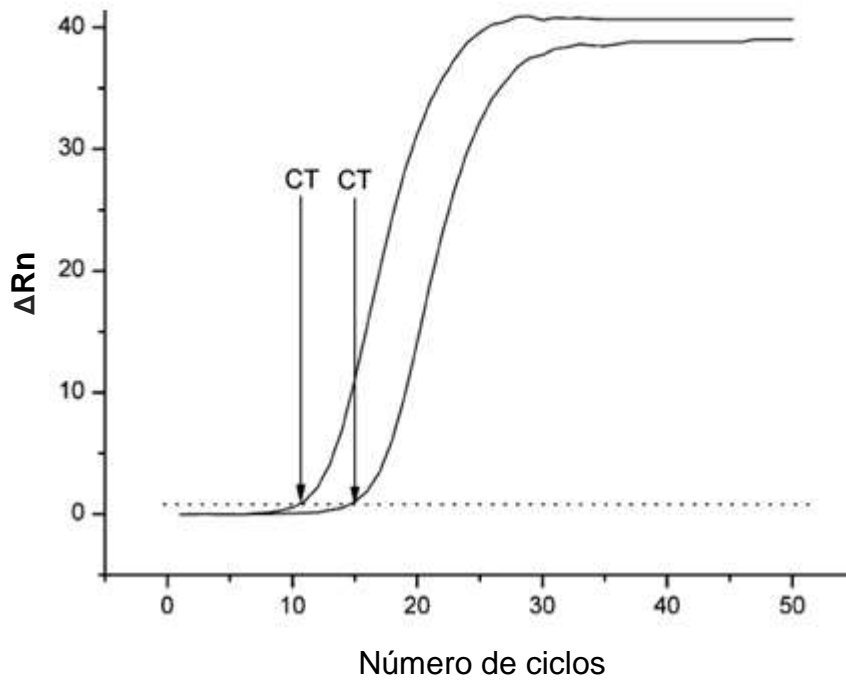


Figura 4. Curva típica de amplificación de PCR tiempo real

ΔRn : Incremento de fluorescencia; **Ct:** Ciclo en el cual se alcanza el umbral de detección. Fuente: Kubista *et al.*, 2006

La determinación de la cantidad exacta de ADN se realiza generalmente elaborando series de diluciones estándar del ADN a cuantificar. Estas diluciones se amplifican por qPCR y así se obtiene una curva de amplificación por cada dilución con un valor de Ct distinto cada una. La curva estándar es obtenida de la graficación de los valores de Ct (ejes de las ``y´´) contra los valores de concentración de ADN (ejes de las ``x´´) de cada dilución seriada, como se observa en la Figura 5. Los valores de Ct de las muestras problema son interpolados en la curva estándar y de esta manera es posible conocer la cantidad de ADN que poseen.

2.3.2.4. Tipos de moléculas fluorescentes empleadas en la qPCR. En las metodologías basadas en qPCR las principales moléculas fluorescentes convencionalmente llamados fluorocromos utilizadas para generar la fluorescencia que permita la detección de la amplificación del ADN durante la reacción son: los que hibridan en el ADN de doble cadena como el SYBR green™, y aquellos que están unidos a pequeños oligonucleótidos similares a los cebadores. Estas moléculas conocidas como sondas de hidrólisis o sondas Taqman, se añaden a la mezcla de reacción como un tercer oligonucleótido (Arya *et al.*, 2009). Estas sondas están constituidas por tres partes principales, el fluorocromo, el quencher (secuestrador) y una secuencia de oligonucleótidos.

Se ha reportado que el uso de sondas Taqman facilita la identificación de especies mediante la qPCR (Zhang *et al.* 2006; 2007; Kesmen *et al.*, 2009), ya que la secuencia de nucleótidos a la que se encuentra unido el fluorocromo es específica para una región dentro de la secuencia a amplificar, de manera similar a los cebadores, de ahí que son llamadas ``sondas Taqman específicas´´ (Arya *et al.*, 2009). Durante la qPCR estas sondas se alinean a su secuencia específica antes que los cebadores, durante la temperatura de alineamiento. Posteriormente, en la temperatura de elongación la enzima ADN polimerasa comienza la síntesis del nuevo fragmento del ADN mediante la incorporación de los nucleótidos complementarios de la secuencia de ADN molde.

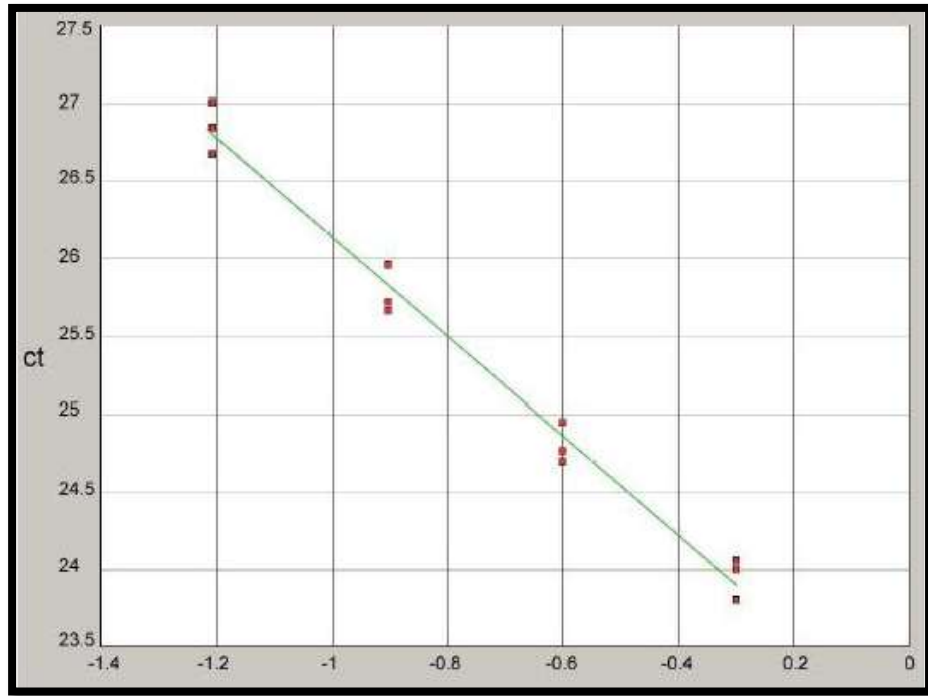
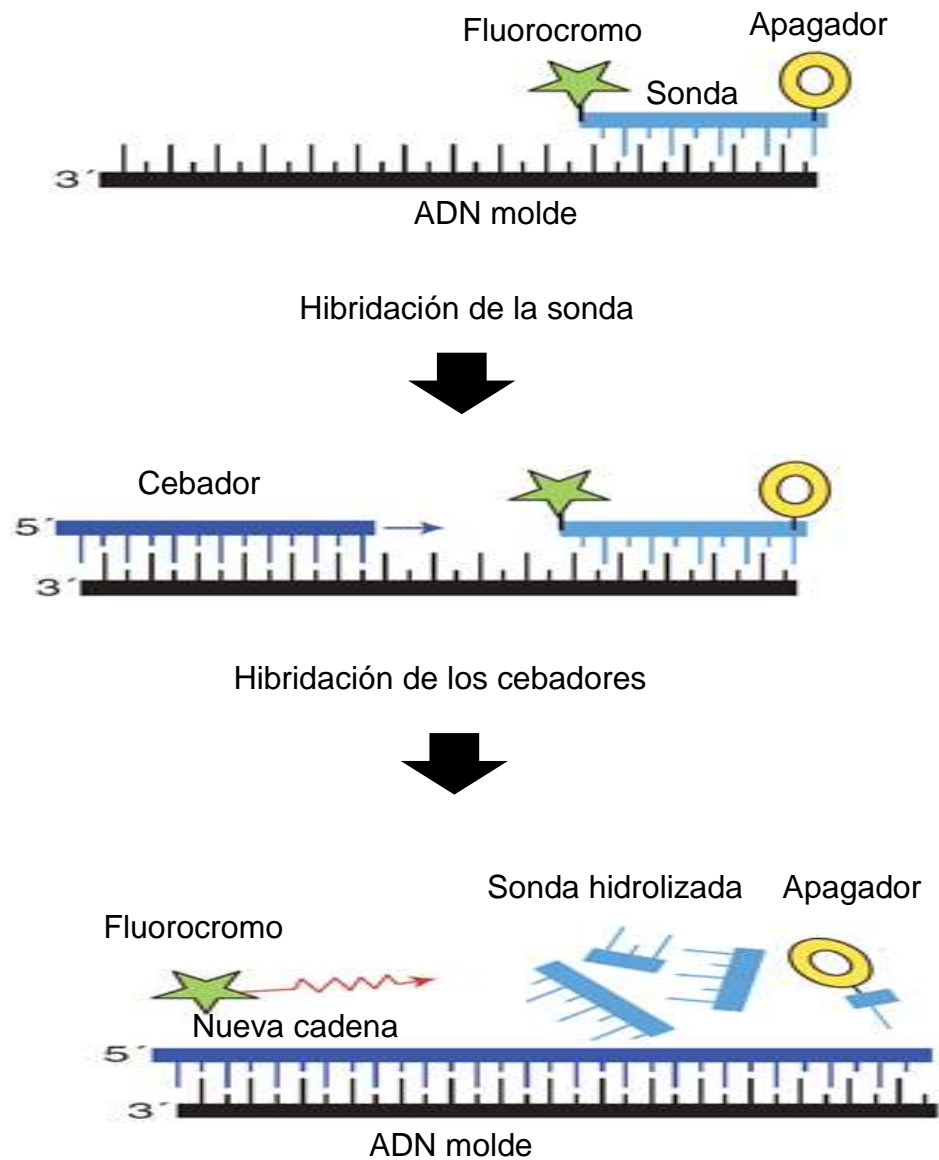


Figura 5. Curva estándar qPCR típica. Curvas de amplificación de cinco diluciones seriadas. Fuente: Arya *et al.*, 2009

Como se observa en la Figura 6 durante la formación de la nueva cadena de nucleótidos, la enzima ADN polimerasa se encuentra con la sonda Taqman específica, previamente alineada al ADN molde, así la enzima hidroliza los enlaces que unen a los nucleótidos de la sonda, es decir la degrada, mediante su actividad 5'→3' endocleasa. Esta hidrólisis es el fundamento de las sondas Taqman y por el cual también son llamadas "sondas de hidrólisis". Dichas sondas están formadas por tres partes principales que son: un fluorocromo, un secuestrador o "quencher" y el oligonucleótido específico. El fluorocromo se encuentra unido al extremo 5' del oligonucleótido mientras que el secuestrador se encuentra en su extremo 3' y mientras ambos se encuentren unidos al oligonucleótido, la fluorescencia del fluorocromo será absorbida por el secuestrador. Así, cuando la enzima ADN polimerasa hidroliza la sonda, ambos fluorocromo y apagador quedan separados y la fluorescencia es emitida y registrada por el ordenador del termociclador tiempo real (Arya *et al.*, 2009).

Un caso diferente es el del SYBR green que es una molécula que se une a todo aquel ADN de doble cadena que se genere durante la reacción qPCR, dicha situación no ha imposibilitado su uso en el desarrollo de metodologías de identificación de especies (Sakalar y Abasiyanik, 2012). No obstante, existe una gran ventaja del empleo de sondas Taqman específicas sobre el empleo del SYBR green y es que es posible realizar ensayos de identificación múltiple o *multiplex* (Heid *et al.*, 1996; Arya *et al.*, 2009).

La facilidad de realizar ensayos qPCR multiplex, se debe a que el empleo de sondas de hidrólisis permite el uso de una gran variedad de fluorocromos, tales como: 6-carboxifluoresceína (FAM®), tetracloro-6-carboxifluoresceína (TET®), hexacloro-6-carboxifluoresceína (HEX) o VIC®, JOE®, NED®, CY3®, ROX®, TEXAS RED® y Cy5® (Köppel *et al.*, 2009, 2010). La gran variedad de fluorocromos disponibles y la especificidad del oligonucleótido de la sonda por la secuencia de ADN de interés hacen posible el diseñar fácilmente una gran cantidad de sondas específicas, para cuantas secuencias blanco se pretendan analizar. Por ello, la mayoría de



Hidrólisis de la sonda y separación del fluorocromo de su apagador.

Figura 6. Mecanismo de acción de las sondas Taqman.
Fuente: Arya *et al.* (2009).

las metodologías reportadas para la identificación de especies mediante qPCR múltiple utilizan sondas Taqman específicas y no SYBR green.

2.4. Identificación y Cuantificación del ADN de Múltiples Especies Mediante qPCR

En las metodologías basadas en qPCR para la identificación de múltiples especies mediante el empleo de sondas Taqman específicas, se utiliza un par de cebadores y una sonda para cada especie a identificar. Cada sonda es utilizada con un fluorocromo distinto, el secuestrador puede ser el mismo o no, lo cual depende de que tipos de longitudes de onda pueda absorber o ``apagar`` (Chisholm *et al.*, 2005; Armani *et al.*, 2013). La técnica de qPCR utilizada para la amplificación de más de una secuencia blanco es conocida como qPCR múltiple (Henegariu *et al.*, 1997; Bustin *et al.*, 2009).

El empleo de la qPCR múltiple permite la cuantificación del ADN de interés (especies para las que se han diseñado los cebadores y sondas Taqman específicas) presente en las muestra bajo estudio. A diferencia de la qPCR individual, en la múltiple se obtienen varias curvas de amplificación por reacción, una por cada especie analizada. De la misma manera, mediante qPCR múltiple, se necesitan tantas curvas estándar como especies se pretendan analizar. Bustin *et al.* (2009), recomienda que las curvas estándar sean seriadas, ya que debido a que el valor de Ct está relacionado con la concentración de ADN, la variación de este valor debe ser constante en cada dilución.

La cuantificación de proporciones en todas las metodologías basadas en qPCR y qPCR múltiple se lleva a cabo mediante la cuantificación del marcador genético en cuestión. Una mayor cantidad de este marcador está relacionada

con una mayor cantidad de la proporción de la especie en la muestra analizada y viceversa (Köppel *et al.*, 2009; Gómez-Galán *et al.*, 2011).

La realización de un protocolo basado en qPCR múltiple para la identificación de especies disminuye la cantidad de reactivos empleados, ya que el volumen de la mezcla de reacción es el mismo que en la qPCR individual, pero se analizan más especies con la misma cantidad de mezcla (Henegariu *et al.*, 1997; Wittwer *et al.*, 2001). Ésto, además, disminuye el tiempo de operación, ya que se necesitan menos reacciones para identificar a la misma cantidad de especies. Así, en conjunto, el usar menos reactivos y disminuir el tiempo de operación, conlleva a aminorar el costo de análisis (Lin *et al.*, 2014). Sin embargo, para utilizar la qPCR múltiple es importante considerar que el desarrollo de una metodología basada en esta técnica es más complejo que el basado en qPCR individual, lo cual se debe a que en la qPCR múltiple se generan varias amplificaciones dentro de un mismo tubo de reacción, por lo que resulta indispensable comprobar que la amplificación de una secuencia no afecte la amplificación de la otra (Bustin *et al.*, 2009). Para esto, en el diseño de los cebadores y las sondas debe considerarse que las diferentes secuencias blanco no tengan similitudes en su secuencia de nucleótidos y así evitar amplificaciones cruzadas. De igual manera, debe considerarse que los fluorocromos empleados sean compatibles entre sí y no exista traslape de fluorescencias que impida el análisis, entre otros aspectos.

Los valores de referencia necesarios para determinar la fiabilidad de análisis qPCR y qPCR múltiple son: el valor del coeficiente de correlación (R^2) obtenido de la curva de estándar el cual generalmente está entre 0.95 y 1; así mismo, existe factor muy importante que es la eficiencia de la reacción y su valor debe encontrarse entre 90 y 110% y el valor de la pendiente mediante el cual se obtiene el valor de la eficiencia, dicho valor debe ser $3.32 \pm 10\%$ (Fajardo *et al.*, 2008). La modificación de la concentración de los reactivos en la qPCR múltiple se reduce a la concentración de los cebadores y sondas empleadas para cada especie. Así, cada juego de oligonucleótidos (cebadores

directo y reverso, y sonda) para cada especie, en ocasiones, deben de fijarse a diferentes concentraciones para optimizar el sistema qPCR.

Por otra parte, en relación al aspecto técnico, el termociclador para PCR en tiempo real tiene un máximo número de fluorocromos que puede detectar, lo que dependerá de las características del equipo. En otro aspecto, actualmente los termocicladores tienen la opción de hacer las corridas qPCR en menos tiempo, dicha modalidad es conocida técnicamente como *Fast*. Así, una corrida qPCR de 40 ciclos en modo convencional tarda aproximadamente 2 horas, mientras que en modo *Fast* tarda alrededor de 40 min, sin importar si en el protocolo utilizado.

En el 2013, Safdar y Abasiyanik, llevaron a cabo un ensayo qPCR múltiple en modalidad *Fast* mediante para la identificación de res y soya en soya en muestras de carne. Sin embargo, no llevaron a cabo la cuantificación de las proporciones en las que encontraban dichas especies.

Cammà *et al.* (2012) realizaron un protocolo qPCR individual en modo *Fast* para la identificación y cuantificación de proporciones de especies animales en mezclas de carne. Las especies analizadas fueron res, pavo, pollo, cerdo y oveja. Mediante dicho protocolo lograron cuantificar proporciones de hasta un 1% de una especie en las mezclas de carne. Adicionalmente, llevaron a cabo el uso de un control de amplificación interna, éste es una secuencia de ADN sintético que se amplifica simultáneamente en conjunto con las muestras problema como un testigo positivo.

Fajardo *et al.* (2008) identificaron tres especies típicas de la región donde se realizó el estudio, importantes por su alta comercialización en el mercado informal, mediante qPCR inividual en modo *Fast*.

En los estudios antes mencionados se plantea resolver problemáticas de adulteración de alimentos, así como establecer metodologías que ofrezcan una manera de como identificar el empleo de especies no comerciales o de aquellas que está restringida su venta por las autoridades de la región debido a que son animales exóticos. Actualmente, en México se tienen problemas similares de adulteración de especies en productos cárnicos comerciales y productos regionales típicos con especies que incluso no son comumente consumidos en el país, como es el caso de la carne de caballo en productos de carne de res. De igual manera, se ha evidenciado el empleo de la adulteración por sustitución con proteínas de origen vegetal, como la soya en diversos productos. La adulteración de productos cárnicos con carne de caballo y proteína de soya que se ha evidenciado en el país, implica un potencial riesgo a la salud de los consumidores de estos productos, un engaño e incluso fraude económico.

Los estudios científicos realizados para la identificación de especies y cuantificación de sus proporciones en alimentos, que han sido mencionados en el presente estudio, pueden servir de base para el desarrollo de un protocolo basado en el empleo de la técnica de qPCR múltiple en modo *Fast* para la identificación y la cuantificación de la proporción de las especies res, caballo y soya en productos cárnicos. Esto debido a que a pesar de los avances en el estado de las técnicas de qPCR y sus aplicaciones, hasta la fecha, no se ha reportado un estudio como el planteado en este trabajo. Además, el desarrollo de un protocolo basado en qPCR múltiple para la identificación de res, caballo y soya permitiría poder analizar la proporción de éstas en distintos alimentos. Por otra parte, debido a que el analito es ADN, la temperatura no es factor que afecte el análisis deseado. Sin embargo, en los estudios anteriormente mencionados, señalan que se debe validar el comportamiento del sistema analítico desarrollado mediante el análisis de muestras procesadas térmicamente que permitan determinar que el proceso térmico no ha afectado el desempeño de la técnica.

III. HIPÓTESIS

La proporción del ADN de carne de res, caballo y soya presente en productos cárnicos crudos y procesados térmicamente puede cuantificarse simultáneamente por medio de qPCR múltiple.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Desarrollar y validar un protocolo analítico para identificar y cuantificar simultáneamente la proporción del ADN de carne de res, caballo y proteína de soya en mezclas de carne cruda y procesada térmicamente mediante la técnica de qPCR múltiple.

4.2. Objetivos Específicos

1.- Optimizar la concentración ADN, cebadores y sondas Taqman específicas para la construcción de curvas estándar triples que permitan cuantificar posteriormente la proporción de res, caballo y soya en mezclas de carne.

2.- Validar el sistema qPCR múltiple mediante la identificación y cuantificación de ADN de proporciones conocidas de res, caballo y soya en mezclas de homogeneizados de carne cruda y procesada térmicamente.

3.- Analizar productos cárnicos comerciales mediante el protocolo qPCR múltiple validado.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Estrategia Experimental

La metodología del presente estudio se dividió en tres etapas principales, según los objetivos específicos planteados. Para cumplir la primera etapa, se obtuvieron muestras de carne de res, caballo y soya a partir de las cuales se obtuvo el ADN necesario para estandarizar las condiciones de cebadores y sondas Taqman elegidos para el sistema qPCR múltiple. Se probaron tantas condiciones como fue necesario para obtener los valores deseados de eficiencia y coeficiente de correlación para las curvas estándar. En la segunda etapa, se elaboraron como estándares, homogeneizados de carne de res con diferentes cantidades de carne de caballo y texturizado de soya en proporciones en las cuales dichas especies podrían encontrarse en un alimento comercial. Las proporciones de los estándares fueron cuantificadas mediante el sistema qPCR múltiple estandarizado en la primera etapa. Finalmente, en la tercera etapa habiendo comprobado que fue posible llevar a cabo la cuantificación de proporciones en los estándares, se aplicó el sistema qPCR múltiple en la búsqueda y cuantificación de las proporciones de las especies res, caballo y soya en productos cárnicos comerciales de Hermosillo, Sonora.

En la Figura 7 se muestra, de manera esquematizada el proceso realizado para la estandarización del protocolo de identificación y cuantificación de proporciones mediante qPCR múltiple planteado en el presente estudio.

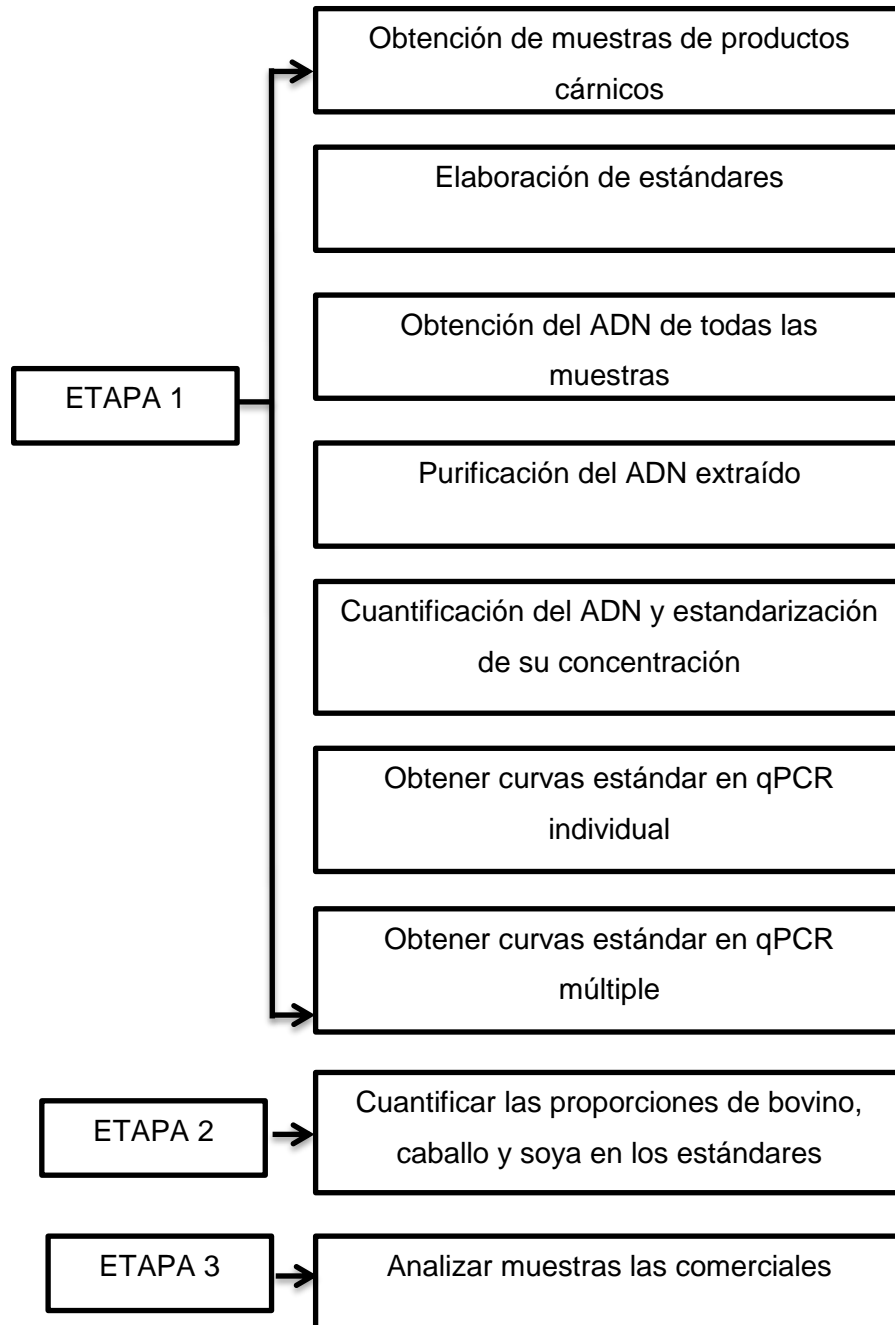


Figura 7. Estrategia experimental general

5.1. Reactivos y Materiales

Los reactivos empleados como el etanol y el isopropanol fueron obtenidos de la casa comercial SIGMA-ALDRICH® (St. Louis, EUA). Las microplacas ópticas *Fast* para PCR en tiempo real y sus cubiertas de plástico se obtuvieron de la casa comercial Applied Biosystems (Foster City, EUA). Los cebadores y sondas Taqman empleados fueron sintetizados por IDT (Uniparts, EUA).

5.2. Obtención de las Muestras

Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de pulpa negra de carne de res y caballo, y de texturizado de proteína de soya. Las muestras de carne de res fueron obtenidas en centros comerciales de la ciudad de Hermosillo, Sonora, mientras que la carne de caballo se obtuvo de un rastro TIF ubicado en la ciudad de Camargo, Durango, desde donde fue transportada en hielo seco hasta el laboratorio donde fue realizado el presente estudio. Las muestras de carne fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Por otro lado, la proteína de soya se obtuvo de un centro comercial ubicado en Hermosillo, Sonora, y fue almacenada a 25 °C hasta su posterior análisis. Los productos cárnicos comerciales analizados en el presente estudio fueron obtenidos de diferentes centros comerciales de autoservicio del municipio de Hermosillo, Sonora y se muestran en la Tabla 2. Se incluyeron algunos alimentos que no están compuestos comúnmente con carne de res o caballo, como es el caso del atún, pero que sí contienen proporciones de soya.

Tabla 2. Productos cárnicos comerciales analizados en el presente estudio

Nombre del producto	Código	Especies reportadas
Atún	Atún A	Atún y soya
Atún enlatado	Atún B	Atún y soya
Carne para hamburguesas	Hbrg A	Res
Carne para hamburguesas	Hbrg B	Res
Chilorio	Chilorio A	Cerdo
Chilorio	Chilorio B	Pavo
Chorizo	Chilorio C	Res
Chorizo	Chorizo A	Res
Chorizo	Chorizo B	Cerdo
Machaca	Machaca 0	Res
Machaca	Machaca A	Res
Machaca	Machaca B	Res
Machaca	Machaca C	Res
Machaca	Machaca D	Res
Salchicha para asar	Salchicha	Cerdo y soya
Pollo empanizado	Pollo A	Pollo

5.3. Elaboración de Estándares de Res, Caballo y Soya

Se elaboró un conjunto de estándares con y sin tratamiento térmico para cada una de las especies bajo estudio basándose en las metodologías propuestas por Ali *et al.* (2012) y Cammà *et al.* (2012). Para la elaboración de los estándares sin tratamiento térmico (A), se pesaron 12.5 g de carne de caballo, res y texturizado de soya individualmente y se homogeneizaron en 187.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en una licuadora Osterizer® Scientific durante 2 min. Los homogeneizados con tratamiento térmico (T), se elaboraron de manera similar, sólo que la muestra y el PBS fueron sometidos a un tratamiento térmico de 121°C por 15 min antes de ser homogeneizados. Cada homogeneizado fue colocado individualmente en vasos estériles de 100 mL. Posteriormente, se realizaron mezclas de los homogeneizados sin tratamiento térmico mezclando en las proporciones específicas que se muestran en la Tabla 3. Se obtuvieron en total seis mezclas de homogeneizados y tres que contenían 100 % de la cada especie en estudio, dando un total de nueve estándares. Lo mismo se realizó con los homogeneizados con tratamiento térmico. De esta manera, finalmente se obtuvieron 18 estándares (con y sin tratamiento térmico) que fueron almacenados en congelación a -20 °C hasta su posterior empleo en la extracción de su ADN para la validación del protocolo qPCR múltiple.

5.4. Preparación de Homogeneizados de Muestras Comerciales

De igual manera que los homogeneizados utilizados para la elaboración de los estándares, individualmente se tomaron 12.5 g de cada producto cárnico y se homogeneizaron con 187.5 mL de solución PBS durante 2 min en una licuadora Osterizer. Cada muestra fue almacenada en tubos Falcon® nuevos y almacenados a -20 °C hasta su posterior empleo en la extracción de su ADN para determinar la proporción de res, caballo y/o soya que pudieran contener.

Tabla 3. Mezclas experimentales de homogeneizados de res, caballo y soya

Mezcla	Porcentaje			Volumen del homogeneizado		
	Caballo (%)	Res (%)	Soya (%)	Caballo (mL)	Res (mL)	Soya (mL)
1	1	49	50	0.3	14.7	15
2	10	50	40	3	15	3
3	33.33	33.33	33.33	10	10	10
4	50	1	49	15	3	14.7
5	100	0	0	30	0	0
6	0	100	0	0	30	0
7	0	0	100	0	0	30
8	89	10	1	26.7	3	0.3
9	49	41	10	14.7	12.3	3

5.5. Extracción de ADN

La extracción del ADN de los de homogeneizados y las muestras comerciales se realizó mediante el empleo del protocolo de extracción de ADN Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA), el cual consiste básicamente en tres pasos: 1) la lisis de las células de la muestra, 2) la eliminación de compuestos no deseados como ARN, proteínas y carbohidratos, y 3) la rehidratación del ADN.

Se emplearon 400 µL de cada homogeneizado y fueron colocados de manera individual en un microtubo de 2 mL libre de nucleasas. Cada tubo contenía 600 µL de solución de la lisis nucleica y 20 µL de proteinasa K (Invitrogen, Madison, EUA), la cual fue previamente preparada a 100 mg/µL en una solución amortiguadora de CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl 10 mM y glicerol al 50 %.

Continuando con el protocolo de extracción de ADN, los microtubos con la solución de lisis y las muestras fueron incubados a 60 °C con una agitación de 600 rpm en un termomixer (Thermo-Scientific, Hilden, Alemania). A los microtubos se les agregó 3 µL de la ARNasa (incluida en el protocolo del Wizard™) y fueron incubados durante 30 min a 37 °C a 300 rpm. Posteriormente se agregaron 200 µL de solución de lisis proteica, se agitó la mezcla durante 30 s en un vortex (VWR, Ohio, EUA) y los tubos se dejaron reposar en hielo molido durante 5 min. Después, se centrifugaron a 16, 000 x g durante 2 min a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) en una centrifuga 2900H (Eppendorf, Hilden, Alemania). Todas las centrifugaciones posteriores se realizaron con el mismo equipo y a la misma temperatura.

Se tomaron 800 µL de cada sobrenadante y se colocaron en microtubos nuevos de 1.5 mL, que contenían 600 µL de isopropanol grado biología molecular (SIGMA-ALDRICH® St. Louis, EUA). Inmediatamente, se mezclaron el sobrenadante y el isopropanol por inversión de los tubos 5 veces para favorecer la precipitación del ADN. Se volvieron a centrifugar los tubos a 16, 000 x g durante 1 min, se eliminó el sobrenadante, se agregaron 600 µL de

etanol al 70 % (Sigma, Ohio, EUA). Una vez agregado el etanol se invirtieron los tubos 15 veces para lavar el precipitado de ADN encontrado en el fondo del tubo. Se centrifugaron los tubos a 16,000 x g durante 1 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se agregaron 100 µL de solución TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.2 mM), incluido en el kit, y se incubaron a 60 °C durante 1 h con una agitación de 300 rpm en el termomixer.

Posteriormente, para purificar y concentrar el ADN extraído se utilizó el protocolo comercial Expin® PCR SV (GeneAll®, Seoul, Korea) con la finalidad de disminuir impurezas que pudieran afectar su amplificación en la posterior qPCR. Para iniciar el procedimiento se utilizaron 200 µL de solución de ADN (en lugar de 100 µL como originalmente lo sugiere el protocolo). Para ello, primero se tomaron 100 µL de solución de ADN y se cargaron en la columna que tenía una matriz de afinidad para ADN, la columna se colocó dentro del tubo colector. Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 30 s a 15,800 x g y se descartó el eluido y se repitió el procedimiento con otros 100 µL. Se agregaron 700 µL de solución de lavado a la columna y se centrifugó durante 30 s a 15,800 x g y se descartó el eluido. Esta última centrifugación se repitió una vez más para eliminar el eluido residual presente en la matriz de afinidad y se descartó el tubo colector con el eluido. Después, la columna se colocó en un microtubo nuevo de 1.5 mL libre de nucleasas, se agregaron 50 µL de solución TE sobre la matriz de afinidad, y se dejó reposar durante 1 min. Posteriormente para obtener la solución de ADN purificado se centrifugó el nuevo microtubo junto con la columna durante 1 min a 15, 800 x g, finalmente, las soluciones de ADN se almacenaron a -20 °C para su posterior cuantificación y determinación de pureza.

5.6. Cuantificación y Determinación de la Pureza del ADN Total

La pureza de las muestras de ADN extraído se determinó evaluando los radios de absorbancia de (A_{260nm}/A_{280nm}) y (A_{260nm} / A_{230nm}) , con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo™ Scientific 2000c, USA). De igual

manera, se determinó la concentración de cada muestra de ADN midiendo la absorbancia $A_{260\text{ nm}}$ para tener un valor de referencia y realizar la cuantificación espectrofluorométrica. Se utilizó el kit Quant-It™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), cuyo fundamento es la detección de la fluorescencia que emite el fluorocromo PicoGreen® que se une específicamente a las dobles cadenas de ADN medida en un espectrofotómetro de fluorescencia.

Partiendo de las muestras cuantificadas por medio de su absorbancia $A_{260\text{ nm}}$, se tomaron alícuotas de cada solución y se ajustaron a 1 y 0.1 ng/ μL , respectivamente con una solución de amortiguadora TE 1X (incluida en el kit) con el objetivo de igualar concentraciones para su posterior cuantificación. Así, se construyó una curva estándar a partir de diluciones seriadas 1:10 v/v del ADN del virus λ (de acuerdo con el protocolo del PicoGreen®) desde 10-0.001 ng/ μL en solución TE. Posteriormente, se depositaron 100 μL de cada dilución y 100 μL de cada muestra problema en una microplaca de 96 pocillos de color transparente. Cada determinación se realizó por duplicado.

Una vez agregado el PicoGreen™ se protegieron las muestras del contacto directo de la luz para evitar la degradación del fluorocromo. Después se realizó la lectura de la fluorescencia con un espectrofotómetro SpectroMax M3 (Molecular Devices, CA, EUA) a una longitud de onda de emisión de 820 y de absorción de 520. A partir de los datos de fluorescencia obtenidos se construyó la curva estándar ajustándose al modelo lineal y se calcularon las concentraciones de las muestras problema. Posteriormente, los valores de fluorescencia obtenidos de la interpolación en la curva estándar son multiplicados por sus respectivos factores de dilución según haya sido el caso. Finalmente, las soluciones de ADN se llevaron hasta una concentración de 25 ng/ μL y fueron almacenadas en microtubos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis por PCR.

5.7. Selección de Cebadores y Sondas de Hidrólisis Taqman

Para amplificar el ADN de cada especie bajo estudio se utilizaron cebadores (sentido antisentido) y sondas Taqman específicas para cada especie. Estos oligonucleótidos estaban dirigidos al gen de la beta actina para res, al gen del receptor de la hormona del crecimiento para caballo y al gen Le1 de la lectina para la soya. Las sondas Taqman específicas para cada especie se encontraban marcadas en el extremo 5' con un fluorocromo distinto para cada caso. En la Tabla 4 se muestran las secuencias los cebadores y sondas Taqman empleados en el presente estudio, las que fueron obtenidas de estudios previamente reportados por Köppel *et al.* en el 2009; 2010; 2011. Todos los cebadores y sondas fueron adquiridos de la casa comercial IDT (UNIPARTS, EUA). Los fluorocromos utilizados fueron FAM™, Cy3™ y Cy5™, cada uno de estos emite en diferente longitud de onda, lo que permite mezclarlos y detectarlos en un mismo ensayo Multiplex.

5.8. Diseño del Control de Amplificación Interna

Se desarrolló un control de amplificación interna (IAC, por sus siglas en inglés) basándose en el protocolo reportado por Cammà *et al.* (2012). La función del IAC es servir de testigo positivo para el sistema qPCR múltiple del presente estudio. Éste fue diseñado utilizando una porción del gen acetil coenzima A carboxilasa (ACC) del nabo y en ambos extremos de la secuencia complementaria a los cebadores del Beef-F y Beef-R de res, como se observa en la Figura 8, Para la detección de la fluorescencia generada por la amplificación del IAC se utilizó una sonda Taqman específica para la región del gen ACC empleado en el diseño del IAC.

Tabla 4. Secuencias nucleotídicas de los cebadores y sondas Taqman específicos para res, caballo y soya

Especie	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicón (pb)
Res	Beef_F	GTA GGT GCA CAG TAC GTT CTG AAG	96
	Beef_R	GGC CAG ACT GGG CAC ATG	
	SondaB	FAM ^a -CGG CAC ACT CGG CTG TGT TCC TTG C-BHQ2 ^b	
Caballo	EC-F	CCA ACT TCA TCA TGG ACA ACG C	107
	EC-R	GTT AAA GCT TGG CTC GAC ACG	
	SondaE	Cy5 ^a -AAG TGC ATC CCC GTG GCC CCT CA- BHQ2 ^b	
Soya	Soy_F	TCC ACC CCC ATC CAC ATT T	81
	Soy_R	GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA	
	SondaS	Cy3 ^a -AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG- BHQ2 ^b	
IAC	Sonda	JOE ^a AACACCTATTAGACATTCGTTCCATTGGTTCGA-BHQ1 ^b	

^a Fluorocromos; ^b Opacadores. pb: pares de bases. Los apagadores utilizados pertenecen a la marca comercial Black Hole Quencher (BHQ). Modificado de Koppel *et al.* 2009; 2010;2011 y Cammà *et al.* (2012)

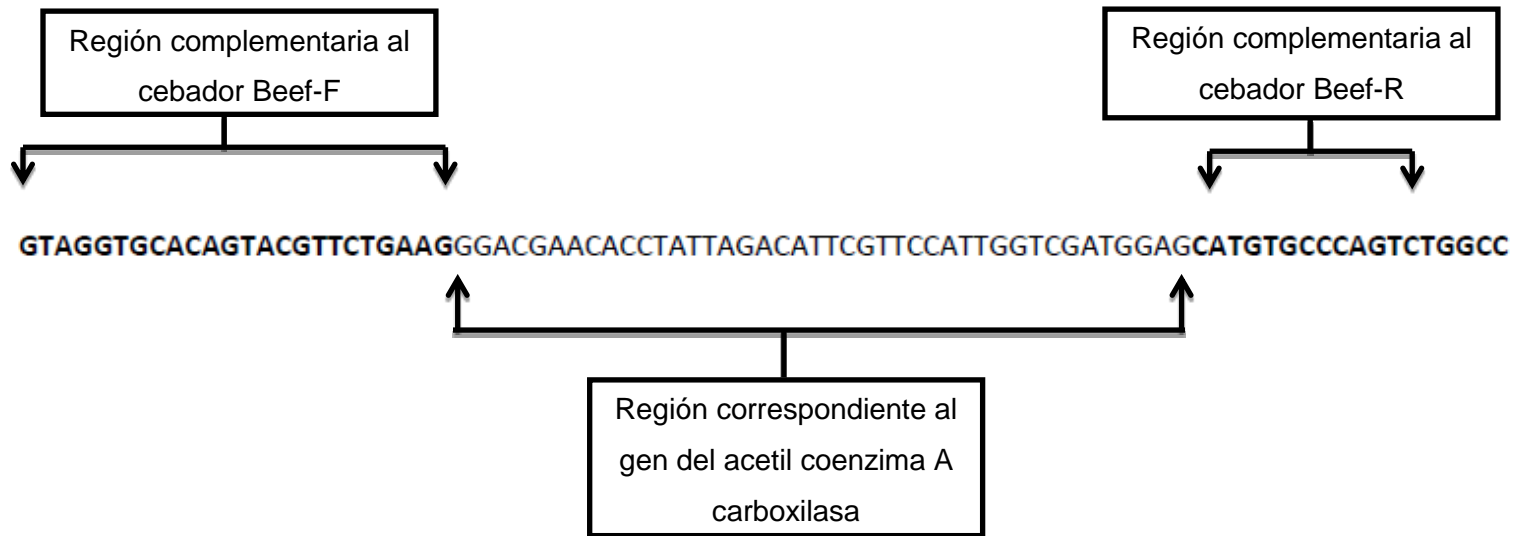


Figura 8. Diseño del control de amplificación interna. Modificado de Cammà *et al.* (2012)

El IAC fue amplificado al mismo tiempo que las muestras problema (estándares y muestras comerciales) pero dentro de un pocillo distinto. Su valor de Ct fue ajustado para ser de 26.5.

5.9. Construcción de Curvas Estándar para Res, Caballo y Soya

Las curvas estándar para cada especie se construyeron realizando diluciones seriadas del ADN stock de cada especie previamente ajustado a 5 ng/ μ L. Para ello, se realizaron cuatro diluciones seriadas con un factor de dilución 1:10 a partir de cada del ADN de res, caballo y soya. Las series de diluciones se almacenaron en refrigeración a 8 °C hasta su empleo para realizar la optimización de la concentración de cebadores y sondas Taqman.

5.10. Composición de las Mezclas de Reacción y Condiciones de Amplificación del ADN

De esta manera, cada mezcla de reacción consistió en 10 μ L de 2X de Taqman™ Master Mix con ROX, 5 μ L de ADN, y cebadores y sondas en concentración variable.

La configuración de la corrida se realizó considerando el empleo de sondas Taqman, la modalidad *Fast* de la qPCR y la cantidad de sondas empleadas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de 95 °C por 20 s, y 40 ciclos de 95 °C por 3 s y 60 °C por 30 s. La detección de datos de fluorescencia se realizó cada ciclo durante el transcurso de la temperatura de alineamiento a 60 °C por 30 s.

5.11. Optimización de la Concentración de ADN, Cebadores y Sondas Taqman Específicos

Para la optimización de la concentración de cebadores y sondas Taqman específicas en la qPCR múltiple fue necesario primero realizar un ensayo qPCR individual con cada una de las tres curvas estándar de ADN previamente elaboradas. Se probaron diferentes concentraciones de cebadores (100, 200, 400 nM) y sondas Taqman (80, 100, 250 nM) con las cuales fueron amplificadas cada una de las tres diluciones seriadas de ADN (res, caballo y soya).

Las curvas estándar obtenidas mediante el análisis qPCR individual fueron analizadas mediante el programa Real-Time PCR Fast 7500 versión 4.1 (Applied Biosystems). A partir de los datos de la curva estándar y su ajuste a la ecuación de la recta se determinó el coeficiente de determinación R^2 y la eficiencia de cada reacción, utilizando el valor de la pendiente sustituido en la ecuación:

$$E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100 \quad (1)$$

La concentración de cebadores y sondas Taqman consideradas como óptimas para la amplificación de ADN de cada especie fueron aquellas que permitieron obtener una eficiencia entre 90 a 110 % y un valor de coeficiente de correlación (R^2) entre 0.95 y 1.0.

5.12. Elaboración de Curvas Estándar para qPCR Múltiple

Las curvas estándar múltiples fueron elaboradas mezclando los tres ADN en la misma proporción y con un factor de dilución diferente a empleado en las curvas individuales para cada especie. Se elaboró una solución stock a 15 ng/ μ L de ADN de cada una de las especies bajo estudio (res, caballo y soya). Las tres nuevas soluciones stock de ADN se mezclaron y se agitaron suavemente con ayuda de un vortex (Eppendorf, Ohio, EUA) para obtener una mezcla homogénea del ADN de las tres especies. Debido a la mezcla de las tres soluciones, la nueva mezcla adquirió una concentración de ADN por especie de 5 ng/ μ L. Esta nueva mezcla con los tres ADN fue considerada como el 100% de la curva y a partir de esta se llevaron a cabo cuatro diluciones seriadas con un factor de dilución de 1:4 (v/v), como se observa en la Tabla 5. La nueva serie de diluciones fue almacenada a -20 °C hasta su amplificación mediante el ensayo qPCR múltiple.

5.13. Cuantificación de la Proporción de Res, Caballo y Soya en los Estándares y en las Muestras de Productos Cárnicos Comerciales

Una vez obtenidas las curvas estándar múltiples con los parámetros deseados de eficiencia y coeficiente de correlación R^2 , se procedió a llevar a cabo la determinación simultánea de la proporción del ADN de res, caballo y soya en los estándares elaborados a base de cantidades conocidas de sus homogeneizados. De igual manera, se aplicó el sistema qPCR múltiple en la cuantificación de la proporción de las especies en estudio a partir del ADN de las muestras de los productos comerciales obtenidos. Para realizar el análisis de los estándares y de las muestras comerciales se llevó a cabo la amplificación de ambos tipos de muestras en conjunto con la respectiva curva estándar múltiple. Los valores de Ct de las muestras fueron interpolados en las

Tabla 5. Diluciones seriadas realizadas para la construcción de la curva estándar triple

Punto de la curva	Concentración de ADN total* (ng/μL)	Concentración de ADN por especie (ng/μL)	Porcentaje (%)
1	15	5	100
2	3.75	1.25	25
3	0.9375	0.3125	6.25
4	0.234375	0.078125	1.59
5	0.05859375	0.0153125	0.39

* Concentración total de la mezcla de los tres ADN stock (15 ng/μL) de res, caballo y soya

curvas estándar y así se conoció la proporción en la que se encontraban en la muestra problema según el sistema qPCR múltiple. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Se obtuvo la desviación estándar (Desvest) de cada medición de Ct así como la Desvest del valor de cada proporción determinada en los estándares y muestras comerciales.

5.14. Límite de Detección y de Cuantificación

El límite de detección se calculó realizando tres diluciones seriadas con factor de dilución (1:10) de una mezcla del ADN de res, caballo y soya de concentración de 5 ng/ μ L. Por otra parte el límite de cuantificación se calculó en base a la mínima proporción de ADN que la curva estándar triple permitía cuantificar.

5.15. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio de una t de Student a un 95 % de confianza.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Calidad y Concentración del ADN Extraído

Las concentraciones finales de ADN determinadas mediante la cuantificación con el protocolo Quant-It™ PicoGreen® dsDNA Assay fueron de 78.55 ± 3.64 ng/ μ L para caballo, 57.9 ± 3.38 ng/ μ L para res y la más 33.4 ± 1.5 para soya, mientras que los coeficientes de absorbancia (A_{260}/A_{280}) y (A_{260}/A_{230}) para estas muestras estuvieron entre el rango 1.82 y 1.95 como se muestran en la Tabla 6. Respecto a las concentraciones de ADN obtenidas de los homogeneizados sin tratamiento térmico, éstas oscilaron entre 33.4 y 121.3 ng/ μ L. Sin embargo, las concentraciones obtenidas para el caso de los homogeneizados con tratamiento térmico fueron considerablemente menores, con valores de entre 5.47 y 11.41 ng/ μ L. La concentración de ADN de las mezclas con tratamiento térmico fue en algunos casos hasta 14.5 veces menor que las mezclas sin tratamiento térmico. No obstante, los cocientes de absorbancia (A_{260}/A_{280}) y (A_{260}/A_{230}) estuvieron entre los rangos de 1.8 a 2 y 1.8 a 2.2, respectivamente.

En investigaciones previas se ha determinado que las soluciones de ADN que tienen estos cocientes de absorbancia son óptimas para su amplificación por PCR (Di Pinto *et al.*, 2007). En este respecto, el cociente de absorbancia (A_{260}/A_{280}) correspondiente a la contaminación por proteínas, es el más importante, ya que las proteínas son los contaminantes que más afectan a la amplificación de ADN por técnicas basadas en PCR, debido a que pueden propiciar la generación de amplificaciones inespecíficas (Chapela *et al.*, 2007).

Tabla 6. Concentraciones de ADN obtenidas de homogeneizados

Mezcla		Sin tratamiento		Con tratamiento térmico		
		Térmico (A)		(B)		
No.	ADN*	$A_{(260/280)}$	$A_{(260/230)}$	[ADN]*	$A_{(260/280)}$	$A_{(260/230)}$
1	112 ± 8.14	1.93 ± 0.20	2.16 ± 0.15	7.70 ± 0.52	2 ± 0.05	2.04 ± 0.12
2	109 ± 4.08	1.93 ± 0.15	2.19 ± 0.18	9.35 ± 0.43	2.05 ± 0.12	1.99 ± 0.10
3	121.3 ± 2.52	1.93 ± 0.10	2.23 ± 0.15	11.41 ± 0.34	2.02 ± 0.09	1.95 ± 0.06
4	39.9 ± 1.99	1.94 ± 0.03	2.13 ± 0.24	5.93 ± 0.09	1.98 ± 0.12	2.1 ± 0.05
5	50.1 ± 1.31	1.93 ± 0.09	2.14 ± 0.29	7.18 ± 0.34	1.98 ± 0.04	2.12 ± 0.24
6	87.3 ± 2.40	1.93 ± 0.08	2.15 ± 0.12	9.55 ± 0.24	1.96 ± 0.11	2.11 ± 0.20
7	78.55 ± 3.64	1.92 ± 0.24	2.23 ± 0.12	9.84 ± 0.23	1.95 ± 0.27	2.13 ± 0.23
8	57.9 ± 3.38	1.91 ± 0.10	2.12 ± 0.12	8.37 ± 0.90	2.05 ± 0.08	1.91 ± 0.08
9	33.4 ± 1.5	1.97 ± 0.11	2 ± 0.20	5.47 ± 0.32	2.02 ± 0.09	1.92 ± 0.13

Valores determinados por duplicado (n=2). *Concentración determinada por medio del protocolo Quant-It™ PicoGreen® dsDNA. A: Absorbancia.

Por otra parte, las concentraciones de las soluciones de ADN de las muestras comerciales (embutidos, carne Machaca y atún enlatado) estuvieron en un rango entre 213 y 5.14 ng/ μ L de ADN. De la misma manera que con los homogeneizados, las concentraciones más bajas de ADN fueron obtenidas de los productos cárnicos con un proceso térmico de elaboración más severo. El producto que presentó la concentración más baja de ADN fue el atún enlatado con 5.14 ng/ μ L.

Cabe señalar que, inicialmente el ADN extraído de las muestras con tratamiento térmico y de las muestras de productos cárnicos comerciales presentó valores inferiores a 1.8 en el cociente de absorbancia $A_{260/280}$, lo que indicó una alta contaminación por proteínas. Por tal motivo, se empleó el kit de purificación Expin PCR SV[®], el cual permitió disminuir la contaminación por proteínas u otras sustancias que pudieran afectar la amplificación del ADN en los posteriores ensayos qPCR. Se ha reportado que por medio de la purificación del ADN con este tipo de kits de purificación, se incrementa el valor del cociente de absorbancia (A_{260}/A_{280}) desde 1.35 hasta 1.9, lo que implica una disminución de contaminantes como las proteínas (Shokere *et al.*, 2009).

Las diferencias observadas en las concentraciones de ADN se deben al tratamiento térmico al que fueron sometidas las muestras. Algunos autores como (Hird *et al.*, 2006 y Ballari y Martin, 2013) han reportado que los procesos térmicos superiores a los 100 °C disminuyen significativamente la concentración de ADN debido a su degradación. Sin embargo, estos autores demostraron que dicha disminución no representa un problema para los ensayos basados en qPCR, ya que la fragmentación del ADN debida a su degradación no interfiere con la amplificación de las pequeñas secuencias de ADN que son utilizadas como marcadores moleculares con este tipo de técnica. Así, para minimizar los efectos negativos de la degradación del ADN sobre su amplificación mediante PCR se recomienda emplear amplicones menores a 200 pb (Rojas *et al.*, 2011). En el presente estudio, los amplicones analizados tenían tamaños entre 81 y 107 pb, lo que favoreció el análisis de las muestras procesadas térmicamente,

ya que no se encontraron diferencias relevantes entre la amplificación de las muestras procesadas térmicamente y las muestras sin este tratamiento.

Por otro lado, respecto al protocolo empleado para la cuantificación de ADN en el presente estudio, el protocolo Quant-It™ PicoGreen® dsDNA, éste ha sido exitosamente empleado para la cuantificación de ADN de productos cárnicos procesados a temperaturas de hasta 110°C por 10 min (Cammà *et al.*, 2012). Asimismo, estos autores concluyen que este protocolo permite conocer de manera certera la concentración de este material genético, logrando obtener una alta reproducibilidad en los experimentos. Otros autores que también han utilizado el protocolo PicoGreen® dsDNA son López-Andreo *et al.* (2012) con productos cárnicos procesados a temperaturas de hasta 126 °C por 30 min.

En este respecto, Singer *et al.* (1998), demostraron que la cuantificación de ADN por medio del protocolo PicoGreen® no se ve afectada, como sucede con la medición realizada por medio de la determinación de absorbancia, cuando en la muestra están presentes contaminantes, tales como: sales, proteínas, polietilenglicol, urea, cloroformo, etanol, que comúnmente pueden ser residuos de la matriz de donde fue extraído el ADN o residuos de los reactivos empleados para la extracción del mismo. Adicionalmente, Li *et al.* (2014), concluyen que aunque se lleve a cabo la cuantificación espectrofluorométrica, resulta necesario realizar la determinación de los cocientes de absorbancia (A_{260}/A_{280}) y (A_{260}/A_{230}) de la determinación espectrofotométrica, ya que permiten determinar si en la solución de ADN existen contaminantes como proteínas y ARN que pudieran interferir en la amplificación del ADN mediante PCR.

Finalmente, debido a la baja concentración de ADN obtenida a partir de las muestras con tratamiento térmico, se optó por construir curvas estándar en donde el 100 % de la curva fuera 5 ng/μL, ya que todas las muestras alcanzaron esta concentración. Esta concentración es distinta a la empleada en los estudios de Koppel *et al.*, (2010; 2011), quienes utilizaron 20 ng/ μL como el 100% de sus curvas. De igual manera Cammà *et al.* 2012, emplearon

la misma concentración inicial que utilizó Koppel *et al.*, (2010; 2011) para la elaboración de sus curvas estándar. No obstante, el emplear bajas concentraciones de ADN, disminuye, debido a dilución de la muestra, los contaminantes presentes que pudieran intervenir en su amplificación mediante PCR (Töwe *et al.*, 2010).

6.2. Control de Amplificación Interna

El empleo de control de amplificación interna (IAC) permitió conocer si existen inhibidores en la reacción de qPCR que no fueron eliminados en la purificación previa del ADN, situación común en muestras de ADN extraídas de matrices complejas como lo son los productos cárnicos procesados (Cammà *et al.*, 2012), o incluso debido a residuos del mismo protocolo de extracción (*e. g.* compuestos fenólicos) (Dooley *et al.*, 2004). Por tales motivos, en el presente estudio se utilizó un IAC que funciona como testigo positivo que siempre debe amplificar, ya que es un oligonucleótido sintético y por lo tanto, no contiene ningún tipo de contaminante que impidan su amplificación. De esta manera cuando es agregado en la misma mezcla de reacción donde se encuentra el ADN de la muestra problema, su amplificación demuestra que no existen contaminantes que impidan la amplificación del ADN en análisis. En este contexto, el empleo de controles internos como el IAC permiten evitar obtener falsos negativos en el análisis de alimentos sometidos a procesos térmicos severos y así descartar falsos negativos provocados por la alta degradación del ADN y no por la ausencia de la especie bajo estudio (Laube *et al.*, 2012).

En la Figura 9 se muestran las curvas de amplificación resultantes de tres últimas diluciones seriadas del IAC, equivalentes a las concentraciones de 0.001, 0.0001 y 0.00001 fg/ μ L. Se decidió arbitrariamente utilizar la concentración de 0.0001 fg/ μ L para el protocolo qPCR del presente estudio. De esta manera, el IAC fue corrido en un pocillo distinto con el ADN de cada muestra analizada en el presente estudio. Todas las muestras presentaron

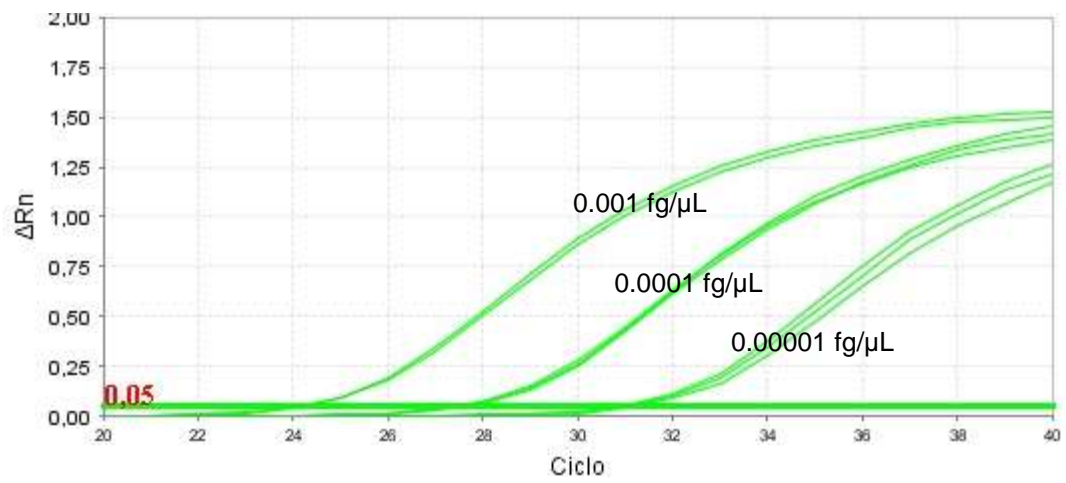


Figura 9. Curvas de amplificación obtenidas a partir de las diluciones seriadas del IAC

amplificación positiva del IAC, lo que significó que ninguna muestra de ADN tenía contaminantes que impidieran su amplificación.

6.3. Eficiencia de las Curvas Estándar de Res, Caballo y Soya

Una vez se obtuvieron todas las muestras de ADN (homogeneizados y de productos comerciales), se procedió realizar un ensayo qPCR para cada especie a identificar con la finalidad de optimizar la concentración de cebadores y sondas Taqman. En este respecto, la concentración de 400 nM de cebadores y de 250 nM de sondas Taqman para cada especie permitió obtener los valores de coeficiente de determinación (R^2) entre 0.987 y 0.998, y de eficiencia entre 98 y 101 % los cuales se observan en la Tabla 7. Dichos valores están dentro de los rangos recomendados por (Bustin *et al.*, 2009 y Töwe *et al.*, 2010), quienes recomiendan obtener valores de eficiencia entre 90 y 101 % para los ensayos qPCR. Éstos son obtenidos cuando los valores de la pendiente son de 3.23 ± 10 %, la cual es obtenida a partir el ajuste al modelo lineal de los valores de Ct y sus respectivas concentraciones de ADN. Resultados similares han sido reportados por Cammà *et al.* (2012) en la identificación de especies individualmente mediante PCR en tiempo real, con valores de eficiencia entre 95 y 100% en la identificación de especies como pavo, pollo, cerdo, bovino y oveja. No obstante, esta misma vertiente, Laube *et al.*, (2007) reportaron valores de eficiencia para sus ensayos PCR en tiempo real entre 96 y 86%, mediante los que identificó y cuantificó el ADN de diferentes especies en alimentos procesados térmicamente.

Se ha reportado que ciertos factores disminuyen el valor de la eficiencia por debajo del 90 %, algunos tales como: reacciones inespecíficas o cruzadas en la reacción debida al diseño de los cebadores o a las condiciones de amplificación del ADN. (Bustin *et al.*, 2009; Callbeck *et al.*, 2013). En los manuales de Applied Biosystems se recomienda mantener especial atención en

Tabla 7. Valores de eficiencia, pendiente y coeficiente de determinación obtenidos de la optimización de la concentración de cebadores y sondas en qPCR individual

Especie	Parámetros qPCR		
	E	m	R²
Res	98.72	-3.35	0.987
Caballo	99.28	-3.33	0.994
Soya	101.83	-3.27	0.998

E: eficiencia; m: pendiente de la recta y R². Valores de Ct representan el promedio ± desviación estándar de tres repeticiones (n=3)

el pipeteo de los reactivos ya esto puede comprometer significativamente a los valores de eficiencia obtenidos para los ensayos qPCR. Por otra parte, los factores que generan el incremento de la eficiencia puede ser la alta concentración de cebadores y sondas de hidrólisis empleadas y/ el empleo de altas concentraciones de ADN molde para las reacciones qPCR (Köppel *et al.*, 2009).

El umbral de detección fue ajustado manualmente en un valor de 0.05 ΔR_n para res y caballo, respectivamente, mientras que para el caso de la soya se ajustó a 0.005 ΔR_n , ya que su fase exponencial era detectada a valores menores de fluorescencia respecto a el caso del caballo y la res. En la Figura 10 se muestra de manera gráfica como el umbral de detección se ajustó en inicio de la fase exponencial de las curvas de amplificación, según lo recomendado por Kubista *et al.* (2006). El ajuste del umbral de detección es en primera instancia calculado por el programa del equipo, sin embargo, generalmente es necesario llevar acabo su ajuste manualmente para obtener resultados más certeros.

En misma Figura 10, se muestran las curvas de amplificación (ΔR_n vs ciclo) obtenidas de las diluciones seriadas del ADN de caballo, res y soya. Los valores de Ct obtenidos estuvieron en el rango de 21.92 ± 0.44 a 35.13 ± 0.77 para el ADN de res; en un rango entre 21.64 ± 0.10 a 34.92 ± 0.50 para caballo; y de entre 20.01 ± 0.20 a 33.10 ± 0.52 para soya. Por otra parte, en la Figura 11, se muestran las curvas de estándar (Ct vs concentración de ADN) de cada uno de los tres ensayos qPCR. En conjunto estos gráficos y los valores de Ct obtenidos de cada serie diluciones permitió también observar que el punto de menor concentración de las curvas estándar de caballo y res, presentaban una alta desviación estándar, por lo que posteriormente fue necesario eliminar este punto de la curva y generar un nuevo rango dinámico de diluciones seriadas.

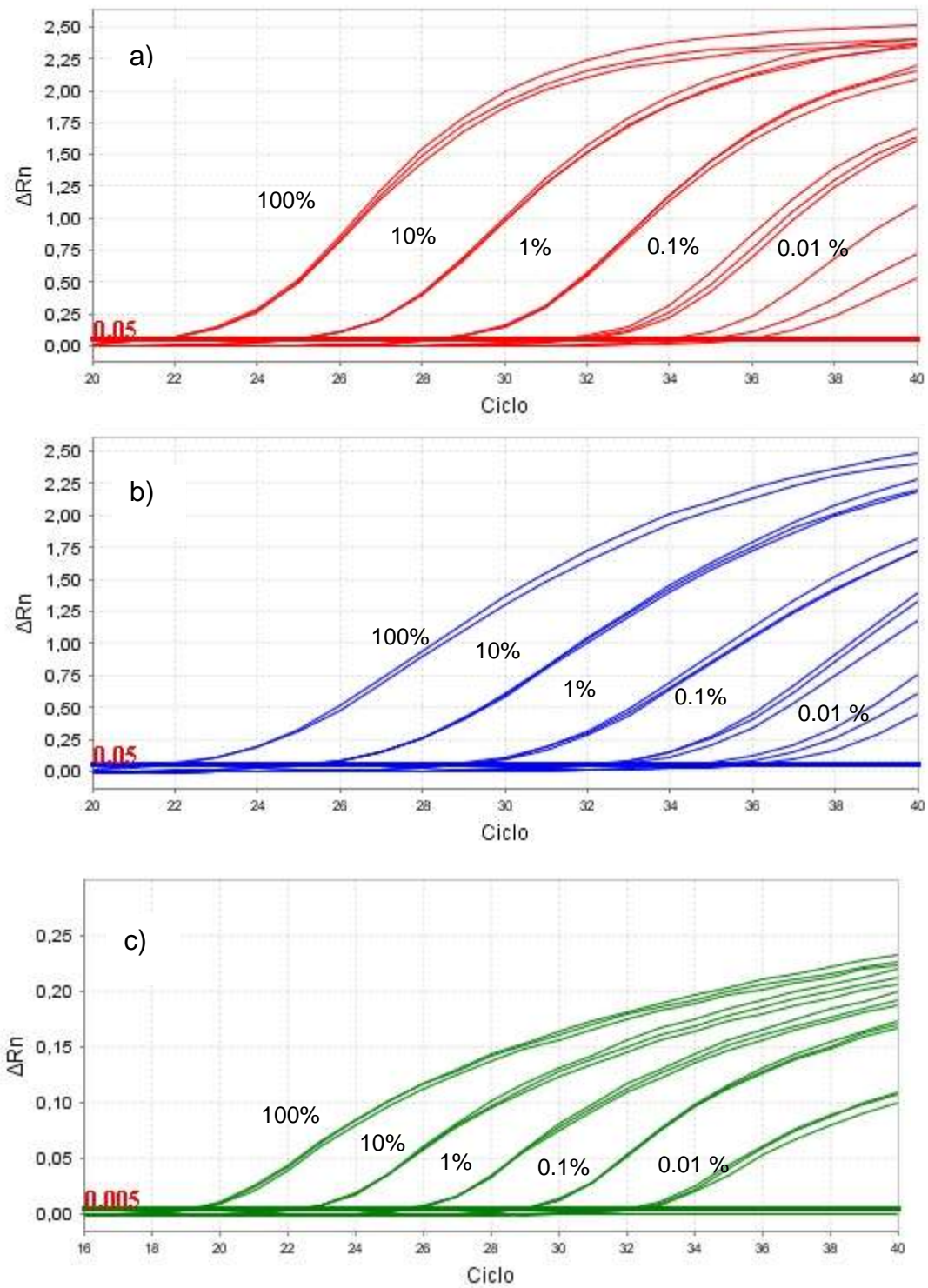


Figura 10. Curvas de amplificación del ensayo qPCR individual. a) Caballo, b) res c) soya

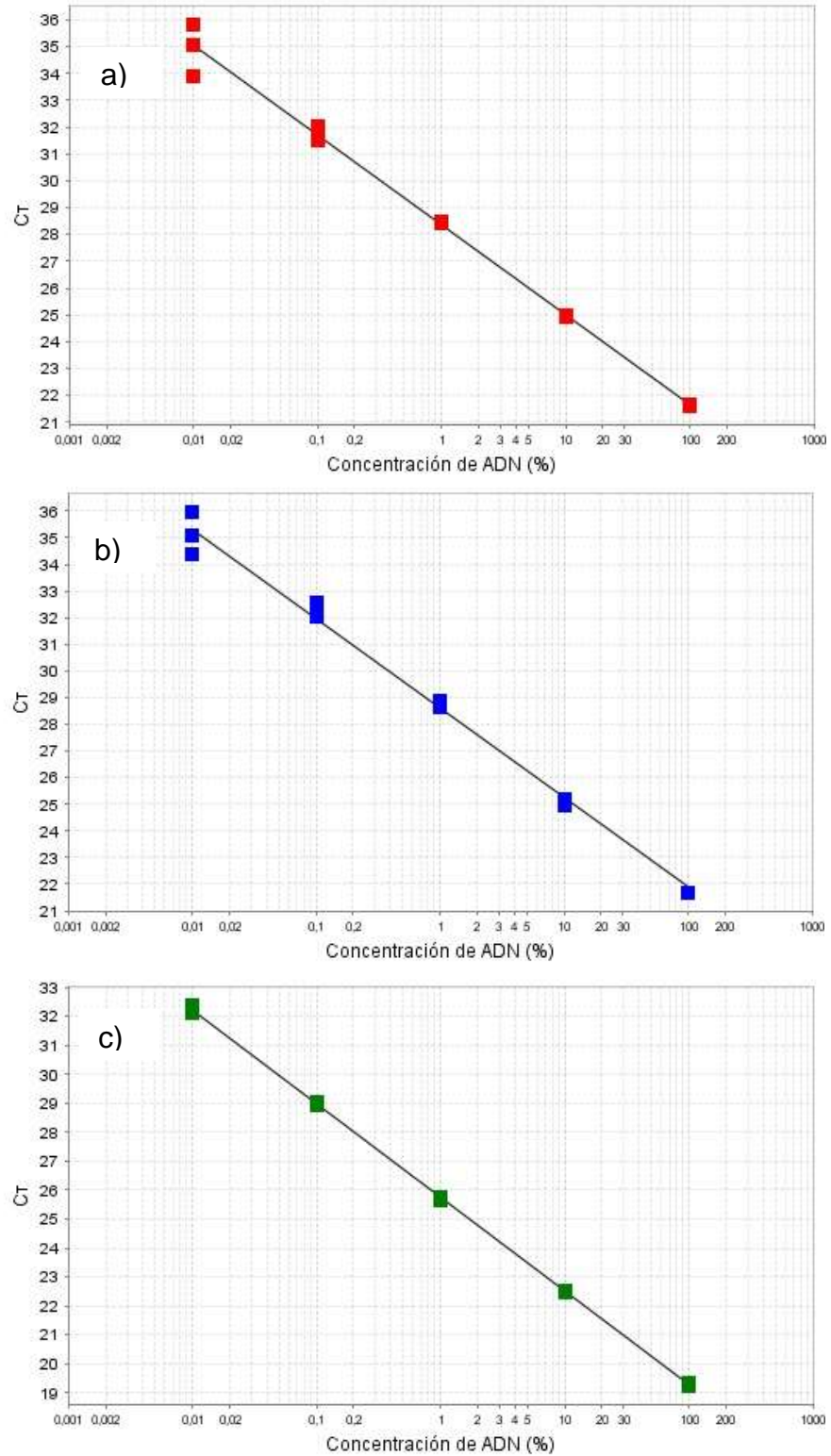


Figura 11. Curva estándar (Ct vs concentración de ADN) del ensayo qPCR individual. a) Caballo, b) res, c) soya

6.4. Ensayo qPCR múltiple

Los cebadores y sondas empleados en el presente estudio fueron reportados previamente por Köppel *et al.* (2009; 2010; 2011). Estos oligonucleótidos fueron diseñados para hibridar en el ADN genómico res, caballo y soya. Sin embargo, no habían sido probados para el análisis simultáneo de las tres especies. Por tal motivo fue necesario llevar a cabo una prueba para determinar si no existía amplificación cruzada de las especies bajo estudio, al mezclar los tres pares de cebadores y las tres sondas Taqman en una misma reacción de qPCR. En la Figura 12, se muestran las curvas de amplificación correspondientes al ADN de res amplificado con todos los cebadores y sondas (Figura 12a), esta misma prueba se realizó para ADN de caballo (Figura 12b) y para el ADN de soya (Figura 12c). En ninguno de estos tres casos se determinó amplificación inespecífica.

Por otra parte, se eligieron cebadores y sondas Taqman que estuvieran dirigidas a secuencias del ADN genómico, ya que se ha reportado que este presenta menor variabilidad para realizar ensayos cuantitativos respecto al empleo del ADN mitocondrial (Ballin *et al.*, 2009). Así mismo, el empleo de secuencias del ADN genómico como marcadores moleculares incrementa el límite de detección, es decir, no se puede identificar pequeñas cantidades del ADN de interés en la muestra. Alternativamente, el empleo del ADN mitocondrial se ha empleado en mayor medida sólo para la identificación de especies (Haunshi *et al.*, 2009; Cammà *et al.*, 2012; Haider *et al.*, 2012). No obstante, el ADN mitocondrial se puede utilizar para ensayos cuantitativos cuando se utilizan genes de referencia que son empleados para normalizar las variaciones producidas por la cantidad diferente de mitocondrias que puedan tener las distintas muestras problema (Tanabe *et al.*, 2007; Fajardo *et al.*, 2008; López-Andreo *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2010), sin embargo, esta normalización de valores vuelve más complejo el desarrollo de protocolos basados en el análisis del ADN mitocondrial.

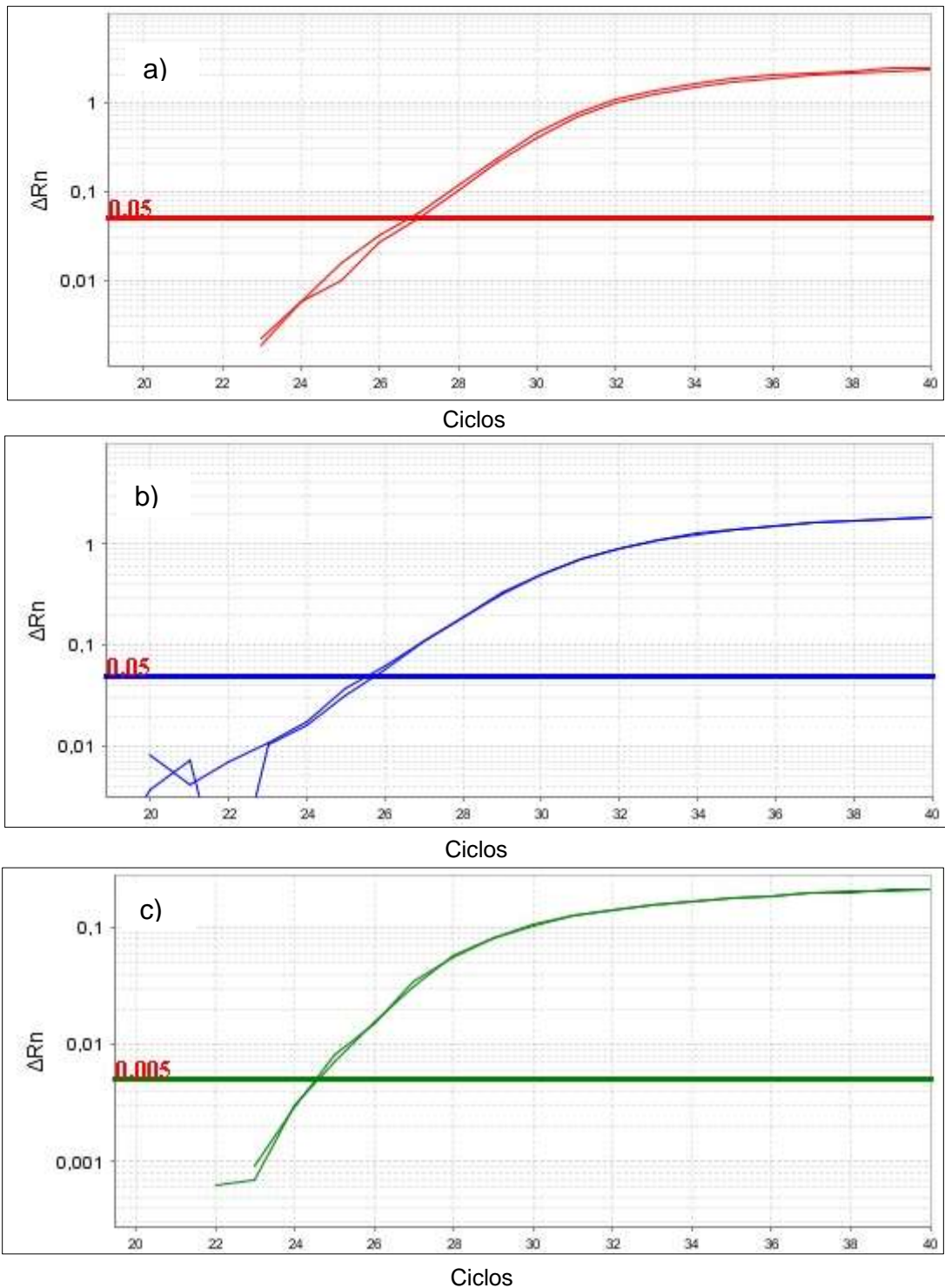


Figura 12. Prueba de reacción cruzada entre los cebadores de res, caballo y soja. a) ADN de caballo b) ADN de res y c) ADN de soja

Una vez que se determinó que no había amplificaciones cruzadas entre los distintos cebadores y sondas Taqman empleadas, se procedió a realizar las curvas estándar múltiples. En este ensayo se utilizó un factor de dilución 1:4 (v/v) diferente al empleado en el ensayo qPCR individual que fue de 1:10 (v/v). El factor de dilución 1:4 (v/v) fue más apropiado para el ensayo múltiple, ya que permitía el utilizar valores de concentración de ADN más altos para la curva estándar respecto al primero. Este cambio se realizó debido a que al emplear el factor 1:10 (v/v) en el ensayo múltiple, no era posible detectar el punto de menor concentración de ADN (0.001%) de las curvas estándar.

En la Figura 13, se muestran las curvas de amplificación para las tres diluciones seriadas de ADN de caballo, res y soya obtenidas en el ensayo qPCR múltiple correspondientes a diluciones seriadas de 100, 25, 6.25, 1.56 y 0.39% de ADN, donde el 100% en cada caso equivale a 5 ng/ μ L. En general se observó, el comportamiento típico esperado para una serie de diluciones estándar, de esta manera las curvas incrementaban su valor de Ct conforme disminuían la concentración de ADN empleada en su construcción. Asimismo se observa el ajuste del umbral de detección fue de 0.05 para caballo y res, y de 0.005 para soya. Cabe resaltar que los valores de Ct de la curva estándar de la soya fueron menores a los obtenidos para el caso del caballo y la res. Este hecho se debe a que la soya posee múltiples copias de la mayoría de sus genes (incluido el gen Le1 de la lectina de soya utilizado como gen blanco para a soya en el presente estudio), ya que la soya es poliploide (Schmutz *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013) a diferencia del res y caballo que son diploides, y que por lo tanto poseen sólo dos copias de sus genes (Elsik *et al.*, 2009). Por lo tanto, en el ADN extraído de la soya existen más secuencias blanco, dentro de una misma cantidad de volumen de ADN, que en el caso de los ADN de res y caballo. No obstante, esta diferencia no afecta la cuantificación de las proporciones de éstos, ya que se realizó una curva estándar por cada especie bajo estudio.

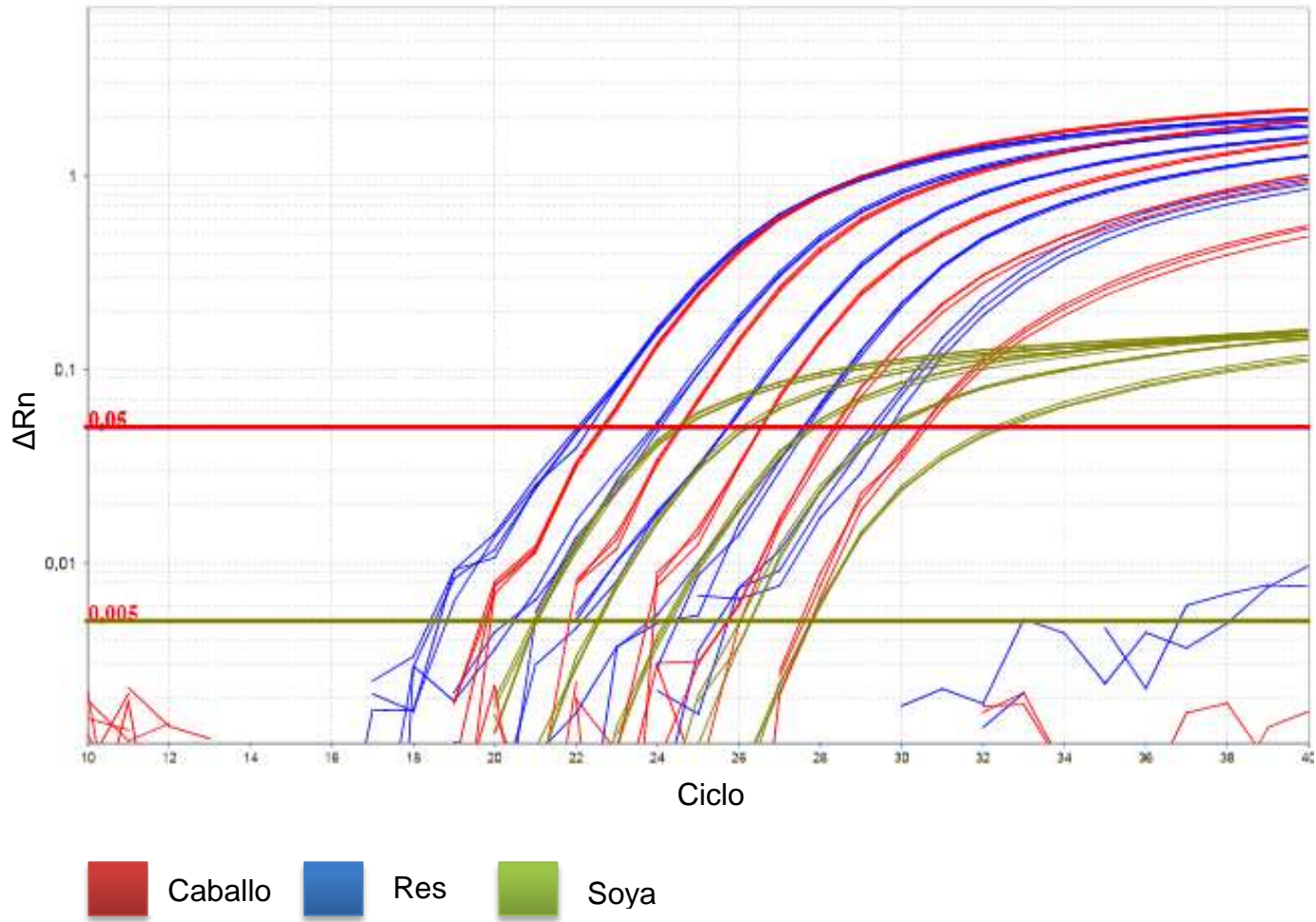


Figura 13. Curvas estándar triple

Los valores de Ct obtenidos de la amplificación de las diluciones seriadas del ADN de res, caballo y soya la curva estándar triple se presentan en la Tabla 8, y la curva estándar triple resultante de la graficación de los valores de Ct contra la concentración de ADN se muestran en la Figura 14. Como puede observarse, los valores de eficiencia para res, caballo y soya fueron de 111.05 y 106.79 y 126.37 % respectivamente. El valor de eficiencia para el caso de la soya sobrepasó considerablemente lo recomendado por algunos autores como Fajardo *et al.* (2008) y Töwe *et al.* (2010) quienes reportaron valores de eficiencia entre 90 y 100%. Resultados similares de eficiencia a los del presente estudio fueron obtenidos por Köppel *et al.* 2011, quienes afirman en sus reportes que no fue relevante obtener un valor de eficiencia entre 90 y 110% para sus ensayos qPCR. No obstante, es posible trabajar con valores fuera de estos rangos siempre y cuando se determinó que los bajos o altos valores de eficiencia no afectan en la cuantificación de ADN (Ruijter *et al.*, 2009).

Por otra parte, después de una revisión bibliográfica exhaustiva no se encontraron estudios en los que se llevara a cabo la construcción de curvas estándar múltiples, como las realizadas en el presente estudio. Estas curvas fueron construidas mediante la mezcla de los tres diferentes ADN de las especies bajo estudio (res, caballo y soya). Ésto permitió obtener un solo conjunto de diluciones de ADN para la construcción de las tres curvas estándar múltiple (res, caballo y soya). Una alternativa, es elaborar un conjunto de diluciones seriadas, una por cada especie a analizar (Koppel *et al.*, 2011; Iwobi *et al.*, 2015).

Tabla 8. Valores de Ct de la curva estándar triple de res, caballo y soya

Especie	Diluciones de la curva estándar				
	100%	25%	6.25%	0.15625%	0.0390625%
Res	22.20 ± 0.07	23.98 ± 0.10	25.73 ± 0.03	27.63 ± 0.08	29.41 ± 0.22
Caballo	22.66 ± 0.03	24.58 ± 0.02	26.52 ± 0.02	28.34 ± 0.09	30.43 ± 0.10
Soya	20.91 ± 0.04	22.52 ± 0.02	24.29 ± 0.06	26.05 ± 0.12	27.69 ± 0.01

Valores de Ct representan el promedio ± desviación estándar de tres repeticiones (n=3)

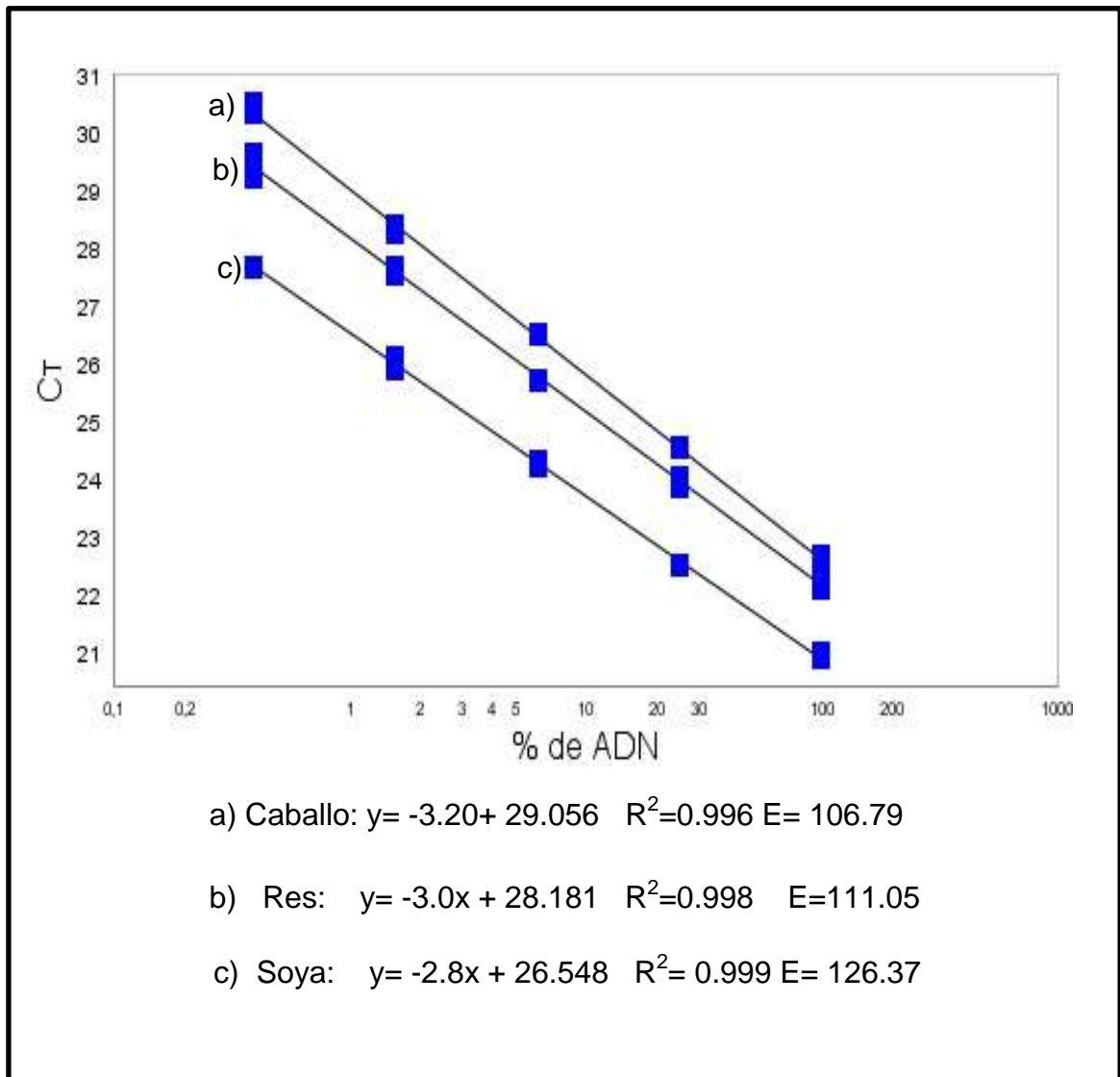


Figura 14. Curva de calibración triple. a) ADN de caballo, b) ADN de res y c) ADN de soya

6.5. Cuantificación de Estándares de ADN

La cuantificación de estándares triples de referencia elaborados con 1, 10, 25 y 50 % del ADN de res, caballo y soya permitió demostrar, que para el ensayo qPCR multiplex, la alta eficiencia para el caso de la curva estándar de res y soya no perjudicó la cuantificación simultánea del ADN de las especies bajo estudio. En la Figura 15, se muestra la correlación entre los valores reales y los medidos por el sistema, la cual fue superior a 0.98 en todos los casos, ya que se obtuvieron valores del coeficiente de correlación de 0.99 para res y soya, y de 0.98 para caballo. La alta correlación entre los valores reales y los valores obtenidos demostró la capacidad del sistema para determinar simultáneamente, la proporción de ADN de las especies bajo estudio, en mezclas de sus ADN.

Por otra parte, en la Figura 16, se muestran la comparación entre las curvas amplificación de las diluciones seriadas del ADN caballo (Figura 16a), de res (Figura 16b) y soya (Figura 16c) y las curvas de amplificación correspondientes a las mezclas triples del ADN de cada especie, según sea el caso. Como se puede observar, en los tres casos (ADN de res, caballo y soya) las curvas de amplificación correspondientes a muestras con menor concentración de ADN necesitaron más ciclos para llegar al umbral de detección. Cabe señalar, que las curvas de amplificación correspondientes a las mezclas de 50% de ADN llegaron a ser muy parecidas en la fase estacionaria a las curvas equivalentes al 100 % de las diluciones seriadas. Esto no resulta un problema para la cuantificación del ADN mediante qPCR, ya que el punto de la curva a evaluar es el inicio de su fase exponencial y no la fase estacionaria. No obstante, este es un ejemplo útil para demostrar que, el analizar el producto PCR al final de la amplificación, como es el caso de la PCR convencional, puede generar resultados erróneos, debido a que la cantidad de producto PCR generado al final de la amplificación no siempre es un indicativo de la concentración inicial de ADN de la muestra problema (Kubista *et al.*, 2006). Asimismo, el traslape de las fases estacionarias fue menor en las curvas

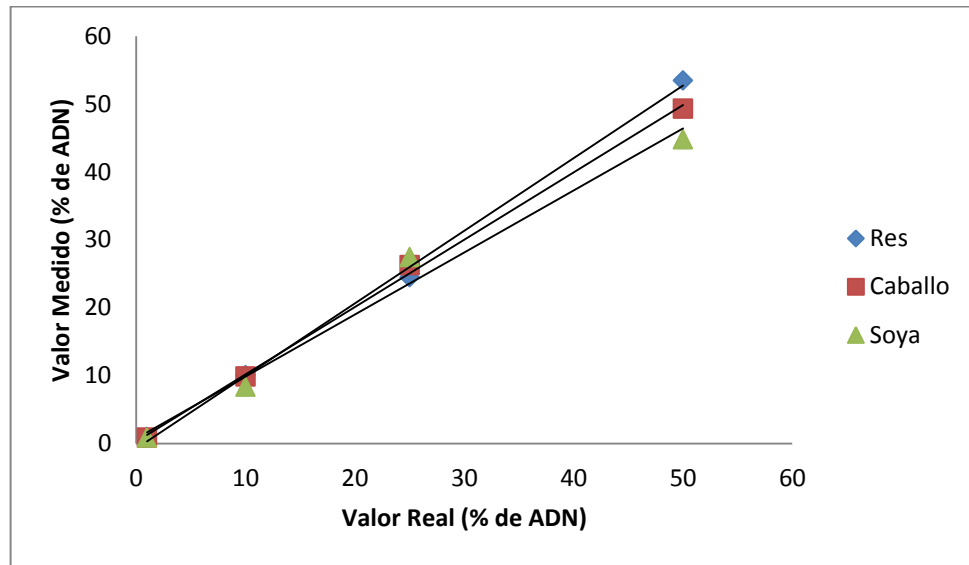


Figura 15. Correlación entre el valor real y el valor medido mediante el ensayo múltiplex en la cuantificación de muestras triples de ADN en diferentes proporciones (50,25, 10 y 1%).

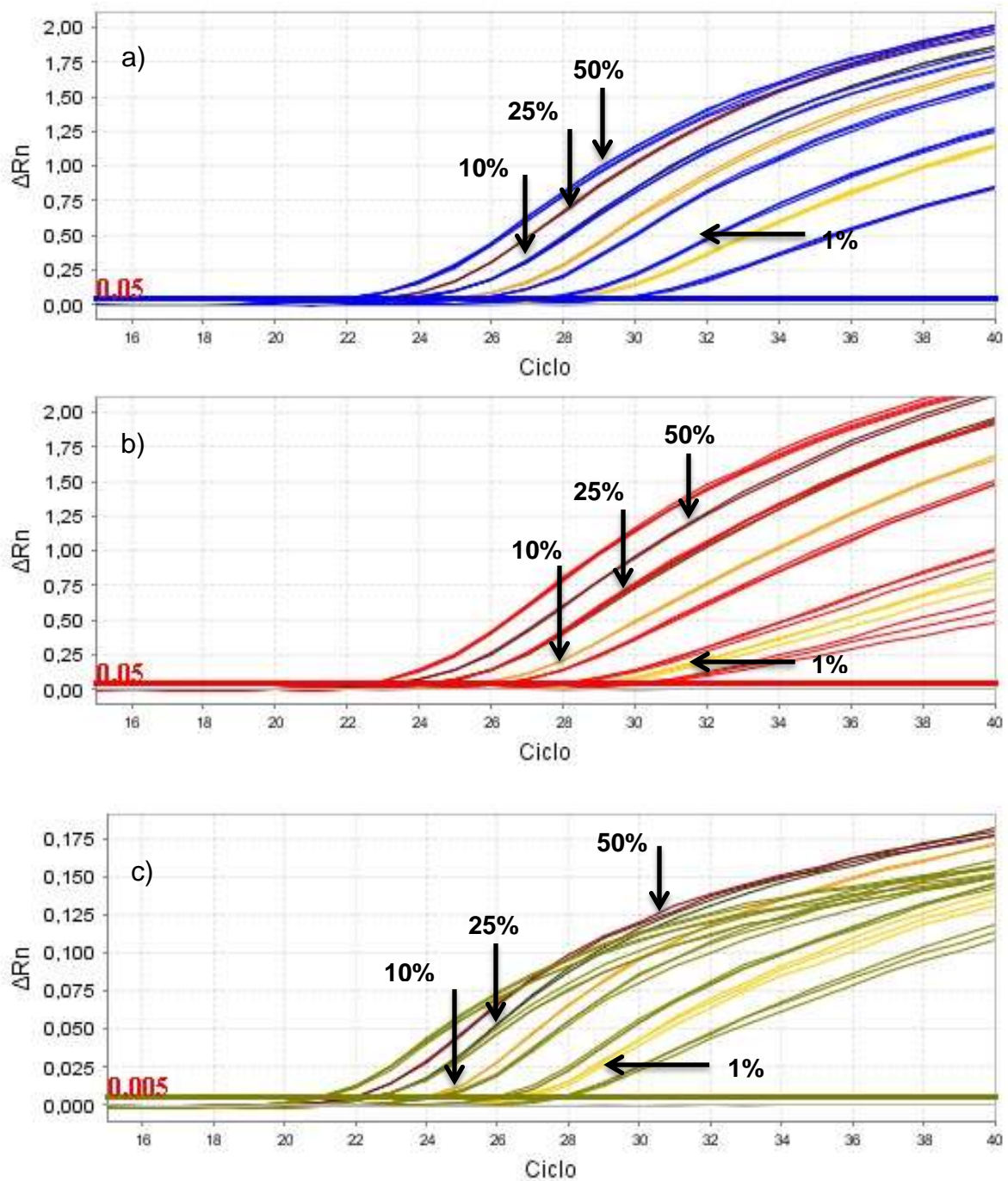


Figura 16. Curvas de amplificación de las mezclas de triples de ADN de res, caballo y soja en diferentes proporciones (50,25, 10 y 1% de ADN).a) ADN de res, b) ADN de caballo, y c) ADN de soja.

correspondientes a muestras de menor concentración de ADN.

6.6. Detección y Cuantificación Simultánea de ADN en Estándares de Homogeneizados de Res, Caballo y Soya

Las proporciones de ADN de res, caballo y soya presentes en las muestras de los ADN extraídos de los homogeneizados de estas especies fueron cuantificadas. Esto con la finalidad de determinar la relación entre el valor medido y el valor real, es decir las proporciones de res, caballo y soya con las que fueron preparados los homogeneizados previamente. La elaboración de estándares de mezclas de carne en proporciones conocidas permitió determinar si el sistema qPCR es apto para la cuantificación de muestras de composición desconocida, prueba necesaria para la validación de los sistemas qPCR (Köppel *et al.*, 2009; 2010; 2011; Iwobi *et al.*, 2015)

Los valores de las proporciones de ADN de res, caballo y soya de los homogeneizados determinadas por el ensayo qPCR múltiple se muestran en la Tabla 9 y Tabla 10 para los homogeneizados sin y con tratamiento térmico, respectivamente. Los valores medidos respecto a los reales presentaron una alta similitud para el caso de res y el caballo, con coeficientes de correlación de 0.97 para res, de 0.95 para caballo y de 0.77 para la soya en los homogeneizados sin tratamiento térmico. Por otra parte, los coeficientes de correlación para el caso los homogeneizados con tratamiento térmico fueron de 0.92 para res, 0.88 para caballo, y de 0.96 para la soya. En el caso de los homogeneizados sin tratamiento térmico el coeficiente de correlación de la soya fue considerablemente menor al obtenido en el ensayo con homogeneizados con tratamiento térmico. Esta variación sólo se observó en la cuantificación de homogeneizados, más no en la realizada a estándares de ADN. En base lo anterior, es posible considerar que si el sistema puede determinar de manera

Tabla 9. Cuantificación simultánea de estándares de homogeneizados de res, caballo y soya sin tratamiento térmico

Estándar	Mezcla de homogeneizado			Valor medido		
	Caballo (%)	Res (%)	Soya (%)	ADN de Caballo (%)	ADN de Res (%)	ADN de Soya (%)
A1	1	49	50	0.78 ± 0.01	57.05 ± 0.55	8.72 ± 0.12
A2	10	50	40	7.86 ± 0.51	57.99 ± 3.21	7.13 ± 0.60
A3	33.33	33.33	33.33	30.19 ± 0.62	39.57 ± 0.07	6.61 ± 0.21
A4	50	1	49	80.16 ± 3.32	1.14 ± 0.69	16.91 ± 0.30
A5	89	10	1	78.05 ± 1.28	12.07 ± 0.77	0.08 ± 0.38
A6	49	41	41	46.34 ± 2.61	48.15 ± 1.02	2.12 ± 0.13

Valores de % de ADN representan el promedio ± desviación estándar de tres repeticiones (n=3)

Tabla 10. Cuantificación simultánea de estándares de homogeneizados de res, caballo y soya con tratamiento térmico

Estándar	Mezcla de homogeneizado			Valor medido (%)		
	Caballo (%)	Res (%)	Soya (%)	ADN de Caballo (%)	ADN de Res (%)	ADN de Soya (%)
T1	1	49	50	0.64 ± 0.00	54.36 ± 0.09	17.97 ± 0.31
T2	10	50	40	7.62 ± 0.20	63.91 ± 0.35	12.26 ± 1.1
T3	33.33	33.33	33.33	34.64 ± 0.21	49.25 ± 0.64	8.56 ± 0.26
T4	50	1	49	75.19 ± 3.56	1.02 ± 0.03	17.28 ± 0.34
T5	89	10	1	69.40 ± 2.54	11.15 ± 0.09	0.72 ± 0.01
T6	49	41	10	41.82 ± 0.22	50.82 ± 0.21	3.25 ± 0.05

Valores de % de ADN representan el promedio ± desviación estándar de tres repeticiones (n=3)

precisa la proporción de soya en mezclas de ADN y no en mezclas de homogeneizados de otras especies, significa que es la recuperación del ADN de los homogeneizados con soya la que se está viendo perjudicada (Soares *et al.*, 2010). Adicionalmente, la mayor correlación entre el valor medido y el valor real en los homogeneizados con tratamiento térmico para el caso de la soya podría atribuirse a que este tratamiento térmico favoreció la lisis de las células de la soya permitiendo una mayor recuperación de su ADN. Para disminuir este tipo de diferencias, algunos autores como (Laube *et al.*, 2007; Koppel *et al.*, 2009; 2011; Iwobi *et al.*, 2015), han calculado factores de conversión para el análisis de especies en productos cárnicos con la finalidad de reducir significativamente la variabilidad entre el valor real de sus estándares y el valores calculado por medio los sistema qPCR desarrollados. Dichos factores de conversión, incluso permiten disminuir la variabilidad debida al análisis de diferentes tejidos que puedan contener diferente cantidad del ADN blanco. Sin embargo, autores como Laube *et al.*, 2007 y Iwobi *et al.*, 2015, reportan que el realizar este tipo de factores de corrección implica una inversión económica a considerarse. Esto se debe a que dichos factores son obtenidos por medio de múltiples extracciones de ADN que son amplificadas múltiples veces hasta obtener un factor de corrección por cada especie a analizar, lo que implica el uso de gran cantidad de reactivos para extracción de ADN y mezclas PCR, siendo estas últimas especialmente costosas.

Por otra parte, en las mezclas de homogeneizados los valores de desviaciones estándar fueron muy bajas, así mismo los coeficientes de variación obtenidos se presentaron dentro del rango entre 24.16 y 0.17. En este contexto, valores de coeficiente de variación menores a 25 % son considerados aceptables (Köppel *et al.* 2009).

Respecto a las proporciones cuantificadas para las muestras con y sin tratamiento térmico no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para el caso de la carne de caballo y de res. Sin embargo, evidentes diferencias fueron encontradas en la cuantificación del ADN de soya. Así mismo, las diferencias

más relevantes de los valores reales respecto a los valores medidos fue también para soya. Por tal motivo, el sistema qPCR desarrollado en el presente estudio puede ser viable para la cuantificación de la proporción del ADN de res y caballo en productos cárnicos crudos y procesados térmicamente. Mientras que la soya sólo puede ser detectada, ya que los valores medidos de su proporción estuvieron demasiado alejados de los reales en los diferentes estándares analizados.

6.7. Cuantificación de Muestras Comerciales Mediante el Sistema qPCR

Multiplex

Para verificar la aplicación del sistema qPCR múltiple en la cuantificación de proporciones de ADN de res, caballo y soya presente se analizaron productos cárnicos comerciales. Los resultados de las proporciones determinadas para el caso de res y caballo así como de la detección de soya para cada alimento se muestran en la Tabla 11.

Los productos que tuvieron la presencia de ADN de caballo fueron cuatro de las cinco muestras de carne machaca. Sólo una presentó un porcentaje menor al 1 % y fue la carne machaca C. Las proporciones de ADN de caballo en las muestras fue considerablemente alto, superando incluso al 70 % del ADN de la muestra para el caso de las muestras machaca F y machaca B. Por otra parte, la muestras de carne machaca A y C también presentaron ADN de soya. Debe considerarse que ninguna de las carnes machaca tenían reportada la presencia de caballo en su etiqueta. Este tipo de adulteración con carne caballo ya había sido previamente reportada por un estudio realizado en la misma región, Hermosillo, Sonora, México, por Flores-Munguia *et al.* (2000), quienes determinaron la presencia de carne de caballo en carne molida para hamburguesas en centros comerciales de esta ciudad. Por su parte, en otra región del norte de país, Macías *et al.* (2000), detectaron carne de caballo en

Tabla 11. Proporción de ADN de res, caballo y soya presente en los productos cárnicos comerciales analizados mediante el ensayo qPCR múltiplex

Código	ADN		Detección de Soya	Especies reportadas
	Bovino (%)	Caballo (%)		
Atún B	ND	ND	D	Atún y soya
Atún B	ND	ND	D	Atún y soya
Carne para Hamburguesa A	7.70 ± 0.80	ND	D	Res
Carne para Hamburguesa B	6.43 ± 0.14	ND	D	Res
Chorizo A	ND	ND	D	Res
Chorizo B	ND	ND	D	Res
Machaca A	3.27 ± 0.2	42.27 ± 3.2	D	Res
Machaca B	31.63 ± 2.1	72.50 ± 3.1	ND	Res
Machaca C	30.97 ± 1.7	0.11 ± 0.0	D	Res
Machaca D	2.43 ± 0.2	5.68 ± 0.2	ND	Res
Machaca F	31.30 ± 2.3	70.12 ± 2.5	ND	Res
Salchicha	ND	ND	D	Cerdo y soya
Pollo empanizado	ND	ND	D	Pollo

Valores de % de ADN representan el promedio ± desviación estándar de tres repeticiones (n=3)

ND: No determinada. D: Detectada

productos cárnicos como pulpa y carne molida que se comercializaba como elaborada con carne 100% de res.

Por lo tanto, la presente identificación de ADN de caballo en muestras de productos cárnicos demuestra que la práctica de la adulteración con carne de caballo en productos de carne de res es una práctica común. Por otra parte, los estudios antes mencionados sobre la adulteración de carne de caballo en productos cárnicos de res sólo fueron cualitativos. Actualmente con el protocolo qPCR desarrollado en el presente estudio, de aplicarse en el análisis de productos cárnicos comerciales podría ayudar a conocer la proporción de ADN de caballo presente en diferentes muestras comerciales. Los productos cárnicos que presentaron la adición de soya no declarada en su etiqueta fueron las carnes molidas para hamburguesa, la carne machaca y el pollo empanizado. En el caso de las carnes machaca, sólo estaban etiquetadas como elaboradas con carne 100% de res; sin embargo algunas de estas muestras presentaron a las tres especies analizadas en el presente estudio (res, caballo y soya) en su composición.

Por otra parte, en la mayoría de los productos cárnicos comerciales analizados, la suma de las proporciones de las especies que fueron determinadas no llegó al 100 % de ADN de la muestra. El porcentaje restante que no fue identificado para ninguna de las tres especies podría corresponder a otras especies animales. Asimismo, diversos factores pueden intervenir en la cuantificación del ADN de especies en productos cárnicos, algunos tales como: el tipo de tejido empleado o procesamiento térmico. Se ha reportado que los tejidos con alta cantidad de grasa tienen menos concentración de ADN que aquellos con menor cantidad (Laube *et al.*, 2008). No obstante, existen maneras de disminuir este tipo de variaciones, como es el empleo de factores de corrección obtenidos a partir del análisis de matrices estándares mencionados anteriormente (Laube *et al.*, 2008; Koppel *et al.*, 2008; 2009).

6.8. Límite de detección

El límite mínimo de detección (LOD, por sus siglas en inglés) es la mínima cantidad del ADN de interés que el sistema qPCR permite detectar (Bustin *et al.*, 2009). En el presente estudio, el límite de detección para el caso del ADN sin tratamiento térmico fue de 250 pg para el caso del ADN de res y soya, mientras que para el caso del ADN de soya fue de 25 pg. Por otra parte, para el ADN de las muestras con tratamiento térmico este fue de 2.5 pg para res y caballo, y de 25 pg para soya. La diferencia entre los LOD se debe a que el tratamiento térmico de las muestras afecta negativamente la mínima cantidad de ADN detectable (Ballin, 2010). Por otra parte, las diferencias entre el LOD de la soya y el LOD del ADN de res y caballo, pueden explicarse en base a que la soya es poliploide y por lo tanto tiene una mayor cantidad de ciertos genes dentro de su genoma (incluyendo el gen Le1, empleado como blanco en el presente estudio), es decir están en multicopia, hecho que no sucede con los organismos diploides como la res y caballo, que tienen sólo dos copias de cada gen en su genoma (Elsik *et al.*, 2009; Schmutz *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013). Por lo tanto, al haber más copias de gen blanco para la soya, el tratamiento térmico no afecta su límite de detección como sucede como el caballo y la res.

VII. CONCLUSIONES

El protocolo analítico qPCR múltiple desarrollado en este estudio permitió detectar hasta un 1 % del ADN de las especies de res, caballo y soya presentes en mezclas de carne cruda y procesadas térmicamente a 121 °C por 15 min..

Asimismo, se logró cuantificar, de manera experimental, la proporción del ADN de res y caballo en estas matrices.

Las diferencias entre los valores reales y medidos pueden disminuirse si se emplean factores de corrección obtenidos mediante el análisis de matrices de soya.

Adicionalmente, en el análisis de productos cárnicos comerciales mediante el uso de este protocolo, se logró evidenciar de manera satisfactoria, la adición no reportada de carne de caballo y soya.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AMEG. Asociación Mexicana de Engordadores de Ganado Bovino, AMEG A.C.
Disponible en: <http://www.ameg.org.mx/estadisticas/nacional/>
- Applied Biosystems. qPCR (Real-Time PCR). Disponible en:
<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applicationstechnologies/real-time-pcr.html>
- Ali, M.E., Hashim, U., Mustafa, S., Che Man, Y.B., Dhahi, T.S., Kashif, M., y Hamid, S.B. (2012). Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by Taqman probe real-time polymerase chain reaction. *Meat Science*, 91(4), 454-459. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.02.03.
- Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., y Guidi, A. (2012). Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of *Sardina pilchardus*), Rossetto (*Aphia minuta*), and Icefish in fresh, marinated and cooked products. *Food Chemistry*, 133(1), 184-192.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., y Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Cancer Research*. 5(2), 209-219.
- Asensio, L., González, I., García, T., y Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19(1), 1-8.

- Ayaz, Y., Ayaz, N. D. y Erol I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods*. 17(1): 214-220.
- Ballari, R. V., y Martin, A. (2013). Assessment of DNA degradation induced by thermal and UV radiation processing: Implications for quantification of genetically modified organisms. *Food Chemistry*, 141(3), 2130-2136.
- Ballin, N.Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577-587.
- Ballin, N.Z., Vogensen, F.K., y Karlsson, A.H. (2009). Species determination. Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83(2), 165-174.
- Belloque, J., García, M., Torre, M., y Marina, M. (2002). Analysis of soybean proteins in meat products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(5), 507-532.
- Bò, C. D., Simonetti, P., Gardana, C., Riso, P., Lucchini, G., y Ciappellano, S. (2013). Horse meat consumption affects iron status, lipid profile and fatty acid composition of red blood cells in healthy volunteers. *International journal of food sciences and nutrition*, 64(2), 147-154.
- Bottero, M.T., y Dalmaso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, 190(1), 34-38.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., y Shipley, G.L. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.

- Callbeck, C. M., Sherry, A., Hubert, C. R., Gray, N. D., Voordouw, G., y Head, I. M. (2013). Improving PCR efficiency for accurate quantification of 16S rRNA genes. *Journal of microbiological methods*, 93(2), 148-152.
- Caldentey Albert, P., y Haro Giménez, T. d. (2004). Comercialización de productos agrarios. *Editorial Agrí*.
- Calvo, J., Zaragoza, P., y 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(8), 2108-2112.
- Cammà, C., Di Domenico, M., y Monaco, F. (2012). Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, 23(2), 400-404.
- Cota-Rivas, M., y Vallejo-Cordoba, B. (1996). Capillary electrophoresis for meat species differentiation. *Journal of capillary electrophoresis*, 4(4), 195-199.
- Chapela, M. J., Sotelo, C. G., Pérez-Martín, R. I., Pardo, M. Á., Pérez-Villareal, B., Gilardi, P., y Riese, J. (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*, 18(10), 1211-1215.
- Chisholm, J., Conyers, C., Booth, C., Lawley, W., y Hird, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Science*, 70(4), 727-732. doi:
- Dalvit, C., De Marchi, M., y Cassandro, M. (2007). Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science*, 77(4), 437-449.
- Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., y White, B. A. (1993). Polymerase chain reaction *PCR Protocols*, 15(1), pp. 1-29.

- Di Pinto, A., Forte, V. T., Conversano, M. C., y Tantillo, G. M. (2005). Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control*, 16(5), 391-394.
- Dooley, J.J., Paine, K.E., Garrett, S.D., y Brown, H.M. (2004). Detection of meat species using Taqman real-time PCR assays. *Meat Science*, 68(3), 431-438.
- Ducauze, C. J., y Esteban, J. M. P. (2006). *Fraudes alimentarios: legislación y metodología analítica*: Acribia.
- Elsik, C. G., Tellam, R. L., and Worley, K. C. (2009). The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 324(5926), 522-528.
- EURL. (2014) European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in Feedingstuffs. Detection of horse DNA using real-time PCR. Disponible en: <http://eurl.craw.eu/en/187/method-of-reference-and-sops>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2013). Meat and Meat Products. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home.html>
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., y Martín, R. (2006). PCR-RFLP Authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos Taurus*), Sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.* 54: 1144-1150.
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P., García, T. y Martín, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science* 79(2): 289-298.

- Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., y Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science and Technology*, 21(8), 408-421.
- Flores-Munguia, M., Bermúdez-Almada, M., y Vázquez-Moreno, L. (2000). A research note: Detection of adulteration in processed traditional meat products. *Journal of Muscle Foods*, 11(4), 319-325.
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., y Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55-63.
- Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62(3), 309-321.
- García, I. F., Fajardo, I. M. E., Rosado, A. L., y Rivero, M. L. (2012). Evaluación de la eficacia de un extracto alergénico de soya para el diagnóstico de hipersensibilidad inmediata. *Revista Alergia México*, 59(2), 47-55.
- Ghovvati, S., Nassiri, M. R., Mirhoseini, S. Z., Moussavi, A. H., y Javadmanesh, A. (2009). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*, 20(8), 696-699.
- Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J. L., y Demeulemester, C. (2004). Species identification of meat products by ELISA. *International journal of food science and technology*, 39(8), 863-867.
- Gomez, A. M. G., Brohée, M., de Andrade Silva, E., van Hengel, A. J., y Chassaigne, H. (2011). Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food. *Food Chemistry*, 127(2), 834-841.

- González-Córdova, A., de la Barca, A.C., Cota, M., y Vallejo-Córdova, B. (1998). Immunochemical detection of fraudulent adulteration of pork chorizo (sausage) with soy protein. *Food Science and Technology International*, 4(4), 257-262.
- Haider, N., Nabulsi, I., y Al-Safadi, B. (2012). Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. *Meat Science*, 90(2), 490-493.
- Haunshi, S., Basumatary, R., Girish, P., Doley, S., Bardoloi, R., y Kumar, A. (2009). Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. *Meat Science*, 83(3), 454-459.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., y Williams, P. M. (1998). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., y Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23(3), 504-511.
- Hernández-Chávez, J. F., Fernández-Cordova, A. F., Torrescano, G. R., Escalante, A. S., Arriola, J. P. C., y Vallejo-Cordoba, B. (2007). Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados térmicamente. *Nacameh*, 1(1), 97.
- Herzallah, S. M. (2012). Detection of genetically modified material in feed and foodstuffs containing soy and maize in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 169-172.
- Hird, H., Chisholm, J., Sanchez, A., Hernandez, M., Goodier, R., Schneede, K., y Popping, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food additives and contaminants*, 23(7), 645-650.

- Hoffman, J. R., y Falvo, M. J. (2004). Protein—which is best? *Journal of sports science and medicine*, 3(3), 118.
- Ilbery, B., y Kneafsey, M. (1999). Niche markets and regional speciality food products in Europe: towards a research agenda. *Environment and Planning A*, 31(12), 2207-2222.
- Iwobi, A., Sebah, D., Kraemer, I., Losher, C., Fischer, G., Busch, U. y Huber, I. (2015). A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food Chemistry* 169: 305-313.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., y Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59(1), 5-13.
- Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., y Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science*, 82(4), 444-449.
- Köppel, R., Dvorak, V., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., Eugster, A., y Waiblinger, H.U. (2010). Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *European Food Research and Technology*, 230(3), 367-374.
- Köppel, R., Ruf, J., y Rentsch, J. (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *European Food Research and Technology*, 232(1), 151-155.
- Köppel, R., Zimmerli, F., y Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *European Food Research and Technology*, 230(1), 125-133.
- Kvasnička, F. (2005). Capillary electrophoresis in food authenticity. *Journal of separation science*, 28(9-10), 813-825.

- Lin, C. C., Fung, L. L., Chan, P. K., Lee, C. M., Chow, K. F., y Cheng, S. H. (2014). A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species. *Meat Science*, 96(2), 922-929.
- Lombardi-Boccia, G., Lanzi, S., y Aguzzi, A. (2005). Aspects of meat quality: trace elements and B vitamins in raw and cooked meats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 39-46.
- Lorenzo, J. M., Sarriés, M. V., Tateo, A., Polidori, P., Franco, D., y Lanza, M. (2014). Carcass characteristics, meat quality and nutritional value of horsemeat: A review. *Meat Science*, 96(4), 1478-1488.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., y Strömbom, L. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2), 95-125.
- La Neve, F., Civera, T., Mucci, N y Bottero, M. T. (2008). Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Sci* 80(2): 216-224.
- Laube, I., Spiegelberg, A., Butschke, A., Zagon, J., Schauzu, M., Kroh, L. y Broll, H. (2003). Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Science and Technology* 38(2): 111-118.+ Lawrie, R. A., Barrado, A. M., Buesa, P. L. L., and Esteban, B. M. (1998). *Ciencia de la carne*: Acribia Zaragoza. 6(2), 220-251.
- LGSM (2008). Ley General de Salud. *México: Diario Oficial de la Federación*.
Disponible en:
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5339161&fecha=02/04/2014
- Lockley, A., y Bardsley, R. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11(2), 67-77.

- López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M.I., y Puyet, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 73-82.
- Luthy, J. (1999). Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control* 10(6): 359-361.
- Macedo-Silva, A., Barbosa, S., Alkmin, M., Vaz, A., Shimokomaki, M., y Tenuta-Filho, A. (2000). Hamburger meat identification by dot-ELISA. *Meat Science*, 56(2), 189-192.
- Macías, J. A., de la Vegac, G. E., Prietod, C., y González, F. A. (2000). Identificación del origen de especie animal en carne fresca utilizando inmunodifusión doble. *Técnica Pecuaria en México*, 38(3), 231-237.
- Mafra, I., Ferreira, I. P., y Oliveira, M. B. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649-665.
- Maldonado-Siman, E., Bai, L., Ramírez-Valverde, R., Gong, S., y Rodríguez-de Lara, R. (2014). Comparison of implementing HACCP systems of exporter Mexican and Chinese meat enterprises. *Food Control*, 38(0), 109-115.
- Maldonado, E. S., Henson, S. J., Caswell, J. A., Leos, L. A., Martinez, P. A., Aranda, G., y Cadena, J. A. (2005). Cost-benefit analysis of HACCP implementation in the Mexican meat industry. *Food Control*, 16(4), 375-381.
- Manzano, V. V., y De Aluja, A. S. (1998). Estado actual de algunas plantas de sacrificio de animales para consumo humano en México. *Vet. Mex*, 29(3), 273.

- Marques, A., Lourenço, H. M., Nunes, M. L., Roseiro, C., Santos, C., Barranco, A., y Cencic, A. (2011). New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood. *Food Research International*, 44(2), 510-522.
- Mataragas, M., Skandamis, P., Nychas, G. J. y Drosinos, E. H. (2007). Modeling and predicting spoilage of cooked, cured meat products by multivariate analysis. *Meat Science*, 77(3), 348-356.
- Mateo, J., Caro, I., Figueira, A. C., Ramos, D., y Zumalacarregui, J. M. (2009). Meat processing in Ibero-American countries: a historical view. *Traditional food production and rural sustainable. A European challenge. Ashgate publishing limited. Farnham, Surrey, Reino Unido*, 121-134.
- Metrología, L. F. (1992). Normalización, publicada en el *Diario Oficial de la Federación*
- Meza-Márquez, O. G., Gallardo-Velázquez, T., y Osorio-Revilla, G. (2010). Application of mid-infrared spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. *Meat Science*, 86(2), 511-519.
- Mohamad, N. A., El Sheikha, A. F., Mustafa, S., y Mokhtar, N. F. K. (2013). Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International*, 50(1), 330-338.
- Morfin-Maciel, B. M., y Castillo-Morfin, B. M. (2011). Angioedema y broncoconstricción paradójica secundarios a bromuro de ipratropio/salbutamol administrados por inhalador de dosis medida en pacientes alérgicos a la soya. *Angioedema y broncoconstricción paradójica secundarios a bromuro de ipratropio/salbutamol administrados por inhalador de dosis medida en pacientes alérgicos a la soya*, 58(4), 219-223.

- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62(4), 415-424.
- Mottram, D. S. (2007). The Maillard reaction: source of flavour in thermally processed foods *Flavours and Fragrances*, 62(4), pp. 269-283.
- Pereira, P. M. y Vicente, A. F., (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586-592.
- Picos-Aguilera, D., y Leyva Yucopicio, I. (1998). Caracterización de dos métodos inmunológicos para la identificación de especies en productos cárnicos emulsificados
- Pinto, A. D., Forte, V., Guastadisegni, M. C., Martino, C., Schena, F. P., y Tantillo, G. (2007). A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*, 18(1), 76-80.
- Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal—A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, 34(2), 568-569.
- Price, J. F., Schweigert, B. S., y de la Fuente, J. L. (1994). *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*: Acribia. 1(2), 123-130.
- Püssa, T. (2013). Toxicological issues associated with production and processing of meat. *Meat Science*, 95(4), 844-853.
- Quintero-Salazar, B., Álvarez, Á. S., Dublán, O., García, F. C., Castellón-Jardón, J., y Estado de México, C. (2011). Tipificación parcial de embutidos artesanales de la Ciudad de Toluca: Chorizo verde. *Nacameh*, 5(1), 10-26.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., y Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 856-862.

- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. (2004) Diario Oficial de la Federación [DOF].
- Renčová, E., y Tremlová, B. (2009). ELISA for detection of soya proteins in meat products. *Acta Veterinaria Brno*, 78(4), 667-671.
- Resurreccion, A. (2004). Sensory aspects of consumer choices for meat and meat products. *Meat Science*, 66(1), 11-20.
- Reyes-Cano, R., Dorantes-Alvarez, L., Hernandez-Sanchez, H., y Gutierrez-Lopez, G. F. (1994). A traditional intermediate moisture meat: Beef cecina. *Meat Science*, 36(3), 365-370.
- Rodríguez-Lazaro, D., y Hernández, M. (2013). Real-time PCR in food science: introduction. *Curr Issues Mol Biol*, 15, 25-38.
- Rodríguez-Ortiz, P. G., Muñoz-Mendoza, D., Arias-Cruz, A., González-Díaz, S. N., Herrera-Castro, D., y Vidaurri-Ojeda, A. C. (2009). Características epidemiológicas de pacientes con alergia a alimentos atendidos en el Centro Regional de Alergias e Inmunología Clínica de Monterrey. *Revista Alergia México*, 56(6), 185-191.
- Rodríguez, R. (2008). Detección de soya en atún enlatado mediante el análisis de productos PCR por electroforesis capilar.
- Rojas, M., González, I., García, T., Hernández, P. E., y Martín, R. (2012). Authentication of meat and commercial meat products from common pigeon (*Columba livia*) woodpigeon (*Columba palumbus*) and stock pigeon (*Columba oenas*) using a TaqMan[®] real-time PCR assay. *Food Control*, 23(2), 369-376.
- Ruijter, J., Ramakers, C., Hoogaars, W., Karlen, Y., Bakker, O., Van den Hoff, M., y Moorman, A. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and

bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, 37(6), 45-50.

Şakalar, E., y Abasıyanık, M. F. (2012). The development of duplex real-time PCR based on SYBR Green fluorescence for rapid identification of ruminant and poultry origins in foodstuff. *Food Chemistry*, 130(4), 1050-1054.

Sentandreu, M. A., Sentandreu, E. (2011). Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Science*, 89(3), 280-285.

Sentandreu, M. Á., y Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: Tools against fraud. *Food Research International*, 60(0), 19-29.

Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., y Cheng, J. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *nature*, 463(7278), 178-183.

Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Norma Oficial Mexicana. NOM-030-SCFI-2006. Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta. Especificaciones. Diario Oficial de la Federación [DOF].

Secretaría de Comercio y Fomento Industrial/Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-051-SCFI/SSA1-2010. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Información comercial y sanitaria. Diario Oficial de la Federación [DOF].

Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.

Secretaría de Salud Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS. Productos cárnicos procesados.

Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación [DOF].

(SAGARPA) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2009). Estudio de mercado y sistema de exportaciones de carne a Estados Unidos de América, Europa y Asia de plantas tipo inspección federal (Génesis consultoría Publicación No. UGR-BC 2009). Baja California, México. Disponible en http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/UGRBC.pdf.

(SAGARPA) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2012). Estudio de mercado y sistema de exportaciones de carne a Estados Unidos de América, Europa y Asia de plantas tipo inspección federal (Génesis consultoría Publicación No. UGR-BC 2009). Baja California, México. Disponible en http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/UGR4C.pdf.

Shokere, L. A., Holden, M. J., y Ronald Jenkins, G. (2009). Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. *Food Control*, 20(4), 391-401.

Singer, V. L., Jones, L. J., Yue, S. T., y Haugland, R. P. (1997). Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry*, 249(2), 228-238.

Soares, S., Amaral, J. S., Mafra, I., y Oliveira, M. B. (2010). Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. *Meat Science*, 85(3), 531-536.

Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., y Akiyama, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef,

mutton, and horseflesh in foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(12): 3131-3135.

Töwe, S., Kleineidam, K., y Schloter, M. (2010). Differences in amplification efficiency of standard curves in quantitative real-time PCR assays and consequences for gene quantification in environmental samples. *Journal of microbiological methods*, 82(3), 338-341.

Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., Mazorra-Manzano, M. A., y Rodríguez-Ramírez, R. (2005). Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *Journal of separation science*, 28(9-10), 826-836.

Vallejo-Cordoba, B., Rodríguez-Ramírez, R., y González-Córdova, A.F. (2010). Capillary electrophoresis for bovine and ostrich meat characterization. *Food Chemistry*, 120(1), 304-307.

Yang, Y., Wang, J., y Di, J. (2013). Comparative Inference of Duplicated Genes Produced by Polyploidization in Soybean Genome. *International journal of genomics*, 2013.

Zhang, T., and Fang, H. H. (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 281-289.

Zhang, C.L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., y Slater, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*, 18(9), 1149-1158.

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., y Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22(1), 130-139.