

Centro de Invasnaactín en 111memaclon V Desarrollo, A.C.

Detección de Soya en Atún Enlatado Mediante el Análisis de Productos PCR por Electroforesis Capilar

Por

Roberto Rodríguez Ramírez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

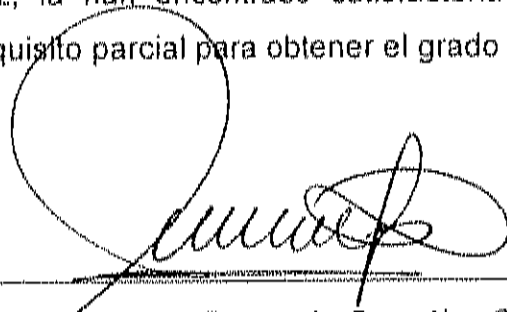
COMO REQUISITO PAF CIAL PAF:A OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

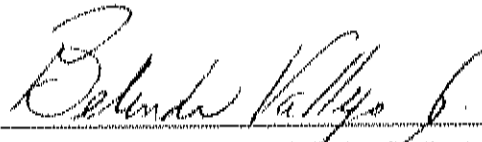
ENERO DEL... 2007

APROBACION

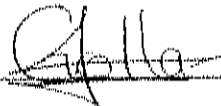
Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Q.B Roberto Rodríguez Ramirez, la han encontrado satisfactoria y recomienda que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestria en Ciencias.



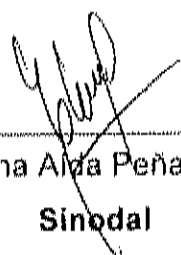
M. en C. Aarón Fernando González Córdova
Director de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Gallad
Sinodal



Dra. Teresa Gollas Galván
Sinodal

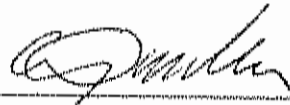


Dra. Etna Alda Peña Ramos
Sinodal

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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 del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.)

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, A.C. previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del Director de Tesis.



Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por las virtudes otorgadas en mi pequeña vida

A la **Universidad de Sonora** por haber forjado las bases para mis estudios de posgrado.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)** por permitirme realizar mi formación como Maestro en Ciencias.

A mi director de tesis, **M en C. Aarón Fernando González Córdova** que más que un tutor, es un gran amigo al que admiro y respeto mucho. Gracias Aarón por tus conocimientos y experiencias compartidas en este tiempo y por toda esa ayuda que me brindaste tanto dentro como fuera de CIAD.

A la **Dra. Belinda Vallejo Galland**, por su apoyo incondicional al presente trabajo de investigación y por introducirme a la disciplina de la investigación en el campo de los alimentos. Gracias Dra. por permitirme formar parte de un gran grupo de investigación.

A mi comité de tesis integrado por: **Dra. Belinda Vallejo Galland, Dra. Teresa Gollas Galván y Dra. Etna Aída Peña Ramos**. Por sus valiosas aportaciones y observaciones al presente trabajo de investigación

A la Coordinación de Programas Académicos de CIAD por todos los apoyos académicos y económicos, en especial a la **Dra. Ana María Calderón de la Barca, Héctor Galindo, Ana Isabel, Laurita, Verónica**, sin olvidar a **Héctor Cota**. Gracias a toda la Coordinación de Docencia.

A mis maestros de posgrado, en especial al **Dr Ramón Pacheco** y al **M. en C. Humberto González**, gracias por sus conocimientos y enseñanzas impartidas

Al personal de biblioteca, en especial a **Gerardo Reina** y **Luis Conde**, gracias por su atención y asesoría en la biblioteca.

Al Laboratorio de Productos Pesqueros, en especial a las **Maestras en Ciencias Guillermina Sánchez, María Elena Lugo y Gisela Carballo** (las chicas súper poderosas) por su apoyo y por brindarme el acceso a los equipos de laboratorio

A la **M. en C. María del Carmen Estrada Montoya** por el apoyo técnico recibido en el laboratorio, así como en la utilización de equipos analíticos durante el trabajo

Al **M. en C. Juan Pablo Valenzuela Avendaño** por el apoyo en las técnicas de biología molecular y las importantes discusiones de resultados ("sepa la bola")

Al **Dr. Martín Meza Nieto** y a la **M. en C. María de Jesús Torres Llanez** por su amistad y los grandes momentos vividos y compartidos en el laboratorio.

A mis compañero del **Laboratorio de Autenticidad de los Alimentos**, pero de manera muy especial al **M en C. Néstor Gutiérrez Méndez** por sus consejos académicos y sus consejos sobre la vida cotidiana.

.A mis **compañeros de maestría**, en especial a mis amigos **Bibiana Espinoza, Oralia, Francisco Torres y Cinthya Jiménez**, gracias por su gran amistad de la cual espero que perdure para siempre.

A mis grandes amigos, **Samuel Rodríguez, Xavier Rodríguez, Raúl Córdoba, Josué Onofre, Juan José García, Ricardo Díaz y Luis Murillo**, los cuales siempre han estado y compartido diferentes etapas de mi vida. Gracias.

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE MI ABUELO

Roberto Larios, que día a día lo llevo en mis recuerdos

A MI ABUELA

Cecilia Bañuelos, la cual siempre llevo en mi corazón y querré como una segunda madre.

A MIS PADRES

Raúl Rodríguez y Rosario Ramírez, ya que sin su apoyo, comprensión y cariño muchas cosas en mi vida no se lograrían. Gracias.

A MIS HERMANOS

Ramses, Raúl y Román, a quienes quiero y agradezco sus consejos y apoyo en mi vida. Gracias hermanos por esos lazos sanguíneos de amistad y cariño.

A MI PEQUEÑA FAMILIA

A MI ESPOSA: Luz Angélica Ávila Villa, por ser una luz en mi camino, aceptarme como soy y quererme. Gracias por darme esa chipita de vida (hijo) y pasar grandes momentos junto. TE AMA y TE QUIERE tu esposo **Roberto**

A MI HIJO: Roberto Uriel Rodríguez, por ser la nueva razón de luchar y vivir en mi pequeño mundo.

CONTENIDO

	PÁGINA
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Adición de Soya en Alimentos Térmicamente Procesados.....	4
Productos Marinos.....	4
Usos y Restricciones de Soya como Aditivo para Alimentos.....	5
Adulteración con Soya.....	5
Moléculas Utilizadas para Detectar Soya	7
Clasificación de proteínas de soya.....	7
Gen β -conglucina.....	7
Gen Lectina (Le1).....	8
Métodos para la Detección de Soya.....	8
Ensayo Inmunológico ligado a enzima.....	9
Cromatográficos.....	10
HPLC.....	10
GC.....	11
Técnicas de biología molecular.....	12
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	12

Microarreglos.....	14
Electroforesis capilar.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Obtención de las Muestras.....	18
Reactivos.....	18
Análisis de Muestras y Mezclas de Atún con Soya.....	19
Extracción de DNAg de Soya.....	19
Secuencia de "Primers" o Cebadores.....	21
Amplificación de DNAg por PCR.....	21
Determinación de los Productos PCR por Electroforesis.....	24
Electroforesis convencional en gel.....	24
Electroforesis capilar (CE).....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26

Extracción del DNA Genómico (DNAg) de Soya.....	26
Extracción de DNAg en productos de soya.....	26
Extracción de DNAg en mezclas de atún con soya.....	28
Identificación de la Especie de Atún (<i>Thunnus albacares</i>).....	29
Amplificación de los Genes Constitutivos de Soya.....	31
Amplificación del gen β -conglucina subunidad α	31
Amplificación del gen de lectina (Le1).....	34
Optimización y Desarrollo de un Método de (EC) para la Detección de Productos PCR.....	37
Utilización del Kit eCAP dsDNA 1000™.....	40
Marcador de peso molecular ϕ X-174 RF/ Hae III.....	40
Utilización de HEC al 2%.....	42
Utilización de HEC al 3%.....	44
Productos PCR Obtenidos por EC.....	50

Identificación de la especie de atún aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>).....	50
Especificidad de Primers para detectar soya analizados por EC.....	52
Detección de productos PCR para el gen β - conglinina subunidad α y Le1 analizados por EC.....	52
Reacciones Inespecíficas en mezclas de atún con soya detectadas por EC.....	55
Detección de atún con soya en mezclas procesadas térmicamente por EC.....	58
CONCLUSIONES.....	62
RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1.	Primers para detectar productos de soya y atún (<i>Thunnus albacares</i>).....	22
2.	Parámetros de amplificación del DNAg problema.....	23
3.	Reproducibilidad de los tiempo de migración del marcador de DNA ϕ X-174 RF/ Hae III (72-1353 pb).....	48
4.	Reproducibilidad de los tiempo de migración del marcador de DNA low mass (100-2000pb).....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Principio de separación del DNA por una Matriz de sílice.....	27
2.	Electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR de atún de aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>).....	30
3.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR del gen β -conglucina sub α (202 pb) . .	32
4.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR de los primers β -conglucina subunidad α y Le1 en músculo de atún crudo.....	33
5.	Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, mostrando la amplificación y reacciones inespecíficas del gen β -conglucina subunidad α en muestras de atún procesadas térmicamente	35
6.	Electroforesis en gel de agarosa al 2 % mostrando la amplificación del gen Le1 (118 pb)..	36
7.	Electroforesis en gel de agarosa al 2 % mostrando la amplificación de gen Le1 en muestras de atún con soya procesadas térmicamente.....	38
8.	Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, mostrando la detección de soya en atún enlatado mediante el gen Le1..	39
9.	Electroferograma típico del marcador de pesos moleculares ϕ X-174 RF/ Hae III obtenido por el kit electroforético eCAP dsDNA 1000 TM	41

10.	Electroferogramas típicos de marcadores moleculares.....	43
11.	Electroferogramas típicos de los marcadores moleculares utilizando HEC al 3%.....	45
12.	Electroferograma típico del marcador molecular low mass (100-2000pb) utilizando HEC al 3%.....	47
13.	Electroferograma típico de la especie de atún de aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>).....	51
14.	Electroferograma típico de la especie de atún de aleta amarilla (100 % procesado) (<i>Thunnus albacares</i>).....	53
15.	Electroferogramas típicos de la especificidad de los primer de soya con atún de aleta amarilla.....	54
16.	Electroferogramas típicos de la amplificación de los genes β -conglinina subunidad α y Le1.....	56
17.	Electroferogramas típicos de las reacciones inespecíficas de la amplificación de los gen β -conglinina subunidad α en mezclas de atún con soya en aceite procesadas térmicamente con diferentes porcentajes de adición.....	57
18.	Electroferogramas típicos de la amplificación del gen Le1 en mezclas de atún con soya en agua procesadas térmicamente con diferentes porcentajes de adición.....	59
19.	Electroferograma típicos de la amplificación del gen Le1 en muestra comercial de atún.....	60

RESUMEN

Debido a la alta demanda de atún enlatado en México (consumo per capita 1.1 Kg/año), la industria atunera ha incurrido en el uso excesivo de proteína de soya para rehidratar y expandir el pescado en el proceso del enlatado. Pese a que existen restricciones para la utilización de soya en los alimentos, los controles se han hecho con la finalidad de establecer parámetros de autenticidad y de proteger la salud de individuos hipersensibles a la proteína de soya, se conoce que, existen marcas comerciales de atún enlatado, que sin declararlo en su etiquetado, añaden soya al pescado para extenderlo. Recientemente se ha hecho público, por parte de la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO), un estudio que evidenció esta práctica fraudulenta, situación que representa un engaño a los consumidores, además de una competencia desleal entre industrializadores. Las metodologías analíticas para detectar soya, hasta ahora disponibles, solo han sido desarrolladas para productos lácteos y cárnicos, sin embargo esta misma problemática para el caso de la industria procesadora de pescados, no ha sido abordada. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método por PCR y electroforesis capilar (EC) para detectar soya en atún enlatado, que sin estar declarada en el etiquetado, es adicionada a este producto. Para lograr este objetivo, se establecieron las condiciones de un método analítico por electroforesis capilar para la detección de productos PCR de las muestras analizadas utilizando fluorescencia inducida por láser (LIF). Se obtuvieron patrones característicos para los estándares de PM, Φ X-174 RF/ Hae III (72-1353 pb), low DNA rna ladder (100-2000 pb) y del gen constitutivo Le1 (118pb), β -conglucina subunidad α (202 pb) y muestras comerciales. La metodología desarrollada resultó altamente reproducible y sensible para la detección de soya en atún enlatado, contribuyendo así al desarrollo de nuevas metodologías analíticas que pueden contribuir a frenar adulteraciones con soya en este alimento.

INTRODUCCIÓN

La captura de túnidos (atún aleta amarilla, aleta blanca, bonito y barrilete) es una de las pesquerías más importantes en México. Esta se desarrolla prácticamente en el litoral del pacífico. En México, casi el 40 % de la población no consume productos pesqueros frescos, debido principalmente, al bajo poder adquisitivo de ciertos estratos de la población y a la falta de infraestructura para almacenar grandes volúmenes de productos marinos en algunas zonas del país. Lo anterior ha generado que las especies marinas enlatadas, por sus ventajas sobre las especies frescas, sean de consumo generalizado, entre ellas el atún enlatado (ICEX, 2002).

Debido al consumo per capita de atún enlatado en nuestro país (1.1 Kg/año), la industria procesadora ha incurrido en el uso excesivo de productos de soya (texturizados), cuya función es la de rehidratar y expandir el pescado en el proceso del enlatado (Sipos, 1996). Sin embargo existen restricciones para la utilización de soya en los alimentos. Estas restricciones se han hecho con la finalidad de establecer parámetros de autenticidad, para alertar y prevenir a individuos sensible a contraer alergias por consumo de proteínas de soya, y recientemente por la utilización de soya transgénica en algunos alimentos, lo cual, hasta hoy, causa polémica en los consumidores (Lau *et al.*, 2004).

En México la adición de soya esta regulada, y se solicita que un alimento que la contenga, la declare en la lista de ingredientes, ya que se asocia como un aditivo promotor de reacciones alérgicas (NOM-084-SCFI-1994). Dentro de los aditivos permitidos para pescados en conserva, de acuerdo a la NOM-028-SSA1-1993, la soya no se enlista bajo esta denominación, por lo cual la presencia de soya en un pescado en conserva, sin declararlo en su etiqueta, debe ser considerada como una adulteración del mismo.

Recientemente la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) publicó los resultados de un estudio realizado, a nivel nacional, en donde se analizaron muestras comerciales de atún. Los resultados obtenidos publicados, evidenciaron que existen en el mercado nacional, marcas comerciales de atún que están adicionadas con soya, sin declararlo en su etiqueta comercial. Lo anterior no solo representa una competencia desleal, sino que es un engaño a los consumidores, ya que estos esperan obtener a cambio de su dinero, un producto que se ajuste a lo descrito en la lista de ingredientes de su etiqueta (PROFECO, 2005). Cabe mencionar que este reporte no especifica el método analítico por el cual fue determinada la soya en el atún enlatado.

Si bien existen diferentes métodos para detectar soya, como lo son los métodos inmunológicos (González-Córdova *et al.*, 1998; Koppelman *et al.*, 2004), los cromatográficos (Mellenthin *et al.*, 1999), y los que aplican técnicas de biología molecular (Magaña-Gómez *et al.*, 2003). Una gran cantidad de estos métodos se han desarrollado para analizar productos cárnicos y lácteos primordialmente, además presentan algunas desventajas como por ejemplo las reacciones cruzadas del ELISA, baja resolución y capacidad de cuantificación como la electroforesis y PCR convencional en gel (Castagnino, 2000; Koppelman *et al.*, 2004; García-Cañas *et al.*, 2004).

La electroforesis capilar (CE por sus siglas en idioma inglés), en los últimos años, ha mostrado ser una técnica analítica que reúne características notables como son: rapidez, precisión, cuantificación y automatización (Ibáñez y Cifuentes, 2001; Castagnino, 2000). Así mismo su gran versatilidad derivada de las distintas modalidades en las que puede operar y separar una gran variedad de analitos, como proteínas, péptidos, DNA, aminoácidos, ácidos orgánicos, aditivos, entre muchos otros. Estas cualidades aunadas a otras metodologías, como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y espectrometría de masas (MS) la hacen aún más versátil y potente.

Con base en lo anterior, y con la finalidad de contribuir al avance del conocimiento en el desarrollo de nuevos y mejores métodos analíticos que coadyuven a las agencias reguladoras y laboratorios de control a la detección específica y sensible de adulterantes para tener un mejor control, el objetivo del presente trabajo fue estandarizar y optimizar un método por electroforesis capilar para el análisis de productos PCR para determinar la presencia de soya en atún enlatado.

ANTECEDENTES

Adición de Soya en Alimentos Procesados Térmicamente

La adición de proteína de soya en diferentes alimentos procesados térmicamente, se ha realizado para conferir propiedades emulsificantes, textura, y favorecer la retención de agua en sistemas alimenticios complejos (Parks y Carpenter, 1987).

Entre los derivados de soya que se adicionan a los alimentos se encuentran las harinas, los concentrados, los aislados y los texturizados. Estos se clasifican de acuerdo a su contenido proteico. En cada una de estas clasificaciones existe una variedad de productos con propiedades únicas y diversas (Mandigo y Sander, 1989).

Productos Marinos

El uso de soya en los alimentos de origen marino, se puede observar claramente en los productos basados en pasta de pescado. Dichos alimentos están por lo general en forma de gel o picados y tienen como base un ingrediente de pescado molido, al cual se le conoce como surimi (Sipos, 1996). La soya texturizada se mezcla con carne de pescado para formar una matriz, que posteriormente se moldea como camarón y barritas de pescado, las cuales se empanizan, frien y congelan (Sipos, 1996).

Debido al tratamiento térmico severo del enlatado de algunas especies marinas como atún y salmón, algunas propiedades del músculo, como la capacidad de retención de agua (CRA) y la textura se ven afectadas

negativamente, por lo cual se utilizan extractos de soya en el líquido de cobertura, para que la carne no se encoja y su aspecto sea más jugoso (PROFECO, 2005).

Usos y Restricciones de Soya como Aditivo para Alimentos

Evidentemente la utilización de soya en la tecnología de alimentos, es debido a su bajo costo de aplicación, además de sus diferentes propiedades tecnológicas, ya que puede ser empleada en una gran diversidad de alimentos. Sin embargo su utilización tiene que ser regulada por diferentes razones. (Koppelman, 2004).

Las principales razones de regulación y declaración del contenido de soya en un alimento, se hacen con fines de autenticidad y de protección a la salud de los consumidores. En términos de autenticidad, corresponde declarar la cantidad y tipo de proteínas que pueden emplearse en los alimentos, y que deben estar enunciados en la etiqueta del mismo. Mientras que, en términos de salud se hace necesario declarar el contenido de aquellos componentes que presenten propiedades alergénicas (Hargin, 1996; Koppelman, 2004).

Adulteración con Soya

La adulteración de los alimentos se ha realizado, a través del tiempo con diferentes fines, entre ellos, abaratar costos de materias primas, incrementar el rendimiento en la producción industrial y enmascarar malas prácticas del proceso (Cordella *et al.*, 2002). A pesar de existir otras razones para adulterar alimentos, la mayoría de éstas siguen los mismos fines, los cuales generan

beneficios económicos para los industrializadores en una franca competencia desleal hacia el sector productivo primario, además de constituirse en un fraude hacia los consumidores (Dennis, 1998).

La utilización de soya en alimentos no constituye un tema novedoso, como tampoco se espera que dicha utilización caiga en desuso en un futuro cercano. Sin embargo, los tipos de aditivos de soya y las cantidades de éstos deben ser regulados, atendiendo a las normas establecidas por las diferentes legislaciones (Rittenburg *et al.*, 1987).

Estudios realizados para detectar adulteraciones con soya han sido documentados para la industria cárnica (Rittenburg *et al.*, 1987; Berkowitz y Weibert, 1987; González-Córdova *et al.*, 1998). La mayoría de estas adulteraciones se hace con el fin de sustituir proteínas de origen animal por proteínas vegetales, las cuales tienen un menor costo. Otra finalidad es la de emplear sustitutos o productos tipo carne basados en soya; ya que estos pueden expandir la forma de un producto cárnico o adoptar su forma de presentación (González-Córdova *et al.*, 1998). Estas acciones constituyen un fraude al consumidor ya que estos esperan consumir un producto con alta calidad (Lumley, 1996).

A finales de 1995 en Alemania, surgió una ley que prohibió la utilización de proteínas vegetales en productos cárnicos. Desde entonces, su uso requiere ser enunciado en el etiquetado de los alimentos, siendo ésta una manera de proteger a los consumidores de fraudes y alergias de tipo alimentario (Mellenthin y Galensa, 1999). Si bien la utilización de soya como aditivo o como adulterante han sido comunes para la industria cárnica, y la de los productos lácteos; los productos marinos no han quedado exentos de éstas (López-Tapia *et al.*, 1999; PROFECO, 2005).

Recientemente un reporte a nivel nacional de la PROFECO evidenció la presencia de marcas comerciales de atún enlatado, comercializadas en el

territorio nacional, que contienen soya sin ser declarado, lo cual representa un engaño a los consumidores, quienes esperan obtener un producto 100 % atún y no una mezcla de atún con soya (PROFECO, 2005).

Moléculas Utilizadas para Detectar Soya

La soya es una planta herbácea semejante al frijol. Debido a su alto contenido proteico, esta se ha destinado a la producción de alimentos para consumo humano y animales.

Los compuestos utilizados para su detección en los alimentos son las proteínas. Sin embargo, en alimentos procesados térmicamente, su extracción así como su detección puede ser complicada y errónea. Algunos de esos problemas pueden ser resueltos si la detección se hace a nivel del DNA, ya que esta molécula es mas estable al calor (Meyer y Candirán, 1996).

Clasificación de proteínas de soya

Las proteínas de la soya se clasifica en 3 principales grupos: proteínas envoltentes del metabolismo, proteínas estructurales (ribosomales, cromosomales y proteínas de membrana) y por último proteínas de almacenamiento, las cuales representan del 80-90 % del total de la proteína (Koppelman *et al.*, 2004).

Gen β -conglícinina

La β -conglícinina es el mayor componente en las proteínas de almacenamiento en la soya. Esta es una proteína compuesta de 3 subunidades α , α' , β . Estas sub-unidades ocupan arriba del 30 % total de la proteína de soya, y junto con otras proteínas de almacenamiento como la glicina, inhibidores de

triptófano ocupan arriba del 85 % total de ésta. Es por eso que su mayoría son muy utilizadas para la detección de soya. (Yoshino *et al.*, 2001; Koppelman *et al.*, 2004).

Debido a que la β -conglucina es una proteína altamente representativa de soya, se han utilizado los genes constitutivos de esta para su detección, es decir que se han diseñado secuencias de primers para la detección de sus diferentes sub-unidades en productos que contengan soya (genes) (Magaña-Gómez *et al.*, 2003).

Gen Lectina (Le1)

La lectina es una proteína minoritaria que se encuentra en la soya, sin embargo el gen constitutivo de lectina, y el diseño de primers (GMO3 y GMO4) para este gen, es el que ha adoptado por la mayoría de las metodologías para detectar productos con soya convencional y transgénica (Official Collection of Test Methods, 1998; Greiner *et al.*, 2005; Querci *et al.*, 2006).

Métodos para la Detección de Soya

El uso y desarrollo de nuevas técnicas analíticas en la ciencia de los alimentos, crece paralelamente con el incremento de consumidores preocupados acerca de lo que hay en los alimentos y por la seguridad de lo que comen. Consecuentemente, se han requerido procedimientos analíticos más rápidos, sensibles y eficientes.

Las técnicas analíticas desarrolladas para este fin, deben resolver un número importante de problemas, como es el dar información acerca del procesamiento, control de calidad y tratar de asegurar la conformidad con las normas de comercialización, adulteración, contaminación y composición

química de los alimentos (Lumley, 1996; Ibañez y Cifuentes, 2001). Las metodologías empleadas para la detección de soya en los alimentos, son tratadas a continuación.

Ensayo inmunológico ligado a enzima

Sin duda alguna el inmunoensayo ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en idioma inglés), ha sido una poderosa herramienta analítica para detectar la presencia de soya en los alimentos (Hitchcock *et al.*, 1981; Koppelman, 2004). El principio del ELISA esta basado en las reacciones antígeno-anticuerpo, por lo cual posee una alta especificidad (Hargin, 1996).

Hitchcock *et al.* (1981), realizaron un procedimiento por ELISA basado en la aplicación de anticuerpos nativos y desnaturalizados para proteínas de soya. Las proteínas de soya fueron solubilizadas usando urea y mecaptopetanol, las mezclas fueron dializadas lo que les permitió renaturalizar las proteínas empleadas para inmunizar conejos para producir anticuerpos. El ensayo respondió a diferentes productos de soya comercial, sin embargo la disponibilidad de anticuerpos utilizados en el estudio es limitada o casi nula comercialmente hablando.

Basados en la metodología realizada por Hitchcock *et al.* (1981), la AOAC (1990) ha adoptado al ELISA, como el método oficial para determinar soya en productos cárnicos crudos y térmicamente procesados, sin embargo diversos autores lo han clasificado como un método semi-cuantitativo y con ciertas limitantes.

Recientemente, Koppelman *et al.* (2004), utilizaron distintos métodos de extracción de proteína de soya, y aplicando ELISA pudieron cuantificar diferentes ingredientes a base de soya que se utilizan en los alimentos. El límite de detección de esta metodología fue de 0,4 ppm y su límite de cuantificación

de 1 ppm, lo cual tiene grandes ventajas sobre otros métodos que han sido reportados, anteriormente.

La técnica de ELISA ha sido aplicada en una gran variedad de alimentos térmicamente procesados, no obstante la obtención de anticuerpos y el proceso de extracción de la proteína de soya en la muestra, son procesos limitantes, que repercuten en la sensibilidad y repetibilidad de la determinación, sin dejar de lado que la obtención de anticuerpos específicos para los diferentes alimentos, no siempre están disponibles en el mercado (Koppelman, 2004).

Cromatográficos

Existen varios métodos cromatográficos para autenticar alimentos y detectar proteína de soya. En la actualidad el análisis instrumental se ha enfocado a 2 tipos de metodologías principalmente, la cromatografía de gases (GC, por sus siglas en idioma inglés) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en idioma inglés).

HPLC. La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación que utiliza un líquido como fase móvil (FM) para acarrear la muestra a través de una columna empacada con un material inerte llamada fase estacionaria (FE). Los compuestos de la muestra son separados en función de sus diferentes interacciones con la FM y la FE, es decir de acuerdo a su polaridad o afinidad por alguna de estas fases (Ibañez y Cifuentes, 2001).

La presencia de polifenoles en la soya, ha sido ampliamente estudiada para la detección de isoflavonas, empleando la técnica de HPLC (Mellenthin y Galensa, 1999; Heimler *et al.*, 2004; Benlhabib *et al.*, 2004; Umphress *et al.*, 2005). Mellenthin y Galensa (1999) extrajeron polifenoles de soya en productos cárnicos y analizaron sus fracciones con HPLC. Las agliconas, genistinas y daidzinas que corresponden a glucósidos, fueron los indicadores para detectar la adición de soya.

Umphress *et al.* (2005), realizaron un estudio para cuantificar isoflavonas en alimentos que contenían aditivos de soya. Estos autores utilizaron HPLC para separar compuestos que posteriormente pudieran ser cuantificados, reportando los resultados de su estudio como un monitoreo de productos que contenían soya, como un ingrediente alimentario.

La HPLC es una herramienta muy útil para detectar proteína de soya, sin embargo en muestras procesadas térmicamente, la extracción de proteínas analizadas por esta técnica se complica, debido a los diferentes cambios conformacionales que sufren las proteínas por el procesamiento térmico. Por otro lado, el uso de esta metodología conlleva el problema generado por el manejo de solventes contaminantes y nocivos para la salud, así como el incremento de algunos costos por el alto volumen de solvente de alta pureza empleado en HPLC (Castagnino, 2000).

GC. La cromatografía de gases es utilizada para analizar compuestos volátiles (alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas), aditivos, pesticidas y compuestos responsables del sabor y aroma de distintos alimentos. Su principio se basa en la separación de los compuestos volátiles, utilizando gases inertes como acarreadores (Hitchcock *et al.*, 1981).

Debido a que GC se enfoca principalmente en el análisis de compuestos volátiles de bajo peso molecular, no se tiene una alta participación en la detección de algunos aditivos de soya. La aplicación de GC ha sido mayoritariamente empleada en subproductos de la soya (salsa de soya) o fórmulas infantiles lácteas, entre otros. Donde los compuestos detectados son, isoflavonas, conocidas también como fitoestrógenos (Han-Wen y Ding, 2004; Wanakhachornkrai y Lertsiri, 2003).

Han-Wen y Ding (2004), con fines de detectar adulteraciones en fórmulas lácteas infantiles, cuantificaron concentraciones de isoflavonas empleando GC

acoplada a espectrometría de masas (MS, por sus siglas en idioma inglés). Los rangos de concentración encontrados para daidzeína y genisteína en las fórmulas infantiles fueron de 20 a 2050 ng/g y de 21 a 6510 ng/g respectivamente, y en fórmulas lácteas basadas en soya fue de 6510 ng/g para genisteína.

El límite de cuantificación de esta técnica, para el análisis de muestras fue de 10 ng/g para daizina y genisteína. La GC presenta un gran potencial analítico, sin embargo los procesos de extracción de volátiles en muestras y el acondicionamiento de columnas, podrían ser considerados inconvenientes en la detección de ciertos productos derivados de soya.

Técnicas de biología molecular

El análisis de los ácidos nucleicos (DNA y RNA, por sus siglas en idioma inglés) en el campo de la tecnología de alimentos ha venido a ayudar a resolver muchos de los inconvenientes que presentan ciertas técnicas analíticas. Las técnicas de biología molecular utilizadas en el campo de los alimentos, se basan principalmente en la información del DNA (Meyer y Candrian, 1996; Dennis, 1998), molécula relativamente estable y de secuencia única para cada alimento, por lo que su secuenciación total o parcial, ayuda a determinar la autenticidad de los mismos (Lumley, 1996).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es una técnica que permite tanto la detección mínima de ácidos nucleicos como la determinación de su secuencia vía amplificación del DNA de cadenas individuales. Para realizar esto último, la PCR imita los pasos naturales requeridos para amplificar secuencias específicas de DNA. Esto consiste en una desnaturalización para obtener una cadena sencilla de DNA, donde el iniciador es selectivo para una región de interés y finalmente una amplificación, donde la DNA polimerasa

síntetiza una nueva cadena usando nucleótidos que son adicionados a la reacción (Ibañez y Cifuentes, 2001; Mas *et al.*, 2001).

Una aplicación de gran importancia en la actualidad de la PCR en el campo de la tecnología de los alimentos, es la diferenciación de alimentos e ingredientes convencionales, de productos genéticamente modificados (Melletín y Galensa, 1999; Lau *et al.*, 2004; Rott *et al.*, 2004; Greiner *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2005).

Magaña-Gómez *et al.* (2003), utilizaron 3 métodos diferentes de extracción para DNA genómico y aplicando PCR en productos con proteína de soya e ingredientes alimentarios, identificaron la presencia de soya transgénica. Para la detección de muestras transgénicas, identificaron el fragmento promotor 35s caMV. El método fue efectivo para identificar alimentos e ingredientes con soya transgénica, sin embargo este método no pudo detectar la presencia del promotor (35s caMV), ni la presencia del gen constitutivo de la β -conglucina en una muestra de galleta que contenía 1.6 % de soya.

Greiner *et al.* (2005), realizaron PCR cualitativa y cuantitativa, para monitorear alimentos genéticamente modificados (GM, por sus siglas en idioma inglés) de maíz y soya. La cuantificación fue llevada a cabo por diferentes kits comerciales (TAQMAN™). De un total de 200 alimentos comerciales analizados en Brasil, entre los años 2000 y 2001, los autores encontraron 17 alimentos con altos porcentajes de maíz transgénico y 34 con soya genéticamente modificada, sin que éstos lo declararan en su etiquetado.

La PCR convencional es una técnica versátil para detectar soya, sin embargo es común que se detecten falsos negativos, debido al empleo de sistemas pocos sensibles para la visualización de los productos PCR (electroforesis convencional en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio), y debido a esta serie de pasos adicionales, la PCR se convierte en una técnica semilaboriosa. Por lo anterior, la PCR a tenido que ser acoplada a otras

metodologías para la visualización de sus productos y con esto potencializar y validar los resultados obtenidos (García-Cañas *et al.*, 2004).

Microarreglos. Los microarreglos de DNA son una nueva herramienta de la biología molecular y las ciencias genómicas. Posiblemente sea una de las aplicaciones más importantes para la información obtenida de la secuenciación sistemática de los genomas completos. Su participación en el campo de los alimentos ha sobresalido por ser una metodología rápida para detectar GM principalmente en maíz y soya (Germini *et al.*, 2004).

Germini *et al.* (2004), utilizando la tecnología de microarreglos y ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por sus siglas en idioma inglés), las cuales son moléculas análogas a los oligonucleótidos, pero más específicas para unirse al DNA, pudieron analizar muestras de soya transgénica (Roundup Ready[®]) en alimentos. El método resultó eficiente para detectar muestras transgénicas de soya certificada, sin embargo el método desarrollado no fue posible aplicarlo para otro tipo de GM. Actualmente no existe ningún protocolo por medio de microarreglos que proporcione la sensibilidad suficiente para detectar diferentes variedades de GM simultáneamente (Kok *et al.*, 2002)

Electroforesis capilar

En los últimos años la electroforesis capilar (CE, por sus siglas en idioma inglés) ha mostrado ser una técnica analítica que reúne características notables como son rapidez, precisión y automatización (López-Tapia *et al.*, 1999; Castagnino, 2000; Ibañez y Cifuentes, 2001). Su gran versatilidad derivada de las distintas modalidades bajo las que puede operar, le permite analizar una amplia gama de moléculas, desde proteínas, péptidos, DNA, aminoácidos, ácidos orgánicos y aditivos, entre muchos otros.

El proceso de separación de la CE funciona en base a los mecanismos tradicionales electroforéticos (Relación: masa-carga), donde las moléculas son

separadas por las fuerzas del campo eléctrico que ha sido aplicado. A diferencia de la electroforesis convencional la separación sucede en un ámbito capilar (Castagnino, 2000).

En el estudio realizado por Mellenthin y Galensa (1999), utilizaron la CE como una herramienta de apoyo para separar polifenoles de la soya, donde el proceso de separación de estos compuestos fue comparado con el de HPLC. Aunque, cuestionablemente, se reportó una baja reproducibilidad para los compuestos analizados por CE, el tiempo de análisis resultó ser más corto que el empleado por HPLC para el mismo fin.

López-Tapia *et al.* (1999), evaluaron dos kits comerciales de dodecil sulfato de sodio (SDS por sus siglas en idioma inglés) utilizados en la CE, para determinar adiciones de soya a leches en polvo. El método pudo separar subunidades básicas de glicinina y subunidades de α y α' de β -conglucina. El límite de detección fue del 10 % del peso total de la proteína, y los hidrolizados de proteína de soya no pudieron ser detectados por medio de la utilización del kit comercial SDS-CE.

Sin duda alguna existen una gran variedad de métodos analíticos para la detección y cuantificación de soya en alimentos térmicamente procesados, sin embargo la mayoría de estos métodos se han enfocado a productos cárnicos y lácteos principalmente. Estos métodos aunque han generado un avance substancial para abordar la problemática de la adulteración de alimentos, no ha sido extensiva su utilidad a otro tipo de alimentos. En una revisión exhaustiva de la literatura científica disponible, no se encontraron métodos analíticos reportados para detectar soya en atún enlatado, es por esto que el objetivo general del presente trabajo de investigación, fue desarrollar e implementar un método analítico para el análisis de productos PCR por electroforesis capilar, para detectar la presencia de soya añadida de manera fraudulenta en atún térmicamente procesado.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la mayoría de los métodos de detección de soya se han enfocado al análisis de productos cárnicos y lácteos principalmente, existe la necesidad de implementar metodologías que evidencien adulteraciones con soya en productos marinos, como es el caso del atún enlatado. Lo anterior con el fin de contribuir con el desarrollo de nuevos métodos analíticos que coadyuven a las agencias reguladoras y laboratorios de control a realizar su labor en la verificación de la calidad y autenticidad de los alimentos.

HIPÓTESIS

El análisis de productos PCR por electroforesis capilar permite detectar niveles mínimos del 1 % de soya en atún enlatado.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar una metodología para detectar soya en atún procesado térmicamente por medio de la amplificación de genes constitutivos y el análisis de los patrones de productos PCR por electroforesis capilar.

Objetivos Específicos

- Estandarizar la técnica de extracción de DNA geonómico (DNAg) de soya en muestras de soya y atún procesado térmicamente.
- Optimizar las condiciones de PCR para amplificar las regiones de los genes constitutivos β -conglucina y lectina (Le1) del DNAg de soya.
- Estandarizar la técnica de electroforesis capilar en gel para separar y detectar los productos PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Muestras

Las muestras de atún enlatado fueron obtenidas en mercados locales y de diferentes estados de la República Mexicana, las muestras de atún fresco fueron proporcionadas por la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Las muestras de soya, texturizado y aislado (Supro 500E), fueron proporcionados por Nutrimientos y Complementos Alimenticios S.A. de C.V. (NUTRICASA).

Reactivos

Los reactivos químicos utilizados como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), etanol, dodecil sulfato de sodio (SDS), fueron de Sigma (St. Louis, MO) y el clorohidrato de Tris (Tris-HCl) se obtuvo de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). El hidroximetil aminoetano (Tris) fue de Bio-Rad (Hércules, CA) y el 2-hidroxietilcelulosa, M_v 90,000 (HEC), poli-vinil alcohol, M_v 50,000 (PVA), marcador Sigma 100 pb de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido fosfórico (H_3PO_4) de Sigma (St. Louis, MO). Marcadores de peso molecular (PM) low DNA mass ladder y 1 Kb DNA extension ladder, y el fluoróforo YOPRO[®] fueron de Invitrogen Lab (CA, USA). El estándar de fragmentos de restricción de λ X-174 RF con enzima Hae III (72-1353 pb), LIFFluor[™] Enhance y el kit electroforético eCAP dsDNA 1000[™] de Beckman Coulter Inc (Fullerton, CA).

Análisis de Muestras y Mezclas de Atún con Soya

Se analizaron muestras comerciales de atún enlatado. Para la detección de diferentes niveles adicionados de soya, se realizaron mezclas de músculo de atún (*Thunnus albacares*) con texturizado de soya al 1, 5, 10, 25, y 100 % respectivamente. Una vez realizada las mezclas, se tomaron 120 g de cada una de ellas y se les adicionados 20 mL de agua (atún en agua) y aceite de maíz (atún en aceite) en proporciones separadas, para someterlas a un proceso térmico, simulando las condiciones de enlatado del atún (PROFECO, 2006), el cual consistió en someter a las mezclas de atún con soya a 120 °C durante 20 minutos a 1.1 Kg/cm² (unidades de presión). Posteriormente a este proceso, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Extracción de DNAG de Soya

Las muestras comerciales y a las elaboradas en el laboratorio, se les realizo extracción de DNAG y fueron analizadas por PCR para la detección de soya.

La extracción de DNAG de soya en productos de soya fue realizada en base al protocolo del kit de comercial GENCLEAN[®] (Qbiogene, Pasadena, CA) con modificaciones. Donde a 100 mg de muestra, se le adicionaron 600 µL de mezcla de lisis (EDTA 0.1 M pH 8, Tris 0.45 M, pH 8, NaCl 0.1 M, SDS 1 %) homogeneizándolas con Ultra-Turrax (IKA[®], Staufen, GR). Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos. Del sobrenadante obtenido, se tomaron 100 µL los cuales fueron adicionados a 300 µL de matriz de afinidad (Gene Clean Spin Glassmilk) en un microtubo nuevo.

Las mezclas se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente y fueron agitadas por inversión ocasionalmente, una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron a 10,000 rpm donde el sobrenadante fue decantado y el microtubo fue lavado con 150 μ L de solución de lavado (etanol 50 % / solución salina fisiológica como disolvente), las cuales fueron de nuevo centrifugadas a 10,000 rpm a 20 °C, este paso (lavado) fue repetido 3 veces. Posterior al tercer lavado, se evaporó el líquido residual durante 10 minutos en centrivap (Labconco, CA, USA), resuspendiendo el pellet (DNA) en 50 μ L de agua estéril (PCR), el cual se centrifugó a 6500 rpm durante 2 minutos, extrayendo el agua del sobrenadante (donde está el DNA), a un tubo nuevo para ser almacenándolo en congelación (-20 °C).

El DNAg en mezclas de atún con soya procesadas térmicamente como en muestras comerciales, fue extraído bajo el mismo procedimiento descrito anteriormente, con la diferencia de que las muestras fueron incubadas durante 1 h a 60 °C con 20 μ L de Proteinasa K (20 mg/mL) después de la homogenización con la solución de lisis el volumen de la matriz de afinidad (Gene Clean Spin Glassmilk) fue de 400 μ L.

La concentración del DNAg en muestras de soya se evaluó por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro Cary BIO 50 (VARIAN, Palo Alto, CA) a una longitud de onda de $A_{260\text{nm}}$ y la pureza por la relación de absorbancia de $A_{260/280}$ nm.

El DNAg de las mezclas de atún con soya, fue cuantificado utilizando el kit comercial Quant-IT™ DNA Assay Kit, Broad Range (Invitrogen, USA).

Secuencia de "Primers" o Cebadores

Las secuencias de primers que se utilizaron para detectar soya fueron de los genes constitutivos " β -conglucina subunidad α " (amplicon 202 pb), y lectina (Le1) (amplicon 118 pb) reportadas por Magaña-Gómez *et al.* (2003) y por la Official Collection of Test Methods (1998), respectivamente. La identificación de la especie de atún (*Thunnus albacares*) se realizó por las secuencias de los primers del gen citocromo b mitocondrial (amplicon 350 pb) reportados por Quinteiro *et al.* (1998), los diferentes juegos de primers fueron sintetizados por la casa comercial Invitrogen Lab (CA, USA). La secuencia y número de acceso al GenBank son mostrados en la **Tabla 1**.

Amplificación del DNAg por PCR

La amplificación del DNAg por PCR para los genes constitutivos de soya y del citocromo b mitocondrial fue realizada en reacciones del kit comercial puReTaq ready-To-Go PCR de acuerdo a las especificaciones del proveedor, donde a cada reacción fueron adicionados 50 ng de DNA molde (1 μ L) y 0.5 mM de cada iniciador (primers). Los ciclos de amplificación se realizaron en un Termociclador Eppendorf^{MR} (San Diego, CA) y fueron programados de acuerdo a lo descrito en la **Tabla 2**.

Para todos los análisis de PCR se incluyeron controles negativos para confirmar la especificidad de la amplificación y descartar posibles contaminaciones, es decir, PCR sin templado (H₂O) y PCR con DNA inespecífico. Posteriormente se tomaron de 1.5 a 2.5 μ L de los productos PCR de las muestras, para ser depositados en viales para su posterior análisis por electroforesis capilar.

Tabla 1. Primers para detectar productos de soya y atún (*Thunnus albacares*)

(Primers)	Secuencia	Gen	Acceso GenBank
Congli (forward)	5'-GATTGAAACTTGAAGGTTCCG-3'	β -conglucina	AB051865
Congli (Reverse)	5'-CCCTCAAAATTGAAGACAAAGG-3'	Subunidad α	
GMO3 (forward)	5'-GCCCTCTACTCCACCCCATCC-3'	β -conglucina	AB051865
GMO3 (Reverse)	5'-GCCCACTGCAAGCCTTTTGTG-3'	Subunidad α	
CytBL (forward)	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	Lectina (Le1)	K00821
CytBH (Reverse)	5'-CCCCTCAGAAATGATATTTGTCCTCA-3'	Lectina (Le1)	K00821
		Citocromo b mt	AB101291

Magaña-Gómez et al., 2003; Official Collection of Test Methods, 1998 y Quinteiro et al., 1998.

Tabla 2. Parámetros de amplificación del DNAg problema

Parámetros	Gen:		Gen:		Gen:	
	¹ β-conglicinina subunidad α		² Gen lectina (Le1)		³ Citocromo b mt	
Desnaturalización inicial	95 °C	2 min	95 °C	3 min		
Desnaturalización	95 °C	45 seg	95 °C	30 seg	92 °C	45 seg
Alineación	60 °C	60 seg	63 °C	30 seg	50 °C	60 seg
Extensión	72 °C	60 seg	72 °C	30 seg	72 °C	60 seg
Numero de ciclos	40		40		30	
Extensión final	72 °C	5 min	72 °C	3 min		

¹Magaña-Gómez *et al.*, 2003; ²Official Collection of Test Methods, 1998 y ³Quinteiro *et al.*, 1998.

Determinación de los Productos PCR por Electroforesis

Los productos de PCR del músculo de atún crudo, mezclas de atún con soya procesadas térmicamente, y los productos de soyas, fueron separados por electroforesis convencional en gel de agarosa y por electroforesis capilar.

Electroforesis convencional en gel

La determinación de los productos PCR, por electroforesis convencional, se realizó en geles prefabricados (E-Gel Agarose[®]) al 1.2 % y 2 % de agarosa, en una cámara Power Base (Invitrogen, USA), las condiciones de separación fue la aplicación de 15 KV durante 15 minutos, de acuerdo al protocolo establecido por el proveedor, (Invitrogen, 2006). El marcador utilizado fue low DNA mass ladder y 1 Kb DNA extension ladder. Para almacenar las imágenes, se utilizó una cámara Kodak DC265 (Kodak, USA) y su digitalización por el software Adobe PhotoDeluxe (Adobe Systems Inc.).

Electroforesis capilar

La determinación del análisis, se realizó utilizando un equipo de electroforesis capilar PACE-MDQ System (Beckman Instruments, Fullerton, CA). La separación fue llevada en un capilar no recubierto (Beckman Coulter) con 38 cm de longitud total, 28 cm de longitud efectiva y 75 μm de diámetro interno. Las condiciones de separación fueron optimizadas y desarrolladas en base a dos protocolos. El primer protocolo fue tomado del kit electroforético eCAP dsDNA 1000[™] y el segundo de la metodología previamente reportada por Hernández-Chávez (2006) con modificaciones. Estas modificaciones consistieron en la utilización de la concentración de 2-hidroxietilcelulosa (HEC) al 3 % en el buffer de separación que contenía 20mM de Tris-HCl, 2.5 μM YOPRO[®], 10mM H_3PO_4 , EDTA 2 mM, a pH 7.3. El acondicionamiento del

capilar se realizó con 0.1 N de HCl por 10 minutos antes de iniciar la corrida de muestras, la secuencia de llenado del capilar entre inyecciones fue: 1 % PVA durante 2 minutos y buffer de separación durante 4 minutos todos aplicados a 30 psi. La temperatura y la corriente constante de separación fueron de 40 °C a 72 μ A con polaridad inversa.

La inyección de la muestra fue de 1.5 a 5 μ L durante 25 segundos a 0.5 PSI, el estándar Hae III, fue inyectado en una concentración de 250 μ g/mL, bajo el mismo tiempo y presión que la muestra. La detección fue por fluorescencia inducida por láser (LIF, por sus siglas en inglés) con una excitación a 488 nm y una emisión a 520 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción del DNA Genómico (DNAg) de Soya

Extracción de DNAg en productos de soya

Debido al tipo muestras utilizadas en el presente trabajo, las cuales son consideradas con alto contenido proteico y procesadas, se procedió a evaluar un método de extracción basado en la acción del detergente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), el cual fue reportado por Magaña-Gómez *et al.* (2003). Este detergente es recomendado para extraer DNA de vegetales (soya) o de muestras con alta concentración de polisacáridos y/o proteínas (Terry *et al.*, 2002), sin embargo, cuando este fue probado, no funcionó adecuadamente. Por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, fue imposible observar un patrón de bandeo, asimismo cuando el material genético se sometió a amplificación por PCR, el comportamiento encontrado fue similar al analizarlo por electroforesis en gel.

Por lo anterior, una matriz comercial (GENCLEAN[®] SPIN kit) tuvo que ser probada. Esta matriz esta diseñada para purificar fragmentos de DNAg de 500 a 300 000 pb, incluyendo sus posibles contaminantes. Su principio de separación está basado en la unión de grupos fosfato que contienen el DNA que se unen (covalente y iónicamente) a una matriz de sílice, permitiendo una mayor fijación del material genético (**Figura 1**) por lo que se obtiene un mayor rendimiento de extracción y eliminación de contaminantes, que en algunos métodos tradicionales en que se emplean solventes orgánicos (GENCLEAN[®], 2005).

El GENCLEAN[®] permitió la extracción de DNAg de productos de soya. La calidad del DNAg obtenida por la relación de absorbancia 260/280 para el

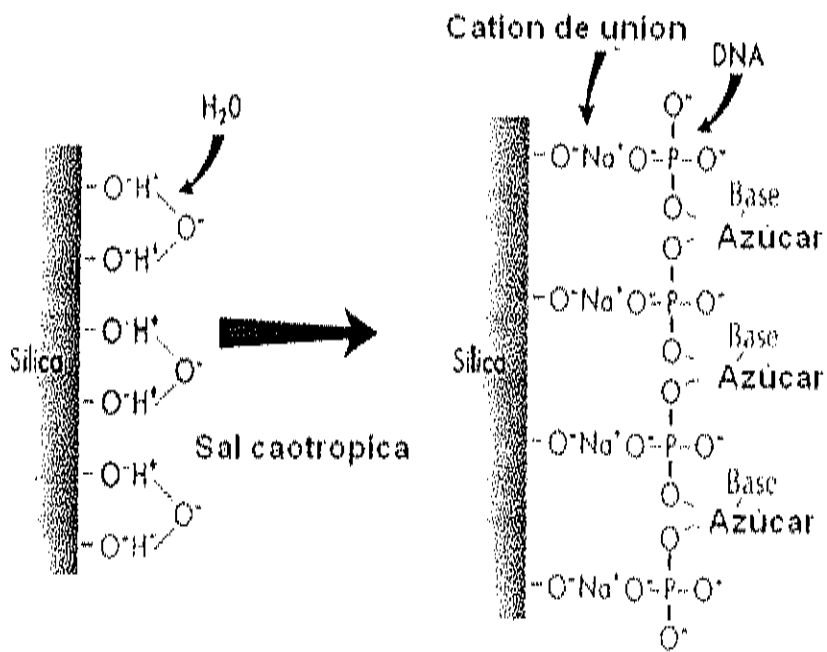


Figura 1. Principio de separación del DNA por una matriz de sílice (GENCLEAN[®], 2005)

aislado de soya fue de 1.92, mientras que para el texturizado fue de 1.88. La concentración obtenida para los productos de soya se encontró en un rango de 32.5 ng/ μ L-178.25 ng/ μ L, comprobando que la matriz comercial es apta para la extracción de DNAg en productos de soya, lo cual permitiría la amplificación de los genes constitutivos de soya.

Extracción de DNAg en mezclas de atún con soya

La utilización del protocolo comercial para analizar mezclas de soya térmicamente procesadas no permitió observar bandas del DNAg en las muestras y en algunos casos se observó pequeños barridos, quizá este comportamiento se debió en parte, al tratamiento térmico al que fueron sometidas las muestras, a su alto contenido proteico y/o posibles contaminantes en la muestra (Bauer *et al.*, 2005; Quinteiro *et al.*, 1998). Debido a que la extracción de DNAg integro y de buena calidad fue casi nula, fue imposible cuantificar y determinar la pureza del DNA por UV.

En base a lo anterior se procedió hacer modificaciones en el método de extracción estas consistieron en agregar proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL durante una hora a 60 °C, esto con la finalidad de degradar el alto contenido proteico en la muestra que pudiera interferir en la extracción de DNAg por la matriz comercial, debido a la alta cantidad de proteína en la muestra. Por último se adicionó 100 μ L de exceso de matriz comercial GENCLEAN[®], esto se realizó con el propósito de quitar posibles contaminantes y de esta forma hacer más eficientes el proceso de extracción en las muestras procesadas. Estas modificaciones con adición de proteinasa K y exceso de matriz permitieron la extracción del DNAg y su cuantificación como se menciona posteriormente.

Debido a la naturaleza de las muestras (baja cantidad de DNA extraído) para tratar de eliminar el error de cuantificación por UV y ser más exacto en la cuantificación de DNAg obtenidos, se procedió a cuantificarlas por fluorescencia con el propósito de poner cantidades más exactas en el PCR y asegurar una exitosa amplificación.

Los rangos de concentración de DNAg encontrados para los diferentes porcentajes de soya añadida fueron desde 0.5 y 70 ng/ μ L, y la curva estándar obtenida para las determinaciones presentó una $r = 0.99$, lo cual hace que la determinación por fluorescencia sea más exacta que el método de UV, esto puede ser explicado ya que el intercalante o fluoróforo añadido en la determinación se une directamente con las moléculas de doble cadena de DNAg emitiendo una señal a cierta longitud de onda, proporcionando cantidades más exactas de DNAg en la muestra (Ririe, *et al*, 1997).

Identificación de la Especie de Atún (*Thunnus albacares*)

Una vez establecido el método de extracción para DNAg en muestras de atún procesadas, se procedió a identificar a la especie como control positivo en las reacciones de PCR y con la finalidad de comprobar reacciones inespecíficas con DNA de soya en músculo de atún crudo y térmicamente procesado.

La **Figura 2** muestra la identificación de la especie *Thunnus albacares* donde se obtuvieron fragmentos de 350 pb del gen citocromo b mitocondrial y que corresponden a los reportados por Bartlett y Davison, (1991), por lo cual se puede concluir que los primer seleccionados en este estudio fueron altamente específicos para la especie de atún analizada. En esta misma figura también se

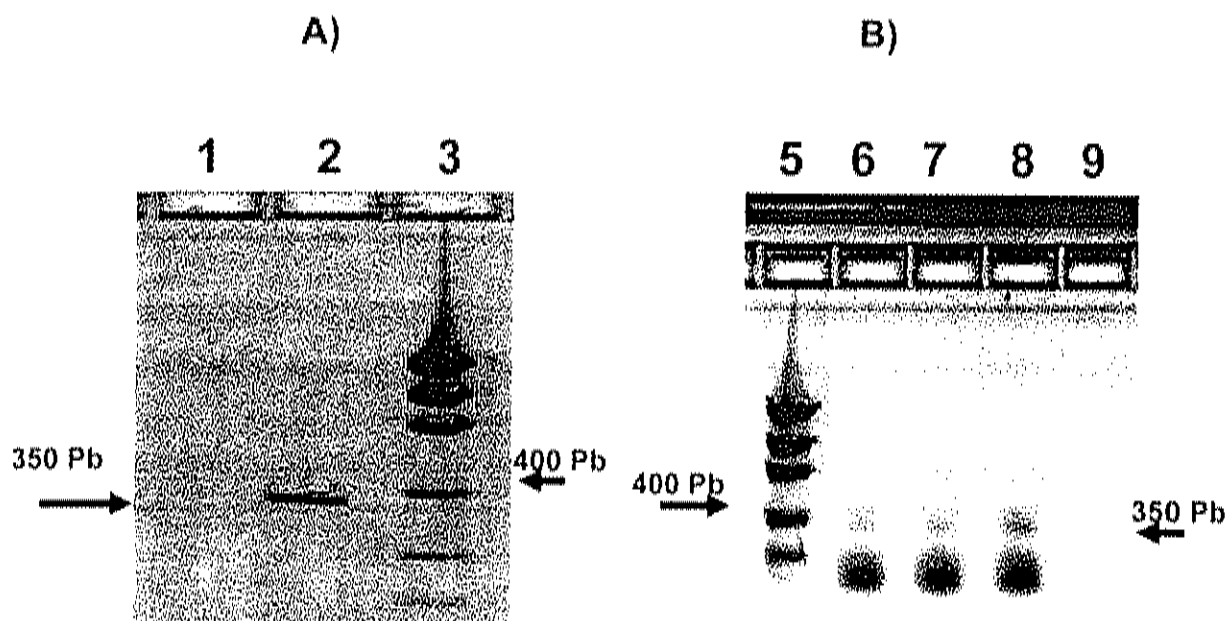


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*). **A)** músculo crudo de atún, carriles 1: DNA soya, 2: *Thunnus albacares*, 3: marcador low DNA mass ladder. **B)** músculo de atún térmicamente procesado, carriles: 5: marcador low DNA mass ladder, 6-8: *Thunnus albacares*, 9: DNA soya.

muestran las reacciones positivas para DNA de atún térmicamente procesado y la ausencia de banda para el DNA de soya por lo que los primers de atún no presentan reacciones inespecíficas con el DNA de soya. Cabe mencionar que aunque las bandas encontradas como control positivo para atún procesado fueron más tenues o débiles que para el atún crudo observadas en el gel de agarosa. Este comportamiento quizás se deba a los factores anteriores mencionados en cuanto a la degradación y a la complejidad de obtener grandes cantidades de DNA en muestras procesadas de atún y a la poca resolución que se obtiene por la electroforesis en gel cuando la muestra es procesada (Quinteiro *et al.*, 1998).

Amplificación de los Genes Constitutivos de Soya

Amplificación del gen β -conglucina subunidad α

La amplificación del gen β -conglucina subunidad α consistió en la obtención de amplicones de 202 pb en productos de soya como texturizado y aislado de soya (**Figura 3**) estos productos de PCR encontrados concordaron en el estudio de detección de un transgen en productos de soya el cual fue reportado por Magaña-Gómez *et al.*, (2003).

En base a que las bandas detectadas en geles de agarosa fueron lo suficientemente claras, se consideró que los primers seleccionados eran aptos para detectar soya en atún procesado térmicamente y en enlatado comercial. Para comprobar que los primer fueran específicos para soya, se evaluaron los primers de lectina (Le1) y del gen β -conglucina subunidad α con músculo de atún de aleta amarilla (**Figura 4**). Observándose que el juego de primers para los genes constitutivos de soya no presentó reacciones inespecíficas con el músculo crudo de atún de aleta amarilla.

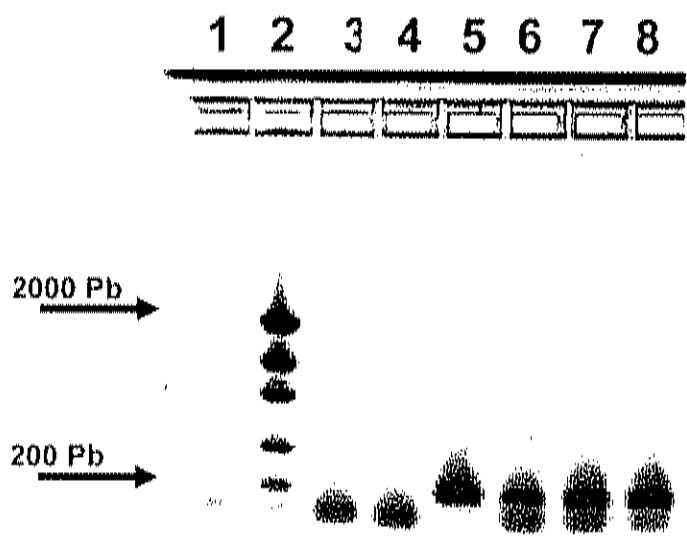


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR del gen β -conglucina sub α (202 pb). Carriles 1, 3, 4: controles negativos, 2: marcador de PM low DNA mass ladder, 5 y 8: Supro 500 E, 6 y 7: texturizado soya.

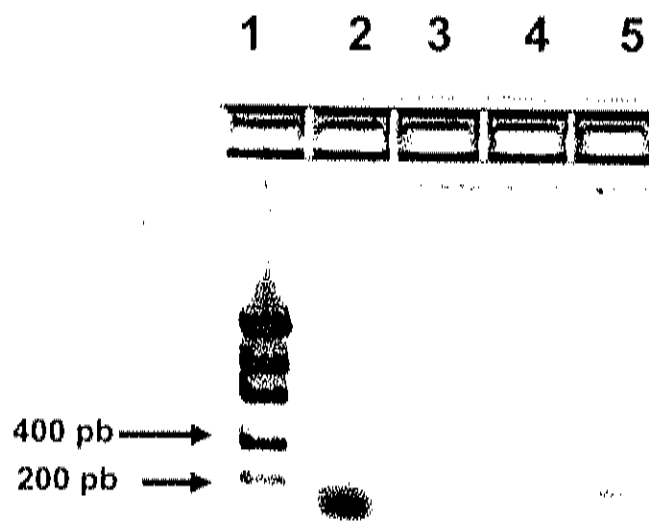


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % mostrando los productos de PCR de los primers β -conglucina subunidad α y Le1 en músculo de atún crudo. Carriles 1: marcador low DNA mass ladder, 2: agua, 3: músculo de atún (primers Le1), 4: músculo de atún (primers β -conglucina subunidad α), 5: control positivo (primers β -conglucina subunidad α),

Sin embargo al ser evaluado el gen de β -conglucina subunidad α con muestras de atún procesadas térmicamente tanto en agua como en aceite presentaron reacciones inespecíficas manifestándose en bandas por debajo de las 202 pb (**Figura 5**), se concluyó que estos fragmentos se habrían obtenido debido a la degradación del DNA por el procesamiento empleado en las muestras el cual fue mencionado con anterioridad, pero al observar el control negativo (100 % atún procesado) se descartó esa posibilidad ya que en este control no se observaron fragmentos menores a las 202 pb.

Esto quizá se deba a lo propuesto y mencionado por Yoshino (2001) que debido a que la estructura nucleotídica de la subunidad α no está completamente definida, el diseño de los primers seleccionados y empleados en este estudio pueda estar interactuando con las otras dos subunidades del gen β -conglucina (α' y β), resultando reacciones inespecíficas. Por lo tanto, los primers del gen β -conglucina subunidad α se consideraron no aptos para detectar soya en atún térmicamente procesado o en muestras enlatadas comerciales de atún.

Amplificación del gen de lectina (Le1)

La lectina es una proteína minoritaria que se encuentra en la soya, sin embargo el gen de lectina es el que ha adoptado por la mayoría de las metodologías para detectar soya convencional y transgénica (Greiner *et al.*, 2005; Querci *et al.* 2006).

La detección del gen de lectina (Le1) se observó al obtener fragmentos de amplificación en un tamaño de alrededor de 118 pb en productos de soya (**Figura 6**), estos fragmentos corresponden a los reportados por la Official Collection of Test Methods (1998) y a Querci *et al.* (2006). Para descartar posibles problemas de reacciones inespecíficas, como se presentaron para los primers del gen β -conglucina subunidad α , los primers del gen Le1 fueron



Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, mostrando la amplificación y reacciones inespecíficas del gen β -conglucina subunidad α en muestras de atún procesadas térmicamente. Carriles 1: marcador low DNA mass ladder, 2: agua, 3-6: atún en agua con 1, 5, 10 y 25 % de soya, respectivamente, 7-10: atún en aceite con 1, 5, 10 y 25 % de soya, respectivamente, 11: 100 % atún.

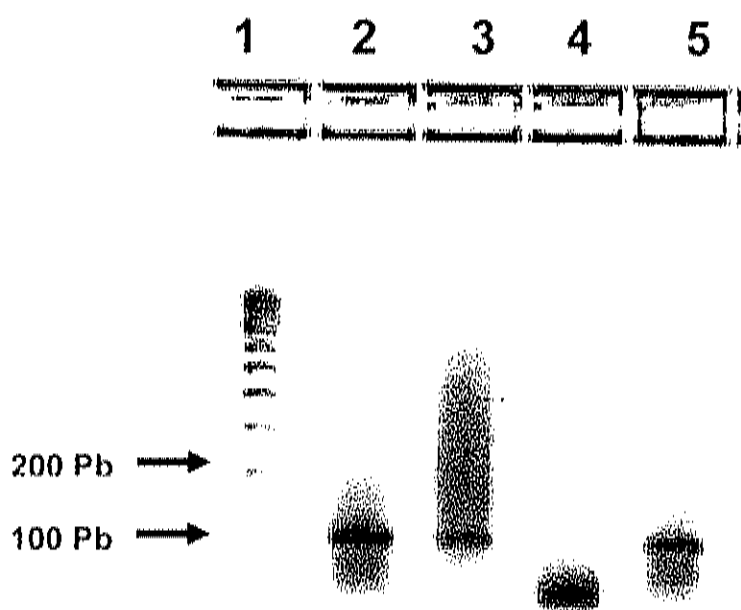


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, mostrando la amplificación del gen Le1 (118 pb). Carriles 1: marcador de PM: Sigma 100 pb, 2, 3, 5: DNA de productos de soya y 4: control negativo (sin DNA).

probados con muestras de atún crudo (**Figura 4**) y con mezclas de atún con soya térmicamente procesadas (**Figura 7**), observándose en ambas figuras la especificidad (amplificación) deseada en cada propósito, es decir en muestra de músculo de atún crudo amplificación negativa y en mezcla que contenían soya, amplificación del fragmento de interés sin reacciones inespecíficas.

Una vez que se obtuvo la amplificación del gen Le1 y se estableció que los primer Le1 son específicos productos de soya y mezclas de atún con soya, se procedió a realizar un monitoreo cualitativo en muestras comerciales de atún enlatado.

En el monitoreo cualitativo realizado para la detección del gen Le1 en muestras comerciales de atún enlatado, se realizó por PCR convencional en electroforesis en gel al 2 %, donde se encontraron 8 muestras positivas a la presencia de soya (**Figura 8**) estos resultados evidencian la adición de soya, el cual sin ser declarada en la etiqueta, representa prácticas de adulteración y un fraude a los consumidores, concordando y reafirmando el estudio realizado por la PROFECO en el año del 2005 en base a la presencia de soya en atunes enlatados.

Optimización y Desarrollo de un Método de (EC) para la Detección de Productos PCR

El análisis y discusión de resultados que se presentan en esta sección, se han enfocado a explicar los patrones electroforéticos que se obtuvieron para los marcadores de pesos moleculares low DNA mass ladder, fragmentos de restricción del ϕ X-174 RF con enzima Hae III (ϕ X-174 RF/ Hae III) y los

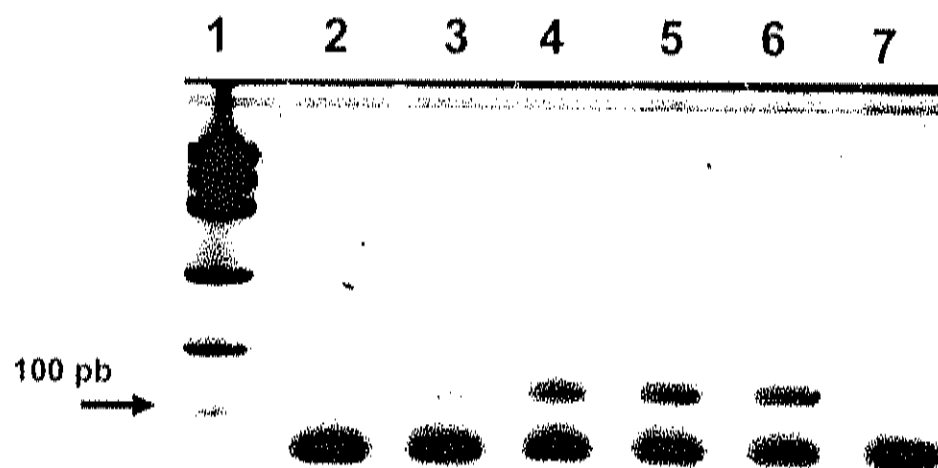


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, mostrando la amplificación de gen Le1 en muestras de atún con soya procesadas térmicamente. Carriles 1: marcador low DNA mass ladder, 2: control negativo (agua), 3: 1 % de soya adicionada, 4: 5 % soya adicionada, 5: 10 % soya adicionada, 6: 25 % soya adicionada, 7: 100 % atún.

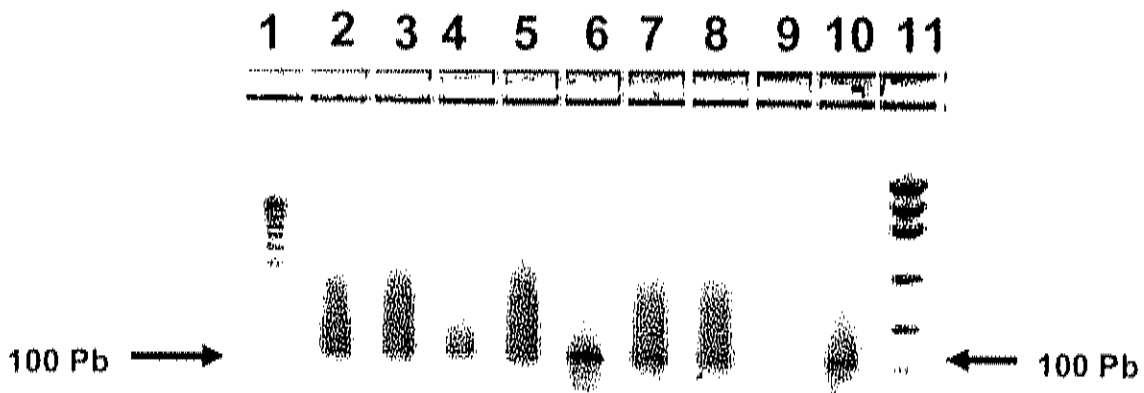


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, mostrando la detección de soya en atún enlatado mediante el gen Le1. Carriles 1: marcador de PM: Sigma 100 pb, 2-8,10: muestras comerciales de atún enlatado, 9: control negativo (sin DNA), 11: marcador de PM: low DNA mass ladder

productos de PCR analizados (texturizado de soya, mezclas de atún con soya y muestras comerciales). Por medio de la utilización del kit electroforetico eCAP dsDNA 1000™ y la metodología reportada Hernández-Chávez. (2006) con algunas modificaciones, las cuales fueron descritas anteriormente.

Utilización del Kit eCAP dsDNA 1000™

Con la finalidad de facilitar la implementación de la metodología de separación por EC, se opto por utilizar inicialmente un kit comercial bajo condiciones recomendadas por el proveedor.

Marcador de peso molecular ϕ X-174 RF/ Hae III

El marcador de pesos moleculares ϕ X-174 RF/ Hae III (72-1353 pb), obtenido bajo las condiciones del kit eCAP dsDNA 1000™ (Figura 9), muestra un patrón electroforético donde se observan claramente la eficiente separación de cada fragmento de DNA con un número de pares de bases conocidas (desde 72 a 1353 pb), lo cual concuerda con lo reportado por Ulfelder (1993). La zona de interés para este estudio fue para los fragmentos obtenidos desde las 72 pb a las 234 pb, donde los tiempos de migración fueron entre 12.5 y 17 minutos, mientras que el tiempo de migración total fue de 25 minutos. Si bien la utilización del kit comercial empleado, permitió una buena separación en base al de número de picos detectados en el marcador molecular, la señal de respuesta en unidades relativas de fluorescencia (RFU, por sus siglas en inglés) resultó baja (menor a 0.4 RFU) para el marcador molecular ϕ X-174 RF/ Hae III, lo cual podría tener efecto desfavorable en la detección, es decir con respecto a la sensibilidad del método para detectar soya.

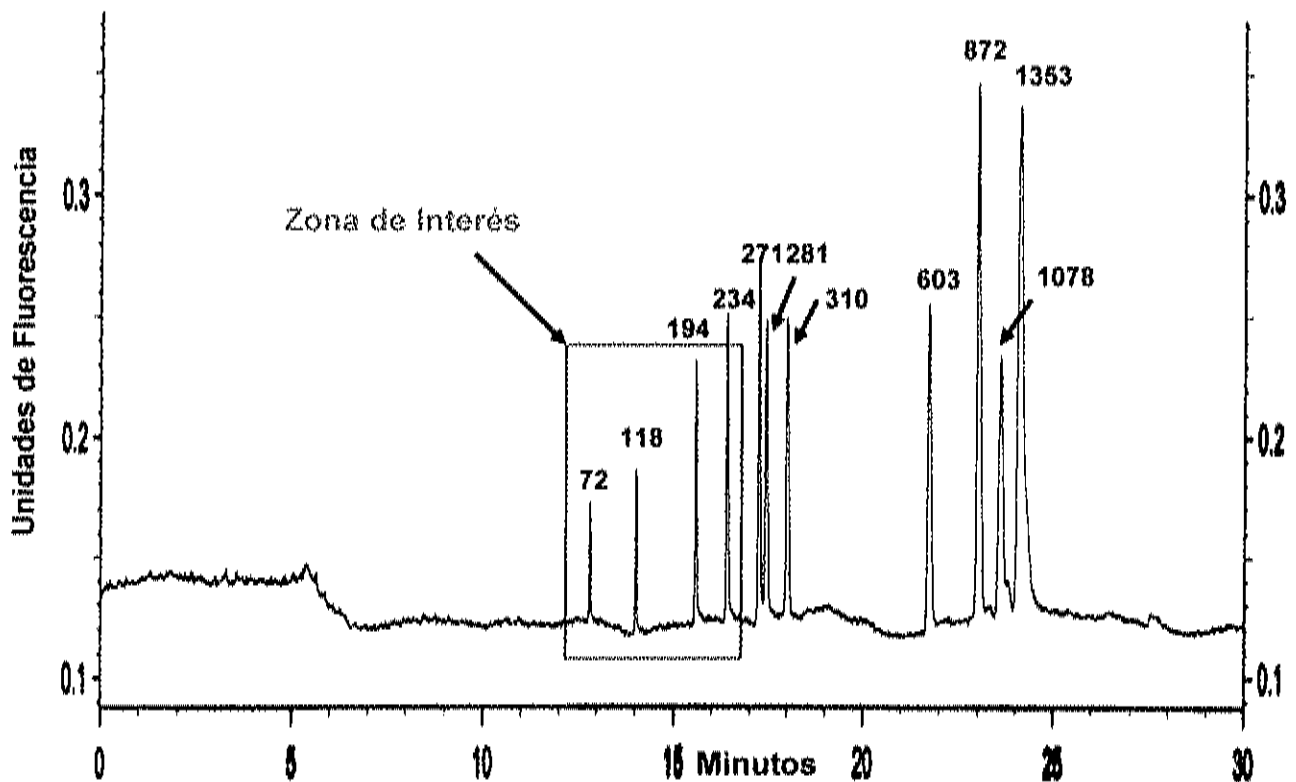


Figura 9. Electroferograma típico del marcador de pesos moleculares ϕ X-174 RF/ Hae III obtenido por el kit electroforético eCAP dsDNA 1000™. Inyección: 10 seg. Voltaje: 10 KV. Temperatura: 40 °C. Detección: LIF 488 nm (excitación), 520 nm (emisión). Capilar: Sin recubrir, 75 μ L DI, 50 cm longitud total, 40 cm longitud efectiva. Polaridad: Inversa.

Esto quizás se deba al tipo de fluoróforo utilizado (Enhance) y a la cantidad sugerida de su adición por el kit, ya que se ha visto que el Enhance no es de los fluoróforos con mayor eficiencia en la señal ni en la obtención de tiempo de migración cortos, cuando es comparado con el SYBR-Green o YOPRO® (García-Cañas *et al.*, 2002), no obstante sí dejar de mencionar que el buffer empleado por el kit comercial sufre una rápida degradación cuando este es resuspendido. Fenómeno que no puede ser explicado a una sola variable, ya que contiene diferentes polímeros patentados (geles) que en almacenamiento (4 °C) tiende a degradarse por efectos de pH y la misma actividad hidrolítica presentada en el buffer.

Tratando de eliminar efectos negativos de sensibilidad y eliminar la utilización de un kit comercial. Se procedió a la utilización de la metodología propuesta por Hernández-Chávez (2006), utilizando 2-hidroxietilcelulosa (HEC) al 2 % como polímero (Gel) en el buffer de separación.

Utilización de HEC al 2 %

El utilizar HEC al 2 % en los marcadores de PM, (ϕ X-174 RF/Hae III y low DNA mass ladder) solo permitió resultados muy similares a los obtenidos por el kit comercial, es decir una buena separación analítica, pero de manera similar se presentó una baja señal de respuesta (0.6 y 1.4 RFU) (**Figura 10**).

Esto quizás se deba al efecto de la concentración de HEC al 2 %, al fluoróforo empleado (Enhance) y a la longitud efectiva utilizada en el capilar (40 cm) considerada grande, la cual tiene un efecto en la interacción del polímero (viscosidad) con el fluoróforo, haciendo que posiblemente este disminuya su movilidad electroforética con el DNA en la muestra (distancia en el capilar), provocando una señal de respuesta baja (intensidad). (García-Cañas *et al.*, 2002), la cual puede confundirse con la misma degradación que sufre el HEC (señal ruido) en el buffer de corrida.

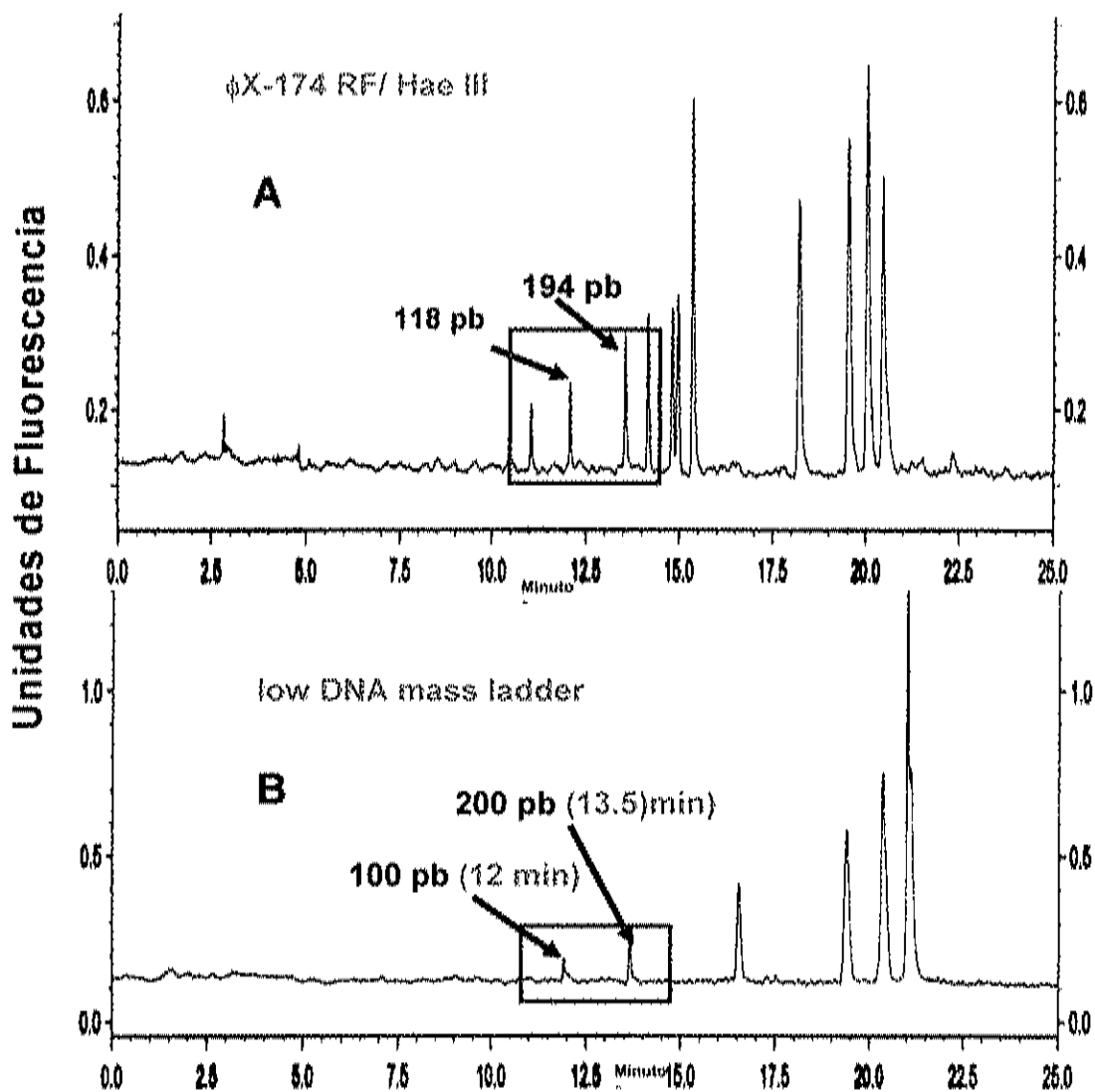


Figura 10. Electroferogramas típicos de marcadores moleculares. **A)** Estándar ϕ X-174 RF/ Hae III (72-1353 pb). **B)** Estándar low DNA mass ladder (100-2000pb). Buffer de corrida: 2-hidroxiethylcelulosa al 2 %, Tris-HCl 20 mM, H_3PO_4 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.3.Voltaje: 10 KV. Temperatura: 40 °C. Detección: LIF 488 nm (excitación), 520 nm (emisión). Inyección: 10 seg. Capilar: Sin recubrir, 75 μ L DI, 50 cm longitud total, 40 cm longitud efectiva. Polaridad: Inversa (escala variable por efecto de impresión).

En base a lo anterior se procedió a utilizar estrategias para aumentar la señal de respuesta, así como la obtención de una buena separación analítica. Algunas de estas estrategias (modificaciones) consistieron en el aumento en la concentración del polímero (HEC al 3%), la utilización de otro fluoróforo YOPRO[®], la utilización de corriente constante (72 μ A), mayor tiempo de inyección (25 seg) así como la disminución de la longitud efectiva en el capilar (28 cm).

Utilización de HEC al 3 %

El utilizar HEC al 3% con algunas otras estrategias (modificaciones) como se mencionó anteriormente, permitieron la obtención de patrones característicos para el estándar ϕ X-174 RF/ Hae III, low DNA mass ladder (**Figura 11**) y para productos PCR de muestras de soya, mezclas de atún con soya, muestras comerciales de atún, con la amplificación del gen β -conglucininina subunidad α y Le1.

En los patrones electroforéticos obtenidos para los marcadores de pesos moleculares (**Figura 11**) se observó un incremento de 20 veces mayor en la intensidad de señal (RFU) lo cual se considero una buena señal en términos de sensibilidad para el método analítico, comparada a la obtenida por Hernández-Chávez (2006) y a las consideradas por (García-Cañas *et al.*, 2002), es importante mencionar que algunos experimentos realizados en base a la concentración de YOPRO[®] añadido se lograron obtener señales hasta de 100 RFU para marcadores moleculares (**Figura 12**), pero debido a la poca resolución de los picos (definición) y efectos de reproducibilidad, se optó por quedarse con una señal entre 20 y 30 RFU.

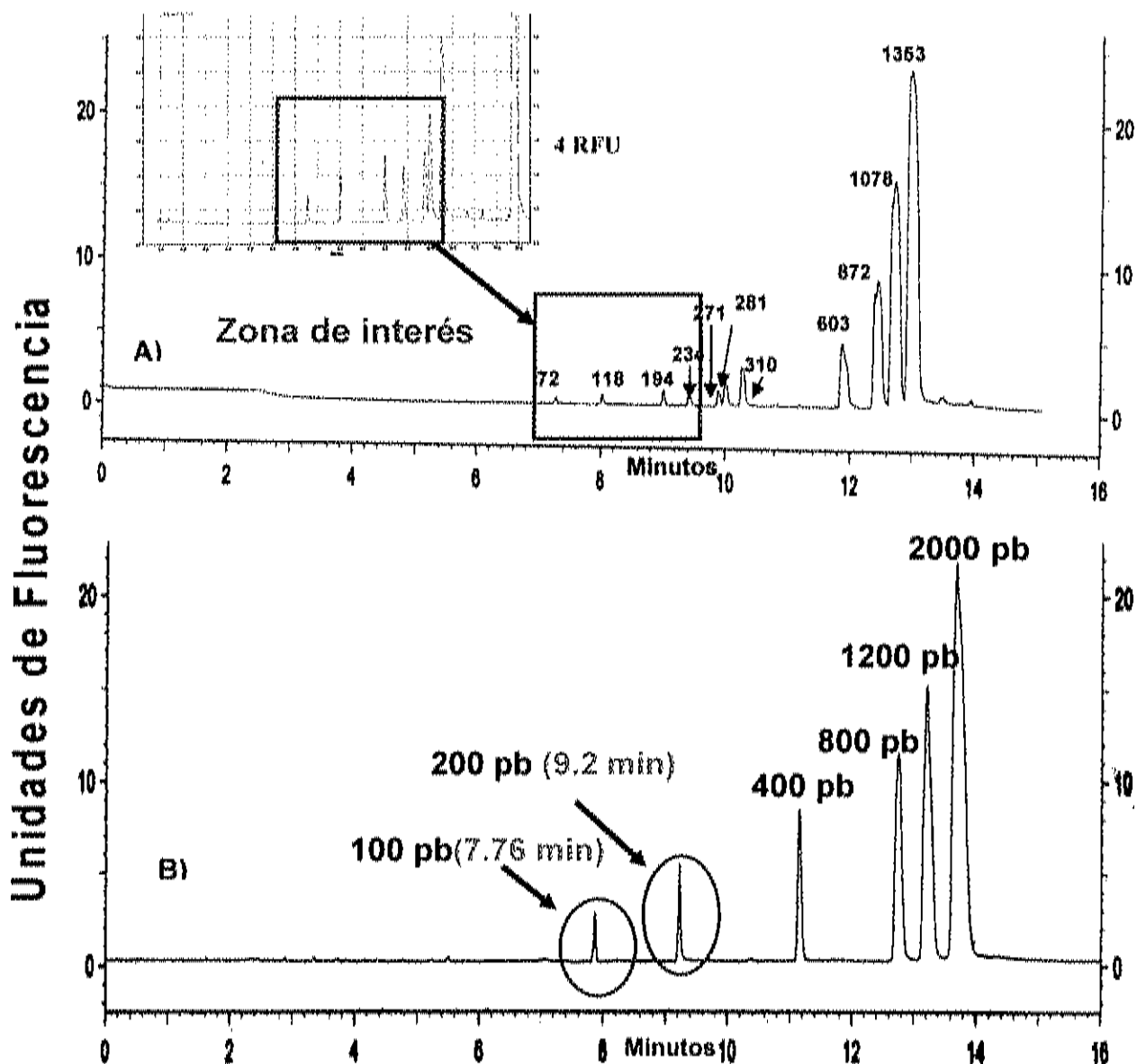


Figura 11. Electroferogramas típicos de los marcadores moleculares utilizando HEC al 3%. **A)** Estándar ϕ X-174 RF/ Hae III (72-1353 pb). **B)** Estándar low DNA mass ladder (100-2000pb). Buffer: Tris-HCl 20 mM, H_3PO_4 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.3. Inyección: 25 segundos. Corriente: 72 μ A. Temperatura: 40 °C. Detección: LIF 488nm (excitación), 520 nm (emisión). Capilar: Sin recubrir, 75 μ L DI, 38 cm longitud total, 28 cm longitud efectiva. Polaridad: Inversa.

La **tabla 3** muestra la reproducibilidad de la técnica en cuanto a los tiempos de migración para el estándar ϕ X-174 RF/ Hae III, donde se observa un tiempo de corrida total 12.97 minutos y los fragmentos de interés (118 pb y 194 \approx 202 pb) alrededor de los 8.0 y 9.0 minutos respectivamente. Las desviaciones estándar fueron menores a 0.13 y los coeficientes de variación menores a 1.2. La ecuación de predicción para obtener los pares de bases (peso molecular) se obtuvo graficando el inverso del tiempo de migración contra logaritmo de las pares de bases obteniéndose la siguiente ecuación $y = -21.042x + 4.6302$ con una $R^2 = 0.9772$, (n=6).

El estándar low DNA mass ladder bajo las condiciones desarrolladas en esta investigación, también presentó una alta reproducibilidad en cuanto a los tiempo de migración (**tabla 4**) donde se obtuvieron desviaciones estándares menores a 0.1 y coeficientes de variación menores a 0.9, la ecuación de predicción fue la siguiente $y = -24.05x + 4.9334$ con una $R^2 = 0.99$ (n=5), los tiempos de corrida total fueron 13.42 minutos y los fragmentos de interés (118 pb y 202 pb) alrededor de los 7.76 y 9.2 minutos respectivamente.

Es importante mencionar que la determinación analítica puede ser llevada bajo la corrida de un solo estándar, ya que se obtiene una ecuación de predicción para diferentes pesos moleculares, pero para fines de esta investigación (desarrollo metodológico) se recurrió a la determinación con dos estándares, ya que el fragmento de interés (118 pb) era exactamente igual al tamaño de un fragmento se encontraba en el estándar III ϕ X-174 RF/ Hae III, mientras que para el fragmento de interés de 202 pb se encontraba uno de 200 pb en marcador low DNA mas ladder.

Por lo cual, para fines de obtención de tiempo de migración lo más cercano a los fragmentos problemas o de interés, fueron utilizados estos estándares y así obtener ecuaciones de predicción (tiempos de migración) más exactas.

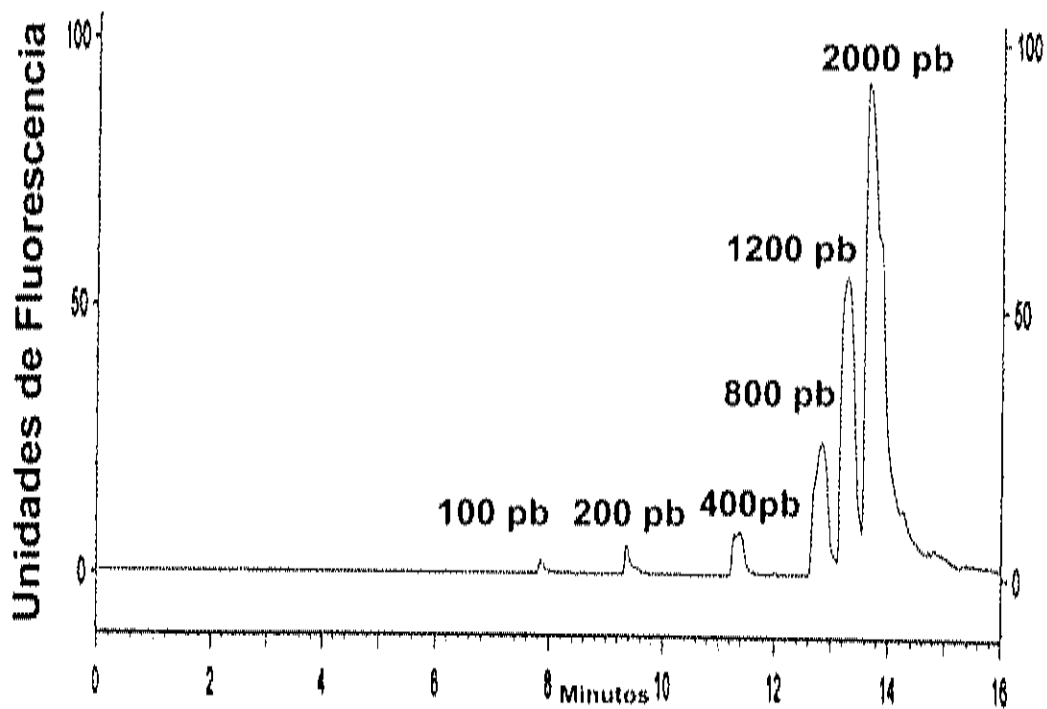


Figura 12. Electroferograma típico del marcador molecular low DNA mass ladder (100-2000pb) utilizando HEC al 3 %, Buffer: Tris-HCl 20 mM, H_3PO_4 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.3. Inyección: 25 segundos. Corriente: 72 μA . Temperatura: 40 °C. Detección: LIF 488 nm (excitación), 520 nm (emisión) Capilar: Sin recubrir, 75 μL DI, 38 cm longitud total, 28 cm longitud efectiva. Polaridad: Inversa.

Tabla 3. Reproducibilidad de los tiempo de migración del marcador de DNA
 ϕ X-174 RF/ Hae III (72-1353 pb).

Pb	72*	118	194	234	271	281	310	603	872	1078	1353
Tm	7.22	8.01	9.00	9.39	9.81	10.06	10.20	11.80	12.44	12.71	12.97
SD	0.03	0.06	0.07	0.07	0.05	0.044	0.11	0.10	0.11	0.10	0.12
CV	0.54	0.86	0.088	0.78	0.60	0.44	1.10	0.86	0.95	0.85	0.94

TM = tiempo de migración (minutos)

SD = Desviación estándar

CV = % coeficiente de variación

n = 6 repeticiones (inyecciones)

Tabla 4. Reproducibilidad de los tiempo de migración del marcador de DNA low DNA mass ladder (100-2000 pb).

pb	100	200	400	800	1200	2000
Tm	7.76	9.20	11.03	12.49	12.98	13.42
SD	0.03	0.06	0.07	0.07	0.05	0.044
CV	0.54	0.86	0.088	0.78	0.60	0.44

TM = tiempo de migración (minutos)

SD = Desviación estándar

CV = % coeficiente de variación

n = 5 repeticiones (inyecciones)

En base a lo anterior la técnica desarrollada resultó altamente reproducible en base a la ecuación y coeficientes de variación obtenidos para los tiempos de migración contra el logaritmo de los pares de bases, y presentó mayor sensibilidad (20 RFU), menores tiempos de análisis (16 minutos con respecto a kit comercial electroforético eCAP dsDNA 1000™ y las condiciones de Hernández-Chávez (2006) probadas en este estudio.

Productos PCR Obtenidos por EC

Los productos PCR observados en gel de agarosa para la identificación de la especie de atún de aleta amarilla, amplificación del gen β -conglucina subunidad α y Le1 en muestras de soya (texturizado), mezclas de soya y muestras comerciales de atún, fueron obtenidos por electroforesis capilar bajo las condiciones experimentales implementadas en este estudio.

Identificación de la especie de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*)

La identificación de la especie de atún consistió en someter al análisis por EC, los productos PCR del gen citocromo b mitocondrial que fueron amplificados en este estudio (**Figura 2**) y que han sido reportados por Quinteiro *et al.*, (1998). En la **Figura 13** se observa el patrón característico obtenido para un amplicon de 350 pb (pico) a los 10.3 minutos, con lo cual concuerda al tamaño de pares bases obtenidos para el estándar analítico (tiempos de migración) utilizado (low DNA mass ladder). Con lo cual, se puede decir que la reacción de PCR observada en gel de agarosa pudo ser detectada por EC, confirmando la identificación de la especie por diferentes medios de visualización del producto de PCR.

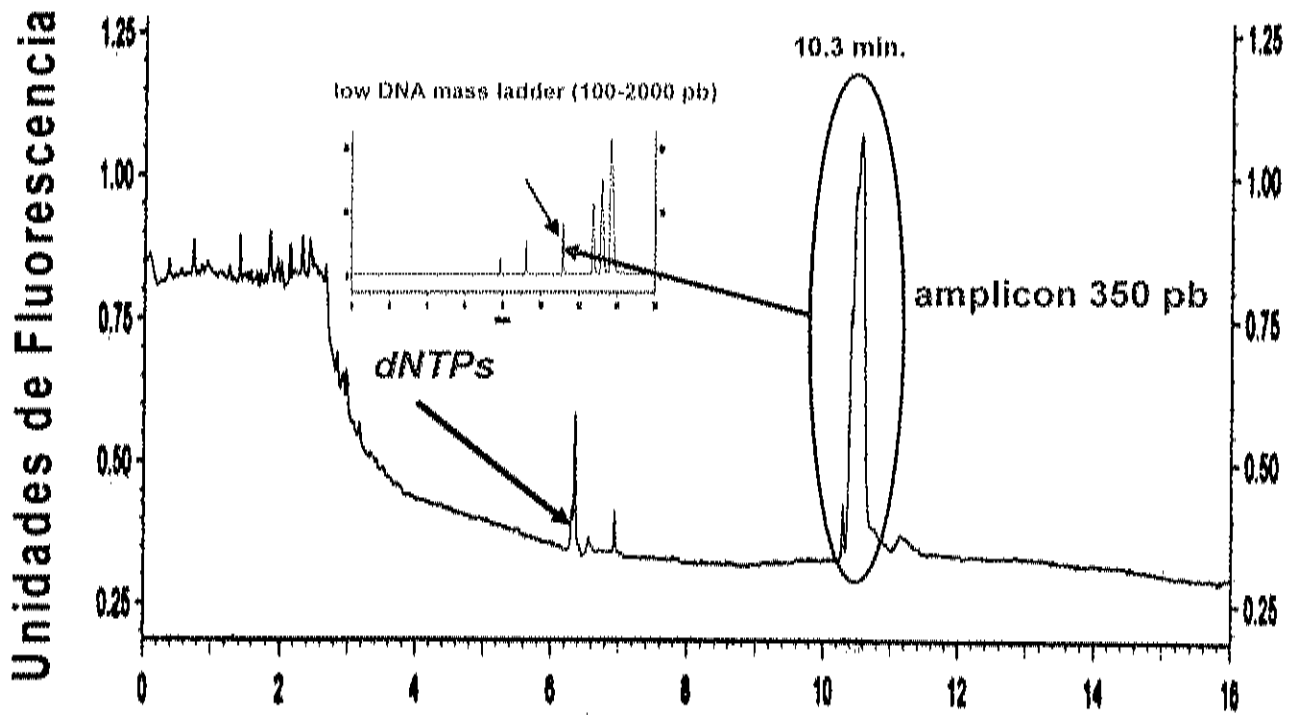


Figura 13. Electroferograma típico mostrando producto PCR de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) crudo. Condiciones de separación desarrolladas en este estudio.

Sin embargo la identificación de la especie en atún 100% procesado presento bandas tenues (**Figura 2, B**), esto puede resultar en la interpretación de un resultado falso negativo por la poca calidad y resolución obtenida por geles convencionales de agarosa, no así para la detección de 100 % atún procesado por EC (**Figura 14**) donde la detección mostró mucho mayor sensibilidad, una alta resolución (pico) y tiempos de migración mas exactos cuando son comparados a los tiempos de migración de los pares de bases semejantes en el estándar (curva de predicción). Por lo anterior la EC permitió aclarar y confirmar el resultado, descartando falsos negativos que se pudieran interpretar por electroforesis convencional en gel.

Especificidad de primers para detectar soya analizados por EC

De manera similar como fue evaluada la especificidad de los primers de soya en músculo de atún crudo (**Figura 4**) los productos PCR de esas reacciones obtenidas fueron analizados junto con reacciones de especificidad para atún 100 % procesado, para el gen Le1 y β -conglucina subunidad α . La **Figura 15** se muestra la especificidad de los primers de soya, donde se puede ver claramente la ausencia de picos (amplificones) cuando son expuestos a amplificar con DNA de atún crudo (músculo) y DNA de atún 100 % procesado, confirmando que los primer no dan reacciones inespecificas o cruzadas tanto en músculo como en atún procesado, obteniéndose solo los dNTP's o posibles sales residuales de la reacción de PCR (Ulfelder, 1993, por lo que los hace altamente selectivos para detectar productos de soya.

Detección de productos PCR para el gen β -conglucina subunidad α y Le1 analizados por EC

Debido a que se había obtenido con anterioridad la amplificación el gen β -conglucina subunidad α y Le1 por electroforesis convencional (**Figura 3 y 6**) estas reacciones de amplificación fueron analizadas por EC para obtener los

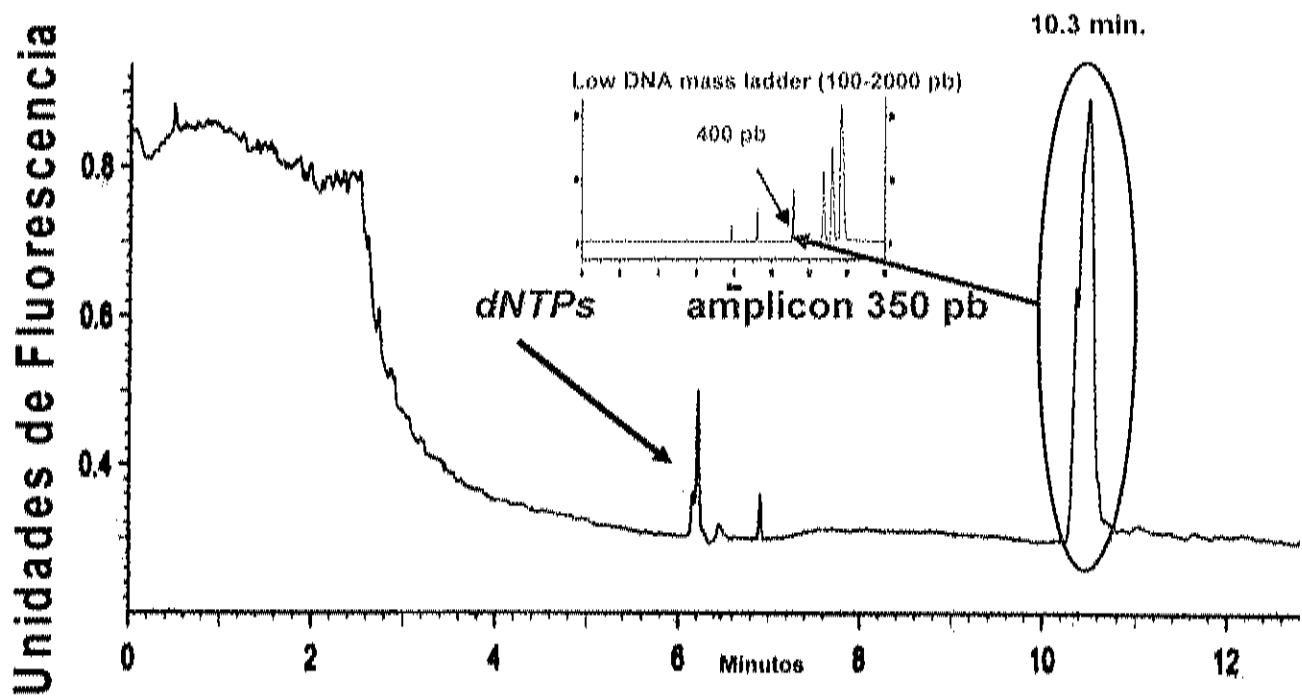


Figura 14. Electroferograma típico mostrando producto PCR de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*) procesado. Condiciones de separación desarrolladas en este estudio.

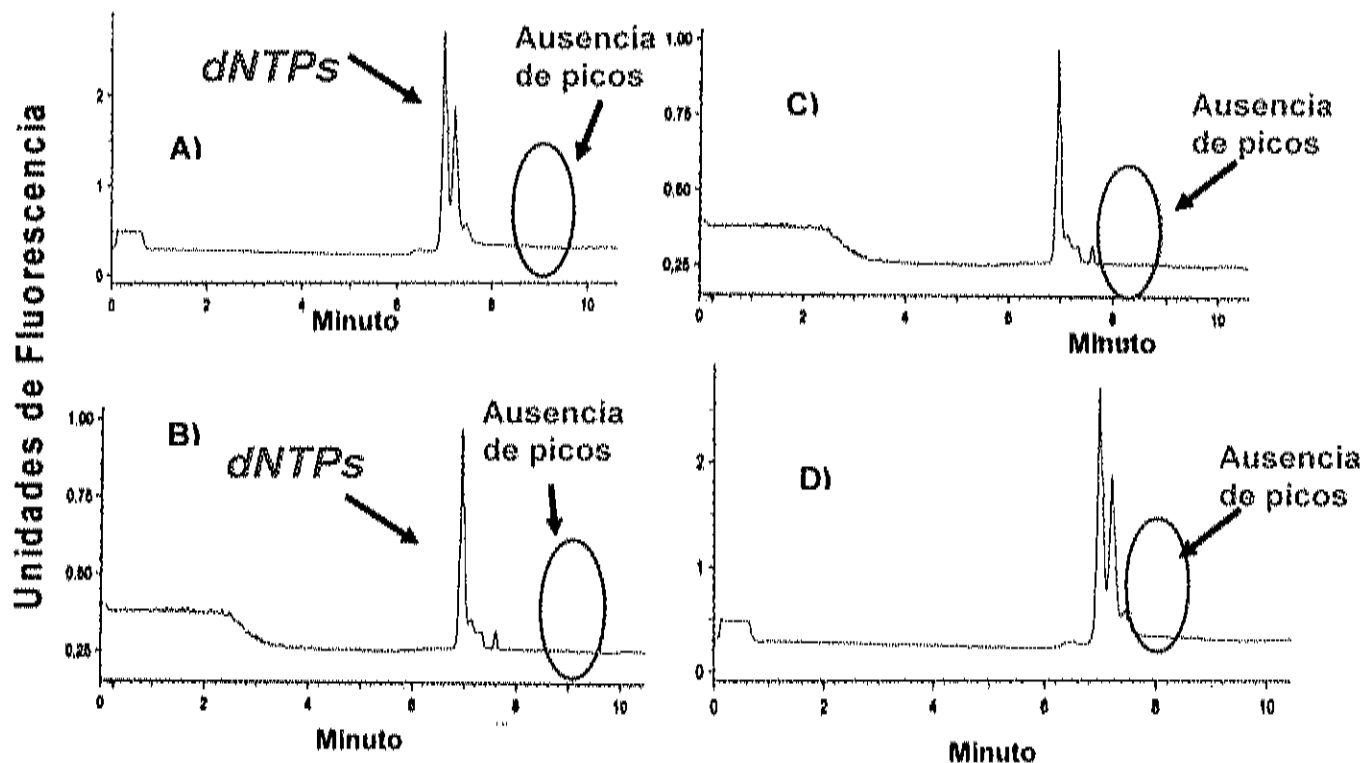


Figura 15. Electroferogramas típicos mostrando la especificidad de los primers de soya con atún de aleta amarilla. **A)** atún crudo (primers del gen β -conglucina subunidad α). **B)** atún procesado (primers del gen β -conglucina subunidad α). **C)** atún crudo (primers del gen Le1). **D)** atún procesado (primers del gen Le1). Condiciones de separación utilizadas en este estudio, (escala variable por efecto de impresión).

patrones característicos de los productos soya (texturizado). La **Figura 16** muestra los patrones característicos del gen β -conglucina subunidad α y Le1 en una muestra de soya (texturizado), donde se puede observar que el pico de interés para el gen β -conglucina subunidad α se encuentra alrededor de los 9.2 minutos, mientras que para el gen Le1 este tiene un tiempo de migración alrededor de los 8 minutos, en la figura también se muestra sus controles negativos para cada gen donde se puede apreciar la ausencia de picos para estos controles.

Reacciones inespecíficas en mezclas de atún con soya detectadas por EC

Aunque los primers del gen β -conglucina subunidad α fueron específicos para detectar soya y no presentaron reacciones inespecíficas con músculo de atún crudo y procesado térmicamente. No fue el caso para las mezclas de atún con soya procesadas térmicamente en diferentes porcentajes de adición, ya que se presentaron reacciones inespecíficas como se discutió anteriormente (**Figura 4**).

Donde estas mismas reacciones de amplificación llevadas para este gen en mezclas procesadas fueron analizadas por EC, con la finalidad de confirmar la inespecificidad en las mezclas o descartar falsos positivos, sin embargo el análisis obtenido por EC arrojó datos de manera muy similar (**Figura 17**), a los obtenidos por electroforesis convencional, detectando en nuestras de atún con soya (aceite) el producto PCR problema (9.2 minutos) y reacciones inespecíficas alrededor de los 8 y 10 minutos, confirmando que los primers del gen β -conglucina subunidad α son específicos para detectar soya en productos de soya, mas no aptos para detectar soya en atún térmicamente procesado. Es importante mencionar que los mismos resultados se presentaron para las mezclas en atún con soya en agua (datos no mostrados).

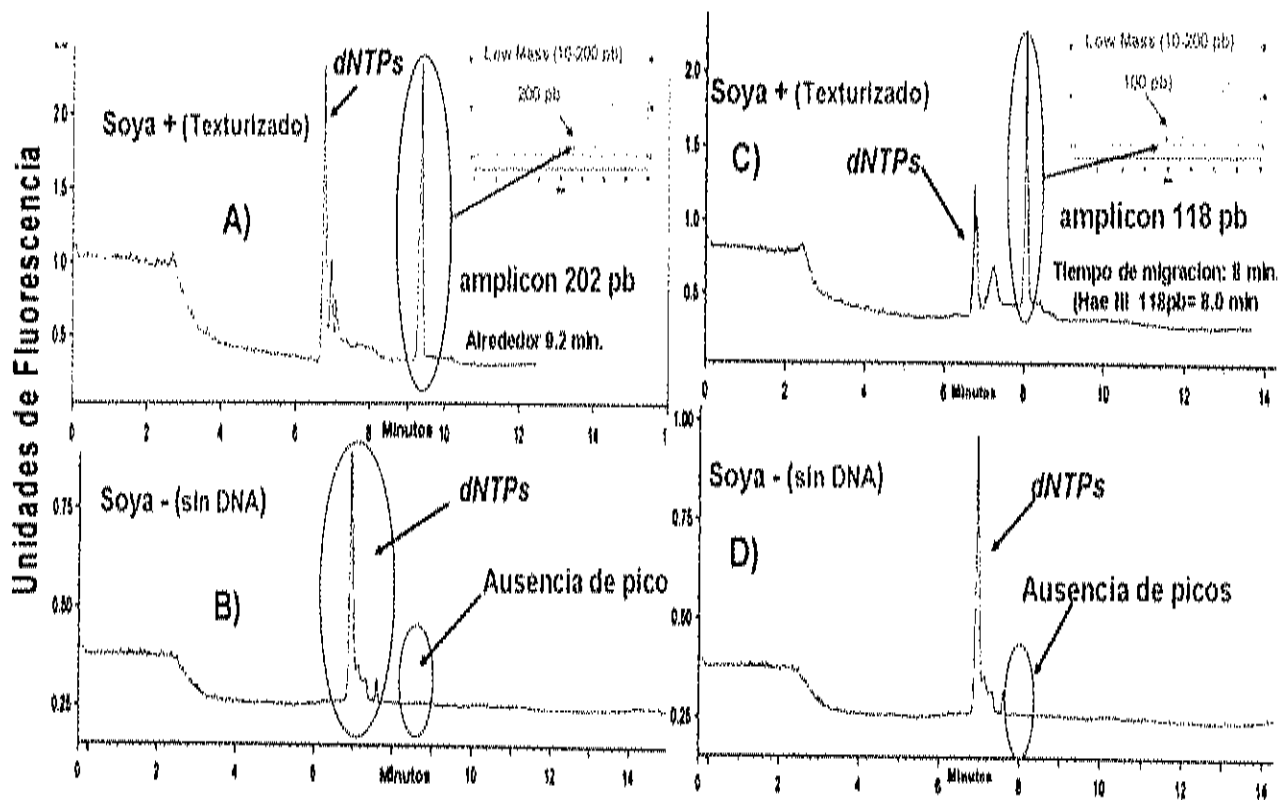


Figura 16. Electroferogramas típicos mostrando la amplificación de los genes β -conglucina subunidad α y Le1. **A)** texturizado de soya (primers β -conglucina subunidad α). **B)** control negativo (primers β -conglucina subunidad α). **C)** texturizado de soya (primers Le1). **D)** control negativo (primers Le1) condiciones de separación utilizadas en este estudio, (escala variable por efecto de impresión).

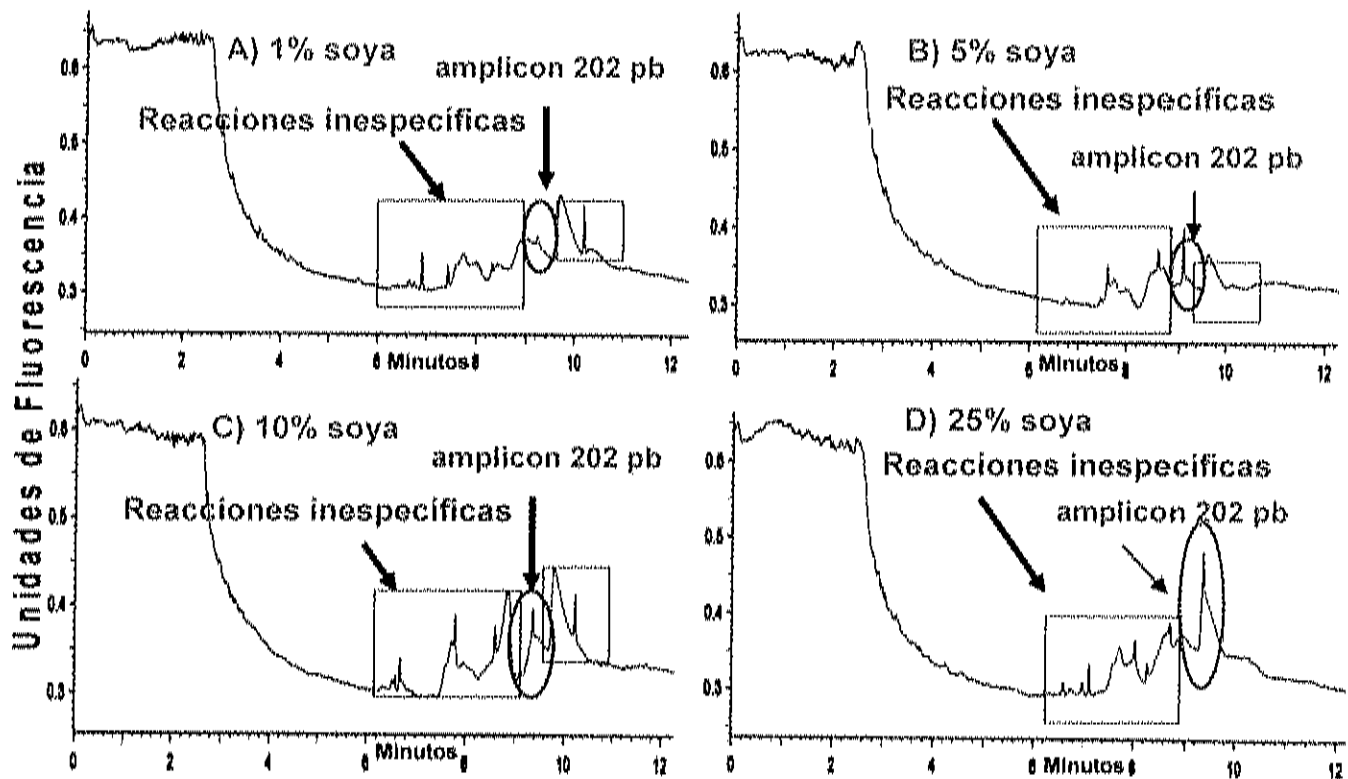


Figura 17. Electroferogramas típicos mostrando las reacciones inespecíficas de la amplificación de los gen β -conglucina subunidad α en mezclas de atún con soya en aceite procesadas térmicamente con diferentes porcentajes de adición. Condiciones de separación utilizadas en este estudio, (escala variable por efecto de impresión).

Detección de atún con soya en mezclas procesadas térmicamente por EC

Debido a la alta inespecificidad de los primers del gen β -conglucina subunidad α para detectar atún con soya en mezclas procesadas, la cual fue mencionada anteriormente, se procedió a la confirmación de la amplificación de muestras procesadas (mezclas) de atún con soya para el gen Le1 por EC como se había realizado en electroforesis convencional (**Figura 7**). En el análisis obtenido por EC, se pudo observar la amplificación del gen Le1 (amplicon 118 pb) en los diferentes porcentajes de atún con soya procesadas térmicamente en muestras de agua, (**Figura 18**). En esta figura también se puede observar que el producto PCR (amplicon) de interés fue incrementando su tamaño proporcional en orden ascendente con respecto al porcentaje de soya añadido en las mezclas, lo cual podría decirse que el método de extracción empleado para estas mezclas es eficiente y la detección de estas mezclas es proporcional a la adición. Datos similares se obtuvieron para mezclas de atún en aceite (datos no mostrados).

En base a lo anterior se promedió a la confirmación del monitoreo cualitativo en muestras comerciales realizado con anterioridad en geles de agarosa (**Figura 8**), las muestras comerciales sometidas al análisis por EC confirmaron la presencia de soya en atunes comerciales. La **Figura 19** muestra el patrón electroforético de una muestra comercial donde se observa un amplicon alrededor de los 8 minutos, lo cual corresponde para la amplificación de lectina de soya evidenciando la presencia de soya en la muestra.

Debido al tamaño del pico (fragmento de DNA) es decir respecto a la señal de detección (5 RFU) que presenta, cuando es comparado con el patrón electroforético al 25 % de adición de soya (**Figura 18**) podría decirse que esta muestra comercial se encuentra adulterada con un porcentaje mayor al 25 %. Demostrando que la detección de productos de PCR por EC pueda

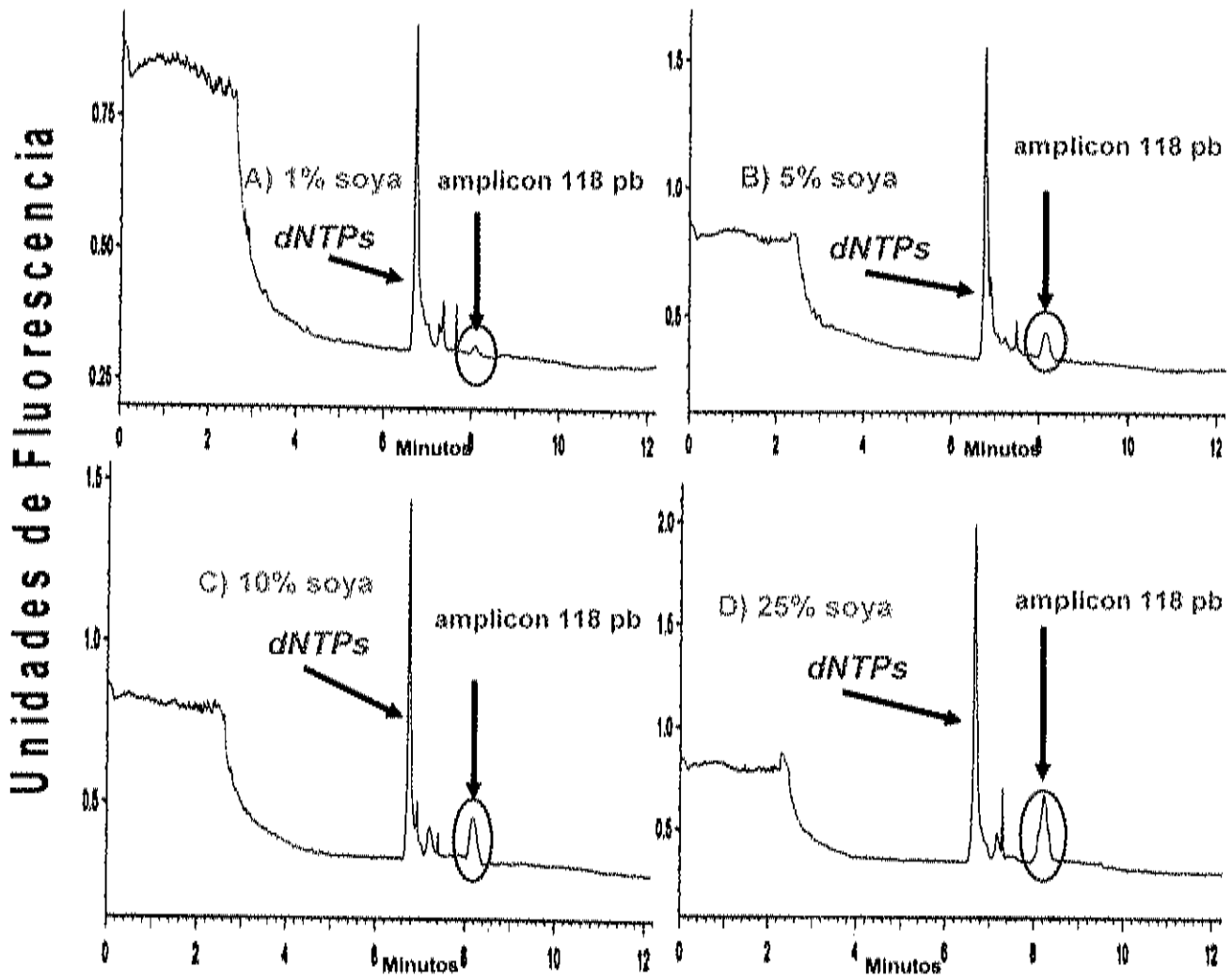


Figura 18. Electroferogramas típicos mostrando la amplificación del gen Le1 en mezclas de atún con soya en agua procesadas térmicamente con diferentes porcentajes de adición. Condiciones de separación utilizadas en este estudio, (escala variable por efecto de impresión).

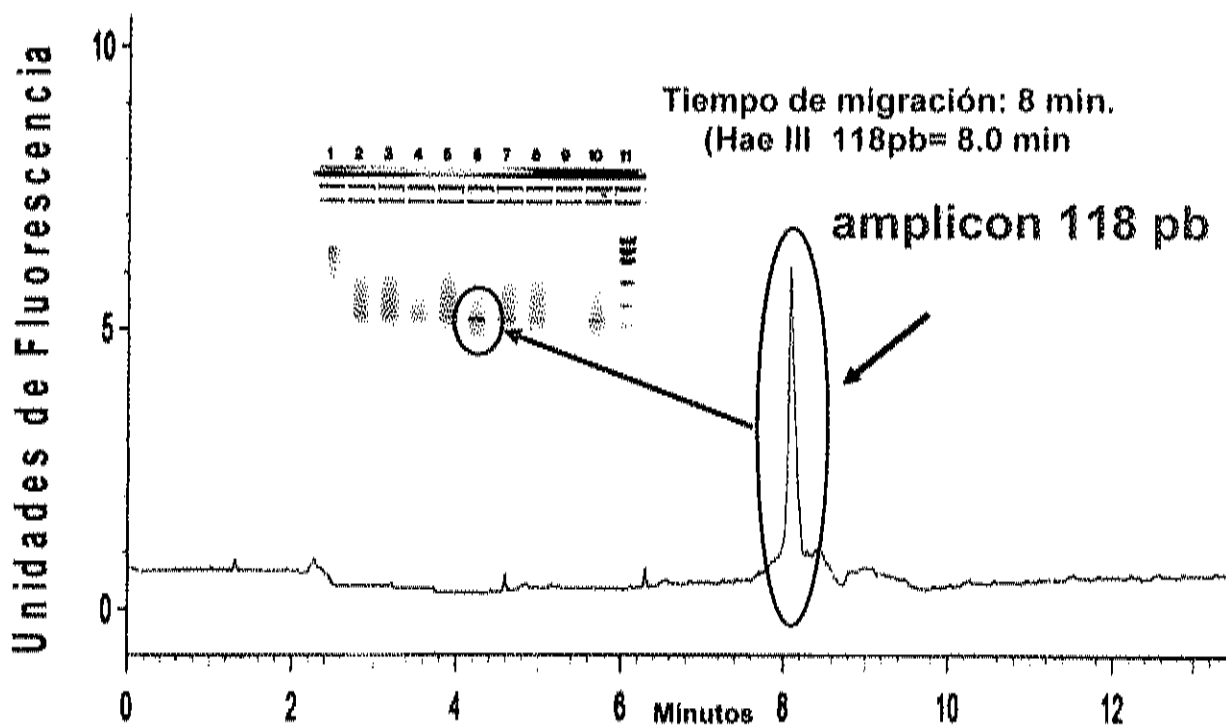


Figura 19. Electroferograma típico mostrando la amplificación del gen Le1 en muestra comercial de atún. Condiciones de separación utilizadas en este estudio.

predecir una aproximación de la cantidad (adulteración), caso contrario para la electroforesis convencional en gel, ya que solo arroja bandas de detección que la mayoría de las veces no son proporcionales a las cantidades de DNA en la muestra (García-Cañas *et al.*, 2004). En base a lo anterior se estableció que la concentración de 3 % de HEC (algunas otras modificaciones mencionadas anteriormente), permitió obtener una buena sensibilidad y separación de los marcadores de peso molecular ϕ X-174 RF/ Hae III, low DNA mass ladder y de productos de PCR para gen Le1, β -conglucina subunidad α en el texturizado de soya.

La detección de productos de PCR por electroforesis capilar representa mayor resolución de detección que la electroforesis en gel, lo cual en futuros análisis puede ayudar descartar falsos negativos que se atribuyen cuando son visualizados en geles de agarosa.

El desarrollo metodológico presentado para este estudio, permite analizar y separar el gen constitutivo de soya (Le1) lo cual permite detectar la presencia de soya en muestras comerciales de atún enlatado que no es declarado en el etiquetado y de esta manera contribuir al desarrollo metodologías que permitan frenar prácticas de adulteración con son llevadas en nuestro país.

CONCLUSIONES

- Se amplificaron productos PCR en muestras de soya para el gen de lectina (118 pb) y β -conglucínina (202 pb), y para atún el gen citocromo b mitocondrial (350 pb) que concuerdan a los reportados por la literatura.
- Es posible detectar soya en mezclas de atún con soya procesadas térmicamente y en muestras comerciales empleando el gen de lectina (Le1) tanto en geles de agarosa como por EC.
- Se encontraron reacciones inespecíficas para los primers del gen β -conglucínina en mezclas de atún con soya procesadas térmicamente por lo que no son adecuados para detectar soya en atún enlatado.
- Las condiciones de electroforesis capilar establecidas permitieron la obtención de patrones de los marcadores ϕ X-174 RF/ Hae III, low DNA mass ladder y los productos PCR de los genes de lectina (Le1), β -conglucínina y del citocromo b mitocondrial.
- La metodología desarrollada resultó altamente reproducible y sensible para la detección de productos PCR en estándares analíticos, muestras de soya, atunes comerciales, como en mezclas de atún con soya procesadas térmicamente.

RECOMENDACIONES

Se recomienda la construcción de un estándar interno (DNA competidor) para realizar PCR competitiva cuantitativa (QC-PCR), lo cual acoplada a la metodología desarrollada en el presente estudio, se puede llegar a cuantificar los niveles de adulteración en las muestras comerciales (% soya), y con esto establecer las cantidades reales de adición. Con lo cual en un futuro, esto permitiría ayudar a las autoridades competentes en la penalización de las practicas fraudulentas empleadas en el mercado de nuestro país.

El buffer de corrida empleado en el desarrollo metodológico no debe ser utilizado en un periodo no mayor a 1 mes, debido a que el polimero puede presentar degradaciones a un bajo refrigeración.

Se recomienda la utilización de capilar de la marca Beckman Coulter ya que son los más estables en cuanto a la interacción de las moléculas de interés (separación) presentados en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC *Official Methods Analysis*. **1990**. 15th, 988.10, 942-945.
- Bauer, T., Weller, P., Hammes, W.P., Hertel, C. **2003**. The effect of Processing Parameters on DNA Degradation in Food. *Europ. Food. Res. Tech.*
- Benlhabib, E.; Baker, J. I.; Keyler, D. E.; Singh, A. K. **2004**. Quantitative Analysis of Phytoestrogens in Kudzu-Root, Soy and Spiked Serum Samples by High-Pressure Liquidchromatography *Biomed. Chromatogr.* **18**: 367–380.
- Berkowitz, B.D.; Webert, W.D. **1987**. Determination the soy in Meat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70** (1): 85-90.
- Brosseau, R.M. y Ball, R.O. 1999. A New Method for Detecting Meat Substitution and adulteration. Department of Animal and Poultry Science University of Guelph. http://bru.aps.uoguelph.ca/meat_quality.htm.
- Castagnino, J.M. **2000**. Electroforesis Capilar. *Bioquimia.* **25** (1): 13-32.
- Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A. C.; Sbirrazzuoli, N.; Cuvelier, L. L. **2002**. Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1751-1764.
- Dennis, J.M. **1998**. Recent Developments in Food Authentication. *Critical Review the Analyst.* **123**: 151R-156R.

- García-Cañas, V.; González, R. Cifuentes, A. **2002**. Ultrasensitive Detection of Genetically Modified Maize DNA by Capillary Gel electrophoresis With Laser-Induced Fluorescence Using Different Fluorescent Intercalating Dyes. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4497-4502.
- García-Cañas, V.; Cifuentes, A.; González, R. **2004**. Quantitation of Transgenic Bt Event-176 Maize Using Double Quantitative Competitive polymerase Chain Reaction and Capillary gel Electrophoresis Laser-Induced Fluorescence. *Anal. Chem.* **76**: 2306-2313.
- GENCLEAN. For rapid and user-friendly purification of DNA in three basic steps. **2005**. Application Manual. Revision # 1001-999-3E05.
- Germi, A.; Mezzelani, A.; Lesignoli, F.; Corradini, R.; Marchelli, R.; Bordoni, R.; Consolandi, C.; Bellis, G. **2004**. Detection of Genetically Modified Soybean Using peptide Nucleic Acids (PNAs) and Microarray Technology. *J. Agric. Food Chem.* **52** (14): 4535-4540.
- González-Córdova, A. F.; Calderón de la Barca, A. M; Cota, M; Vallejo-Cordoba, B. **1998**. Immunochemical Detection of Fraudulent Adulteration of Pork Chorizo (Sausage) With Soy protein. *Food Sci Technol Int.* **4**: 257-262.
- Greiner, R.; Konietzny, U.; Villavincencio, A.L.C.H. **2005**. Qualitative and Quantitative Detection of Genetically Modified Maize and Soy in Processed Foods Sold Commercially in Brazil by PCR-Based Methods. *Food Control.* **16**: 753-759.

- Han-Wen K.; Ding, W, H. **2004**. Trace Determination of Bisphenol A and Phytoestrogens in Infant Formula Powders by gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr A*. **1027**: 67–74
- Hargin, K.D. **1996**. Authenticity Issues in Meat and Meat products. *Meat Sci*. N°S: S277-S289.
- Heimler, D.; Vignolini, P.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Romani, A. **2004**. Simple Extraction and Rapid Quantitative Analysis of Isoflavones in Soybean Seeds *Chromatographia*. **59**: 361-365.
- Hernández-Chávez, J.F. **2006**. Identificación y Cuantificación de Especie en Productos Cárnicos Procesados Térmicamente Mediante el Uso Combinado de Electroforesis Capilar y Técnicas Moleculares. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo Sonora, México.
- Hitchcock, C. H. S.; Bailey, F. J.; Crimes, A. A.; Dean, D. A. G.; Davies, P. J. **1981**. Determination of Soya proteins in Food Using An Enzyme –Linked immuosorbent Assay (ELISA) Procedure. *J. Sci. Food Agric*. **32**: 157-165.
- Ibañez, E. y Cifuentes, A. **2001**. New Analytical Techniques in Food Science. *Critical Reviews in Food Science*. **41**: 413-450.
- ICEX. Dirección de Análisis y Estudios Económicos. **2002**. Captura de túnidos (atún y Similares) <http://www.icex.es>.
- Kok, E.J.; Aarts, H.J.M.; Van Hoefft, A.; Kuiper, H.A. **2002**. DNA Methods: Critical Review of Innovative Approaches. *J.AOAC Int*. **85**: 797-800.

- Koppelman, S. J.; Lakemond, C.M.M.; Vlooswijk, R.; Hefle, S.L. **2004**. Detection of Soy protein in Processed Foods: Literature Overview and New Experimental work. *J. AOAC Int.* **87**: 1398-1407.
- Lau, L. T.; Collins, R. A.; Yiu, S. H.; Xing, J.; Yu, A. C.H. **2004**. Detection and Characterization of Recombinant DNA in the Roundup Ready[®] Soybean insert *Food Control*. **15**: 471-478.
- López-Tapia, J.; García-Risco, M. R.; Manso, M. A.; López-Fandiño, R. **1999**. Detection of the Presence of Soya Protein in Milk Powder by Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Electrophoresis *J.Chromatogr A*. **836**:153-160.
- Lumley, I.D. **1996**. Authenticity of Meats Products. En: Food Authentication. Ed. Ashurt, P.R.; Dennis, M. J. Blackie Academic and Professional, Londres. **4**: 108-139.
- Magaña-Gomez, J.A.; Islas-Osuna, M. A.; Yepiz-Plascencia, G.; Calderón de la Barca, A. M. **2003**. Detección por PCR de un Transgen en Productos de soya Utilizados para Formular Alimentos. *Rev. Fitotec. Mex.* **26**: 263-269.
- Mandigo, W.T.; Sander, C. R. **1989**. Usos, Restricciones y Detección de las proteínas de la soya en productos Cárnicos. *Soya Noticias*. **219**: 11-15.
- Sipos, E. F. **1996**. Proteína de Soya en Cárnicos. Asociación Americana de Soya.10-23.

- Mas, E.; Poza, J.; Ciriza, J.; Zaragoza, P.; Osta, R.; Rodellar, C. **2001**. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*. **15**: 1-10
- Mellenthin, O.; Galensa, R. **1999**. Analysis of Polyphenols Using Capillary Zone Electrophoresis and HPLC: Detection of Soy , Lupin, and Pea Protein in Meat Products. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 594-602.
- Meyer, R.; Candrian, U. **1996**. PCR-Based DNA Analysis for Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. **29**: 1-9.
- NOM-028-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la Pesca. Pescados en Conserva. Especificaciones Sanitarias. Diario Oficial de la Federación, 14 de abril de 1994.
- NOM-084-SCFI-1994, Información comercial-Especificaciones de Información Comercial y Sanitaria para Productos de Atún y Bonita Preenvasados. Diario Oficial de la Federación, Marzo 29 de 1994.
- PROFECO. **2005**. El Laboratorio Profeco Reporta. Atún enlatado. Revista del consumidor. **337**: 34-41
- Official Collection of Test Methods in accordance with Article 35 LMBG, Classification no. L 23.01.22-1. **1998**. German Federal Food Act- Food Analysis, Beuth, Berlin koln, March 1998.
- Querci, M.;Maretti, M.; Mazzara, M. **2006**. The Analysis of Food Samples For the presence of Genetically Modified Organisms, Session 9: Qualitative

Detection of MON810 maize, and Roundup Ready[®] Soybean by PCR.
<http://gmotraining.jrc.it/docs/Session09.pdf#search='GMO3%20lectin'>.

- Quinteiro, J.; Sotelo, C.G.; Rebién, H.; Medina, I.; Perez-Martin, R.I.; Rey-Mendez, M.; Mackie, I.M. **1998**. Use of mt DNA Direct Polymerase Chain reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragments Length polymorphism Methodologies in Species Identification of Canned tuna. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 1662-1669.
- Rittenburg, J.H.; Adams, A.; Palmer, J.; Allen, J.C. **1987**. Improved Enzyme – Linked Immunosorbent Assay for Determination of soy Protein in Meat Products. *J. Assoc. Off. Anal Chem.* **70**: 582-587.
- Rott, M. E.; Lawrence, T.S.; Wall, E.M.; Green, J. M. **2004**. Detection and Quantification of Roundup Ready Soy in Foods by Conventional and Real Time polymerase Chain Reaction. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 5223-5232.
- Taylor, S. L.; Nordlee, J. A. **1996**. Detection of Food Allergens *Food Technology*. **50**: 231-238.
- Terry, F.C.; Harris, N.; Parkes, H.C. **2002**. Detection of Genetically Modified Crops and Their Derivatives: Critical Steps in Samples Preparation and Extraction *J. AOAC Int.* **85**: 768-774.
- Umphress, T. S.; Murphy, P. S.; Franke, A. A.; Custer, L. J.; Blitz, C. L. **2005**. Isoflavone Content of Foods With Soy Additives. *J. Food Composition and Analysis*. **18**: 533-550.

Ulfelder, K. J. **1993**. Capillary Electrophoresis of dsDNA Fragments with UV and Laser-Induced Fluorescence. *Detection Application e information (Beckman Instruments)*, A1748.

Wanakhachornkrai, P.; Lertsiri. **2003**. Comparison of Determination Method for Volatile Compunds in Thai Soy Sauce. *Food Chem*, **83**: 619-629.

Yoshino, M.; Kanazawa,A.; Tsutsumi, K.I.; Nakamura, I.; Shimamoto, Y. **2001**. Structure and characterization of the gene encoding a subunit of soybean b-conglycinin. *Genes Genet. Syst.* **76**: 99-105.

Yoshimura, T.; Kuribara, H.; Matsuoka, T.; Kodama, T.; Iida, M.; Watanabe, T.; Akiyama, H.; Maitani, T.; Furui, S.; Hino, A. **2005**. Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 2052-2059.

Ulfelder, K. J. **1993**. Capillary Electrophoresis of dsDNA Fragments with UV and Laser-Induced Fluorescence. *Detection Application e information (Beckman Instruments)*. A1748.

Wanakhachornkrai, P.; Lertsiri. **2003**. Comparison of Determination Method for Volatile Compunds in Thai Soy Sauce. *Food Chem.* **83**: 619-629.

Yoshino, M.; Kanazawa,A.; Tsutsumi, K.I.; Nakamura, I.; Shimamoto, Y. **2001**. Structure and characterization of the gene encoding a subunit of soybean b-conglycinin. *Genes Genet. Syst.* **76**: 99-105.

Yoshimura, T.; Kuribara, H.; Matsuoka, T.; Kodama, T.; Iida, M.; Watanabe, T.; Akiyama, H.; Maitani, T.; Furui, S.; Hino, A. **2005**. Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 2052-2059.