



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“Detección de carne de Delfín (*Delphinus delphis*) en
Atún (*Thunnus thynnus*) Enlatado, por Medio de
PCR.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

KARLA VANESSA HERNÁNDEZ HERBERT

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa

COASESORA: M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Detección de carne de Delfín (*Delphinus delphis*) en Atún (*Thunnus thynnus*) Enlatado, por Medio de PCR.

Que presenta la pasante: Karla Vanessa Hernández Herbert
Con número de cuenta: 310283603 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Abril de 2018.

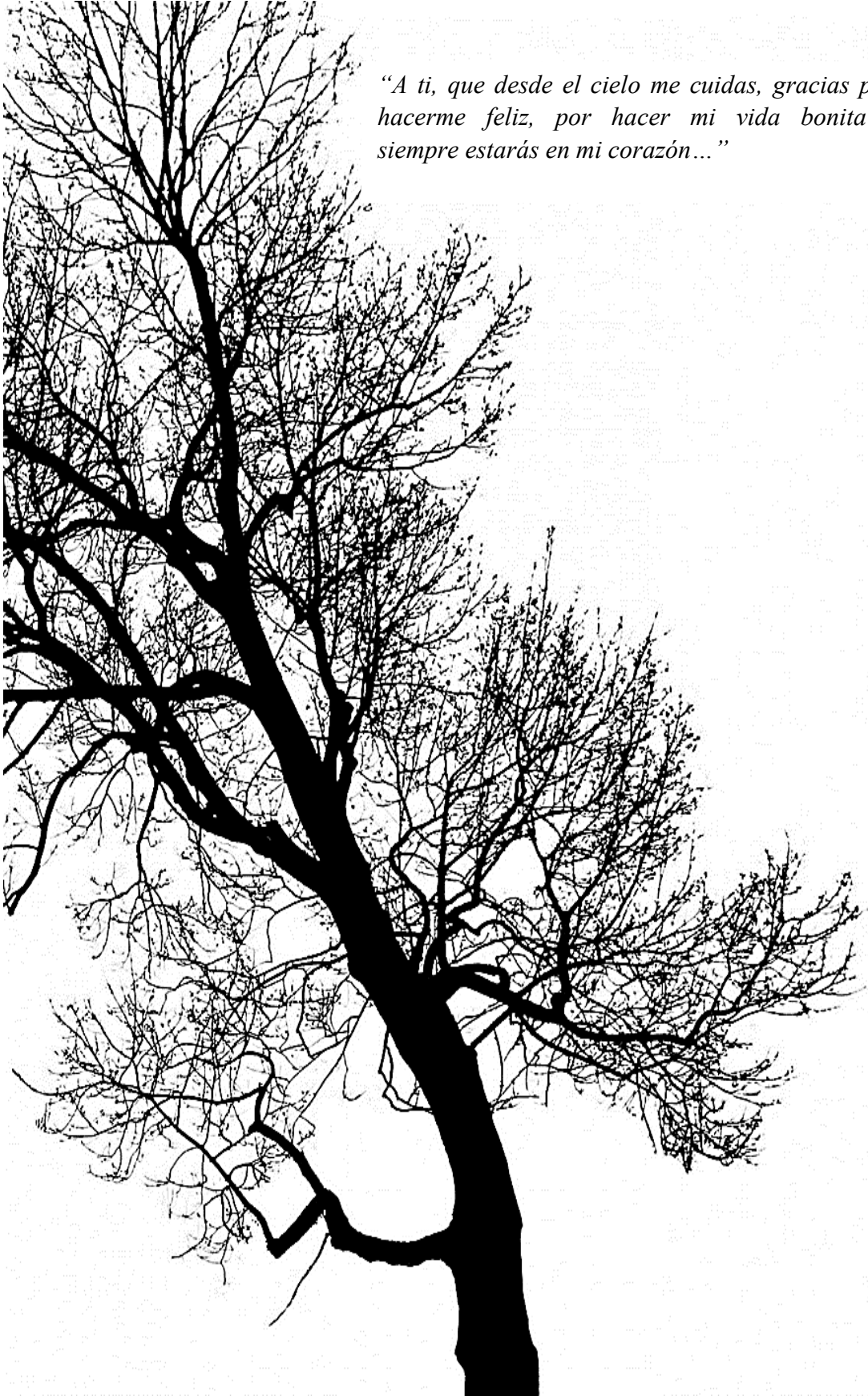
PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
1er. SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
2do. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

*“A ti, que desde el cielo me cuidas, gracias por
hacerme feliz, por hacer mi vida bonita....
siempre estarás en mi corazón...”*



CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE CUADROS	3
TERMINOLOGÍA	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	8
CAPITULO I. ANTECEDENTES	10
1.1 ASOCIACIÓN ATÚN – DELFÍN	10
1.2 ETIQUETADO DOLPHIN SAFE	10
1.3 LEY DE PROTECCIÓN DE LOS MAMÍFEROS MARINOS	11
1.4 PESCADO	13
1.4.1 PESCADO EN CONSERVA	13
1.5 ATÚN	13
1.5.1 ATÚN ALETA AMARILLA	13
1.5.2 ÁMBITO GEOGRÁFICO	14
1.5.3 INICIO DE LA PESCA DE ATÚN	15
1.5.4 CAPTURA	15
1.5.5 MEDIDAS PARA LA PROTECCIÓN DEL DELFÍN EN LA CAPTURA DEL ATÚN	16
1.5.6 COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL	18
1.5.7 VALOR NUTRIMENTAL	18
1.5.8 BENEFICIOS DEL ATÚN	18
1.5.9 PRESENTACIONES DE ATÚN ENLATADO	18
1.6 FACTORES ECONÓMICOS	19
1.6.1 ECONOMÍA DE LA PESCA	19
1.6.2 VOLUMEN DE PESCA EN TONELADAS AÑO	19
1.6.3 LITORALES DE MÉXICO	20
1.6.4 PRODUCCIÓN NACIONAL	21
1.6.4.1 PRODUCCIÓN NACIONAL DE ATÚN	21
1.6.4.2 PRODUCCIÓN INTERNACIONAL	23
1.6.5 PRODUCCIÓN NACIONAL DE ATÚN ENLATADO	24
1.6.5.1 CONSUMO POBLACIONAL	24

1.6.6 IMPORTACIÓN Y EXPORTACIÓN	24
1.6.6.1 MERCADO DEL ATÚN	24
1.7 AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS	26
1.7.1 MÉTODOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS	26
1.7.1.1 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	26
1.7.1.2 ANÁLISIS DE DNA	27
1.7.1.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN	27
1.7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	28
1.7.2.2 ETAPAS DE LA REACCIÓN	28
1.7.2.2.1 DESNATURALIZACIÓN	28
1.7.2.2.2 HIBRIDACIÓN	28
1.7.2.2.3 ELONGACIÓN (EXTENSIÓN, REPLICACIÓN O POLIMERIZACIÓN)	29
1.7.2.3 COMPONENTES	30
1.7.2.3.1 OLIGONUCLEOTIDOS	30
1.7.2.3.2 DESOXINUCLEÓSIDO TRIFOSFATO (dNTP's)	32
1.7.2.3.3. ENZIMA DNA POLIMERASA	32
1.7.2.3.4 ADN DIANA	32
1.7.2.4 METODOLOGÍA BÁSICA DE LA PCR	32
1.7.2.5 ANÁLISIS DEL PRODUCTO DE LA PCR	33
1.7.2.5.1 ELECTROFORESIS	33
1.7.2.6 APLICACIONES	33
1.7.2.7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS	34
CAPITULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	35
2.1 CUADRO METODOLÓGICO	35
2.1.1 PROBLEMA	36
2.1.2 OBJETIVO GENERAL	36
2.1.3 OBJETIVOS PARTICULARES	36
2.2 MATERIALES	37
2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	37
2.2.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ATÚN ENLATADO	37
2.3. REACTIVOS Y PRODUCTOS	38
2.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN	38
2.3.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN	38
2.3.3 ELECTROFORESIS	38
2.3.4 PCR	38
2.4 EQUIPOS	39
2.5 MÉTODOS	39
2.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN	39
2.5.1.1 SAMBROOK	39
2.5.1.2 KIT WIZARD® SISTEMA MAGNÉTICO DE PURIFICACIÓN DE ADN PARA ALIMENTOS	40
2.5.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN	41
2.5.2.1 METODOLOGÍA DE NANO DROP (ESPECTROFOTÓMETRO)	42
2.5.2.2 DILUCIÓN DE ADN	42
2.5.3 ELECTROFORESIS	43

2.5.3.1 METODOLOGÍA PARA LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	43
2.5.3.2 CARGA Y CORRIDA DE GEL	43
2.5.3.4 VISUALIZACIÓN DE PIGMENTOS	43
2.5.4 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA - AMPLIFICACIÓN DE DNA)	43
2.5.4.1 PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN	43
2.5.4.2 METODOLOGÍA PARA PCR	44
2.5.4.3 METODOLOGÍA - KIT DE PCR DIRECTO DE TEJIDO ANIMAL	44
CAPITULO III. ANÁLISIS Y RESULTADOS	46
3.1 OBJETIVO PARTICULAR 1 - DISEÑO Y SELECCIÓN DE PRIMERS	46
3.1.1. PRIMERS PARA DELFÍN	46
3.1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRIMERS	46
3.1.1.2 PROGRAMA DE PCR	46
3.1.2 PRIMERS PARA ATÚN	47
3.1.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRIMERS	47
3.1.2.2 PROGRAMA DE PCR	47
3.2 OBJETIVO PARTICULAR 2 – ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS	48
3.2.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	48
3.2.2 PCR PARA ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS	49
3.3 OBJETIVO PARTICULAR 3 – PRESENCIA DE DELFÍN EN ATÚN ENLATADO	52
3.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE ATÚN ENLATADO	52
3.3.2 PCR DE LAS MUESTRAS DE ATÚN ENLATADO CON LOS PRIMERS DE ATÚN	52
3.3.3 PCR DE LAS MUESTRAS DE ATÚN ENLATADO CON LOS PRIMERS DE DELFÍN	55
CAPITULO IV. DISCUSIÓN	60
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	69
ANEXO 1. KIT WIZARD® SISTEMA MAGNÉTICO DE PURIFICACIÓN DE ADN PARA ALIMENTOS	69
ANEXO 2. KIT DE PCR DIRECTO DE TEJIDO ANIMAL	77
ANEXO 3. DISEÑO DE PRIMERS	81
ANEXO 4- HOJAS DE ESPECIFICACIONES DE LOS PRIMERS	87
ANEXO 5 – CÁLCULOS DE DILUCIONES	91
ANEXO 6 – CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL PARA EL DISEÑO DE LOS PRIMERS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Delfin Manchado del atlántico.....	10
Figura 2. Delfin tornillo	10
Figura 3. Etiqueta Dolphin Safe.....	11
Figura 4. El atún aleta amarilla (T. albacares)	14
Figura 5. Zona de pesca del atún aleta amarilla (Thunnus albacares) en el Golfo de México...	14
Figura 6. Gráfica de la producción total de atún en 2011	15
Figura 7. Pesca (Artesanal)	16
Figura 8. Ranchos atuneros.....	16
Figura 9. Imagen representativa del paño medina y la maniobra de retroceso	17
Figura 10. Presentaciones de atún enlatado	19
Figura 11. Volumen de la Pesca.....	19
Figura 12. Litorales de México	20
Figura 13. Litorales, potencial productivo de atún	21
Figura 14. Volumen de producción, principales entidades productoras	21
Figura 15. Porcentaje del valor de la producción por entidad federativa.....	22
Figura 16. Volumen de la producción nacional 2006 – 2015	22
Figura 17. Especies de Atún que se pescan en México. a) Atún aleta amarilla, b) Atún aleta azul, c) atún patudo, d) Albacora, e) Atún aleta negra, f) Barrilete, g) Bonito, h) Barrilete negro	23
Figura 18. Consumo anual per cápita.....	24
Figura 19. Ranking mundial, producción de atún	24
Figura 20. Origen – destino comercial del atún en México	25
Figura 21. Diversas presentaciones de atún que existen el mercado	25
Figura 22. Evolución del comercio exterior de atún.....	26
Figura 23. Desnaturalización del ADN.....	28
Figura 24. Hibridación del ADN.....	29
Figura 25. Elongación del ADN	29
Figura 26. Etapas de la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR).....	30
Figura 27. Metodología básica de a PCR.....	33
Figura 28. Cuadro Metodológico	35
Figura 29. Termociclador (Perkin Elmer), modelo Gene Amp PCR system 2400	44
Figura 30. Programa de PCR para delfín	47
Figura 31. Programa de PCR para la amplificación de atún	48
Figura 32. Gel de agarosa al 1% de la integridad de las muestras frescas, (1 y 2) muestras concentradas de delfín, (3 y 4) muestras concentradas de tiburón, (5 y 6) muestras concentradas de atún, (7) muestra diluida de delfín, (8) muestra diluida de atún y (9) muestra diluida de tiburón	49
Figura 33. Gel de agarosa al 1.5% de la comprobación del tamaño de amplificado de los primers, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) Blanco para cada una de los primers, (1 y 2) primers de delfín, (3 y 4) primers de atún.....	50
Figura 34. Gel de agarosa al 1.5% de especificidad de los primers de delfín, (M) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (1) delfín, (2) atún, (3) tiburón, (4) cerdo, (5) bovino, (6) plátano, (7) fresa, (8) tomate verde	51
Figura 35. Gel de agarosa al 1.5% para especificidad de los primers de atún, (M) marcador de peso molecular 100p, (B) blanco, (1) atún, (2) delfín, (3) tiburón.....	52

Figura 36. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (1 -5) con primers de atún, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo – atún, (1-5) muestras de atún enlatado	53
Figura 37. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (6 - 10) con primers de atún, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo – atún, (6 - 10) muestras de atún enlatado	54
Figura 38. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (11 -15) con primers de atún, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo – atún, (11-15) muestras de atún enlatado	54
Figura 39. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (1 -5) con primers de delfín, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (1 -5) muestras de atún enlatado, (C+) control positivo – delfín	56
Figura 40. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (6 -10) con primers de delfín, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo - delfín, (6-10) muestras de atún enlatado, (C-) control negativo – atún	56
Figura 41. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (11 -15) con primers de delfín, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo - delfín, (11-15) muestras de atún enlatado, (C-) control negativo – atún	57
Figura 42. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de la comprobación de las muestras de atún enlatado que amplificaron con primers de delfín, (M) marcador, (B) blanco, (C+) control positivo- delfín, (3, 4 y 13) muestras de atún enlatado, (C-) control negativo – atún.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición Nutricional del atún natural y atún enlatado.....	18
Cuadro 2. Principales especies del mar que más se pescan en México	20
Cuadro 3. Especies de atún presentes en México	23
Cuadro 4. Diseño de primers: Propiedades de los oligonucleótidos.....	31
Cuadro 5. Características de las muestras para el material biológico.....	37
Cuadro 6. Referencias de las Muestras de atún	37
Cuadro 7. Componentes del Kit de PCR	44
Cuadro 8. Componentes del Kit de PCR directo de tejido animal.....	45
Cuadro 9. Características de los primers para delfín	46
Cuadro 10. Características del primer para atún	47
Cuadro 11. Cuantificación de las muestras frescas.....	48
Cuadro 12. Cuantificación Muestras frescas, diluidas.....	49
Cuadro 13. Distribución de las especies para el gel de especificidad de los primers de delfín .	50
Cuadro 14. Distribución de las especies para el gel de especificidad de los primers de atún....	51
Cuadro 15. Distribución de las marcas de atún enlatado de 1 – 15, usando los primers para detección de atún.....	53
Cuadro 16. Distribución de las marcas de atún enlatado de 1 – 15, usando los primers para detección de delfín	55

TERMINOLOGÍA

°C – Grados centígrados.

µg – Microgramos.

µL – Microlitros.

ADN – Acido Desoxirribonucleico.

ARN – Ácido Ribonucleico.

CIAT – Comisión Interamericana del Atún Tropical.

CONAPESCA – Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.

g – Gramos.

GATT – Acuerdo General sobre aranceles Aduaneros y Comercio.

IG – Ingeniería Genética.

kcal – Kilocalorías.

km- Kilómetros.

mg – Miligramos.

min - Minutos.

ng – Nanogramos.

ng/µL – Concentración de ADN.

OMC – Organización Mundial de Comercio.

OPO - Océano Pacífico Oriental.

pb – Pares de bases.

PCR – Reacción en Cadena la de Polimerasa.

POT – Océano Pacífico Tropical.

PROFECO – Procuraduría Federal del Consumidor.

s – Segundos.

SAGARPA – Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SEMARNAT – Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

TM – Temperatura media o temperatura de hibridación de los primers.

ZEEM – Zona Económica Exclusiva de México.

RESUMEN

La producción nacional de atún, representa una parte fundamental en la economía de nuestro país, considerada una de las especies marinas que más se consumen por su aporte nutrimental, brindando diversos beneficios al organismo del consumidor.

En los últimos años se han presentado una serie de conflictos con respecto a la exportación de atún mexicano a Estados Unidos, otorgando la etiqueta “Dolphin safe” (Delfín Seguro) para todos los países que quisieran exportar producto atunero a dicho país, considerándose de gran importancia que dentro de la normativa oficial establecida en México no se cuenta con el sello de autenticidad (“Dolphin-safe”) que sea general y aplicable para todos los productos de atún.

De tal manera que las practicas impuestas se describen como un beneficio a las especies en peligro de extinción o especies no aptas para el consumo, como es el caso de algunas especies de delfín, ya que los sistemas empleados en la captura de atún, son una parte fundamental creando un hábitat artificial atrayendo a distintas especies de peces, entre ellas atunes (juveniles y adultos), pero también especies de delfín.

Por lo cual, mediante este proyecto experimental, se evaluó la autenticación de 15 muestras de atún enlatado en aceite y en agua, por medio de la técnica de PCR para la detección de carne de delfín.

La especificidad de los primers diseñados fueron evaluados con ADN de delfín, atún, tiburón, bovino, cerdo, plátano, fresa y tomate verde, visualizando el fragmento de amplificación de 424pb únicamente en la muestra de delfín.

Determinando que la técnica empleada para la extracción de ADN y la PCR al igual que el diseño de los primers, brindan resultados satisfactorios para los productos que han tenido algún tratamiento térmico como es el caso del atún enlatado del cual se obtuvieron los datos necesarios para la realización de este proyecto.

INTRODUCCIÓN

El Océano Pacífico Oriental Tropical (OPO) representa el 18% de la captura total de atún en el mundo y en él operan barcos atuneros de alrededor de 13 países, de los cuáles México constituye el 65% de la captura total de atún en dicho océano. La especie con mayor volumen es el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*)¹¹.

En las aguas orientales de la zona tropical del Océano Pacífico es frecuente que por debajo de los grupos de delfines que nadan en la superficie del mar se desplacen bancos de atún aleta amarilla. Cuando el atún se pesca con redes de cerco, los delfines quedan atrapados en ellas. Muchos de ellos mueren si no son liberados de las redes³⁴.

La Ley de los Estados Unidos de Protección de los Mamíferos Marinos, contiene medidas de protección de los delfines que deben cumplir su flota pesquera y los países que capturen atún aleta amarilla en esa parte del Océano Pacífico. Si un país exporta atún a los Estados Unidos y no puede demostrar a las autoridades estadounidenses que ha cumplido las normas de protección del delfín que establece la propia legislación estadounidense, el Gobierno dicta el embargo de todas las importaciones de pescado procedentes de ese país³⁴.

México alegaba que las medidas en litigio, que establecen las condiciones para el uso de una etiqueta “dolphin safe” en los productos de atún y supeditan el acceso al etiquetado oficial dolphin safe del Departamento de Comercio de los Estados Unidos a la presentación de determinadas pruebas documentales que varían con arreglo a la zona en que se capture y el método de pesca por el que se capture el atún contenido en el producto de atún, eran incompatibles, entre otras disposiciones³⁵.

Actualmente en México las Regiones Pesqueras I (Baja California, Baja California Sur y los mares de Sonora y Sinaloa y Nayarit) y II (Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas) capturan organismos juveniles del atún aleta azul en alta mar, los cuales son confinados en ranchos de engorda para su posterior comercialización⁴⁴.

El atún es uno de los pescados azules más consumidos en nuestro país. Su carne posee un 12% de grasa, aunque se trata de una grasa rica en ácidos grasos omega-3, que ayuda a disminuir los niveles de colesterol y de triglicéridos en sangre y a hacer la sangre más fluida, lo que disminuye el riesgo de aterosclerosis y trombosis. Por este motivo, es recomendable el consumo de atún y otros pescados azules en caso de enfermedades cardiovasculares³⁹.

La investigación científica en el tema de autenticación de alimentos, va íntimamente ligada a la identificación de especies, con la implementación de protocolos de análisis de productos alimenticios, es decir, análisis de proteínas, el análisis de DNA; verificando de esa forma que cuentan con la calidad establecida de acuerdo a su etiquetado³⁰.

La molécula de ADN es una molécula biológica extremadamente estable y de larga vida. Tiene la característica de ser específica de las especies, es decir, muestra variabilidad en su configuración inter e, incluso, intra-específica, por la simple mutación en una sola base. Esta característica es lo que hace al análisis de esta molécula, una herramienta muy sensible para la autenticidad en los productos de alimentos procesados³⁰.

JUSTIFICACIÓN

La pesca de atún es una actividad de gran importancia en México: en 2010 representó 8% del volumen total de la producción pesquera nacional y el país fue duodécimo productor de atún en el mundo. No obstante, sólo 4% del volumen de túnidos se exportó⁴⁷.

En 2012, la Organización Mundial del Comercio decidió, después de examinar plenamente toda la evidencia científica y empírica, que las normas para atún “Dolphin-safe” (delfín seguro) establecidas por el Congreso en 1990, aunque fueron eficaces en motivar un cambio en ese momento, son ahora anticuadas y, de hecho, engañosas para los consumidores de E.U. La realidad es que la ley de E.U. y su política “dolphin-safe” SOLAMENTE certifica que no se perjudicaron delfines si el atún fue capturado en la pesquería del POT (Océano Pacífico Tropical). Determinó que aun cuando miles de delfines mueren durante la pesca de atún fuera del POT, el atún enlatado lleva la etiqueta “dolphin-safe” bajo las normas actuales de etiquetado¹².

México solicitó el establecimiento de un grupo especial en febrero de 1991. Un cierto número de países “intermediarios” manifestaron también su interés. El grupo especial presentó su informe a los miembros del GATT (Acuerdo General sobre Aranceles Aduaneros y Comercio) en septiembre de 1991. En él llegaba a las siguientes conclusiones: los Estados Unidos no pueden imponer un embargo de las importaciones de productos del atún procedentes de México por el simple motivo de que los reglamentos mexicanos sobre la forma en que se produce el atún no respeten los reglamentos estadounidenses. (Pero los Estados Unidos pueden reglamentar la calidad o el contenido del atún importado.) Esta cuestión plantea así un caso de “producto” contra “proceso”, las normas del GATT no permiten que un país adopte medidas comerciales con el fin de intentar que se cumpla su legislación interna en otro país, ni siquiera para proteger la salud de los animales o conservar recursos naturales agotables. Se trata de la “extraterritorialidad”³⁴.

Un tribunal de la Organización Mundial de Comercio (OMC) resolvió que los requisitos de etiquetado impuestos por Estados Unidos (E.U.) a las importaciones de atún mexicano, violan las normas que regulan los flujos comerciales internacionales¹³.

La resolución de la OMC determinó que el sello Dolphin safe, otorgado por el gobierno estadounidense con el objetivo de proteger la vida de los delfines, se les ha negado a los pescadores mexicanos de manera discriminatoria. Si bien el atún procesado mexicano puede ser exportado a E.U. y venderse ahí en pequeñas tiendas enfocadas principalmente al mercado latino, ninguna de las grandes cadenas minoristas de ese país lo coloca en sus anaqueles, argumentando que no porta el sello Dolphin safe¹³.

Los barcos atuneros mexicanos son regulados bajo un programa de la Comisión Interamericana del Atún Tropical (CIAT), a la cual pertenecen Estados Unidos y México, además de otros 15 países, la Unión Europea y Taiwán, entre otras medidas, utilizan buzos para sacar a delfines que se lleguen a quedar atrapados y están obligados a llevar observadores independientes para verificar maniobras de protección al cetáceo¹³.

Según estadísticas de la CIAT, las muertes de delfines por la flota mexicana han llegado prácticamente a cero, puesto que por cada lance de red hay una media de mortandad de 0.10 delfines (cuyas especies involucradas no están en peligro de extinción)¹³.

El panel encontró también que los atunes capturados en otras partes del mundo califican para obtener la etiqueta Dolphin safe en EU, aunque hay evidencia de que las actividades de algunos pescadores en esas zonas sí tienen un efecto dañino¹³.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1 ASOCIACIÓN ATÚN – DELFÍN

La naturaleza de la asociación atún-mamífero marino no se conoce con precisión. Sin embargo, este comportamiento que lleva a cabo el atún y los mamíferos marinos, principalmente el delfín, ha sido de gran ayuda para las pesquerías atuneras del Océano Pacífico Oriental Tropical (OPO); siendo el mamífero marino una guía para la localización y obtención de cardúmenes de atún. Se ha propuesto, que los escómbridos son los que buscan a los mamíferos marinos en función de su capacidad fisiológica de viajar a grandes velocidades; dado que los atunes que se encuentran asociados son de gran tamaños y sexualmente maduros, la asociación con objetos flotantes por parte de los atunes juveniles, es el precursor⁴⁹.

Se ha propuesto que la asociación biológica se realiza en función de la capacidad de obtención de alimento por parte de los mamíferos marinos, lo cual es una ventaja para los atunes. Sin embargo, los estudios han demostrado que solo el delfín manchado y el atún aleta amarilla, presentan un traslape de dietas. Con otras especies como el delfín común o tornillo existe una diferencia en cuanto a horario y profundidad de alimentación⁴⁹.

Especies como el delfín manchado (*Stenella attenuata*), (Figura 1), el delfín tornillo (*Stenella longirostris*) (Figura 2) y el delfín listado (*Stenella coeruleoalba*), así como el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), son las principales especies que participan en la asociación atún- mamífero marino en el OPO. Una característica de ellas es que son cosmopolitas, por lo que son especies que se puede llegar a encontrar en otros cuerpos marinos como el Océano Atlántico, Océano Índico, Océano Pacífico Occidental, Mar Mediterráneo, Mar Adriático y en el Mar Caribe, por lo cual esta relación biológica no es exclusiva de OPO, pero si donde se encuentra con más frecuencia⁴⁹.

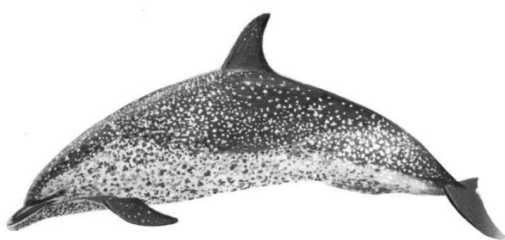


Figura 1. Delfín Manchado del atlántico

Fuente: Jefferson et al 1993

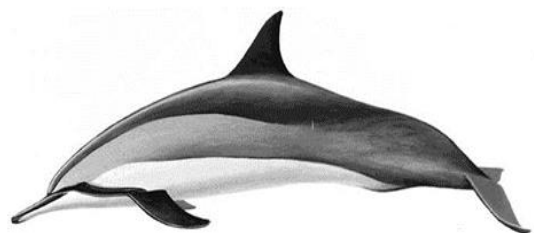


Figura 2. Delfín tornillo

Fuente: Carpenter, 2002

1.2 ETIQUETADO DOLPHIN SAFE

En 1990, mismo año en que se proclamó el segundo embargo atunero hacia México, la etiqueta “Dolphin safe” (Figura 3) emergió en Estados Unidos, a través de las empresas Starkist, Bumble Bee y Vam camp. Teniendo como objetivo, eliminar la competencia (Latinoamérica) en la pesca de atún y asumiendo una convicción en la que la venta, compra y producción, no se realizarían si se encuentra alguna muerte incidental y/o heridas graves al delfín en la pesca de atún⁴⁰, dicha etiqueta empezó ofreciendo una idea

errónea al consumidor, el cuál conceptúa que Dolphin safe, significa que la lata de atún comprada, está libre de carne de delfín. Teniendo una gran diferencia con la definición de Dolphin safe: un barco atunero que captura una cantidad específica de atún a través de diversos lances en el OPO (Océano Pacífico Oriental), y en uno de ellos se encierra uno o varios delfines, sin importar si son o no liberados con vida más tarde, esa cantidad obtenida ya no puede adquirir la etiqueta Dolphin safe. Pero si el mismo barco con las mismas cifras, lleva a cabo acciones de pesca en otros océanos, el atún capturado es Dolphin safe⁷.

El Congreso de Estados Unidos tomó esta etiqueta como una medida más para la protección de los mamíferos marinos e incluyó la Ley de Información al Consumidor para la Protección del Delfín, en donde todo atún enlatado ofrecido a los consumidores, debía tener un certificado impreso en su etiqueta con la leyenda: Dolphin safe. Este certificado debe ser expedido por la CIAT o por algún organismo comparable que aseguren que los lances efectuados por el barco atunero, no fueron sobre delfines, independientemente si hay o no mortalidad. México es uno de los países que lleva a cabo la mayoría de su pesquería atunera con red de cerco sobre delfines; por ser la opción ecológicamente más apropiada y la más rentable. Ocasionó así, un gran impedimento a la entrada de atún mexicano a Estados Unidos y el descenso de las exportaciones hasta poco más de 20 mil toneladas registradas en 1993⁴⁹.

Todo este proceso de etiquetado, fue iniciado y apoyado por varios grupos ecologistas estadounidenses, principalmente el Earth Island Institute, dado que es el que recibe todas las regalías que se obtienen por el etiquetado de cada 48 latas de atún en Estados Unidos. Cada lata, para obtener la etiqueta Dolphin safe, necesita pagar un total de cinco centavos de dólar¹⁵. Para dichos grupos ecologistas, el hecho de mantener encerrados a los mamíferos marinos en la red, ocasiona una disminución en la reproducción de los organismos, ya que el stress provocado tiene efectos en su función reproductiva y alimentaria. Este argumento fue utilizado para la imposición de la etiqueta Dolphin safe³⁶.



Figura 3. Etiqueta Dolphin Safe

Fuente: Páez, R. 1997

1.3 LEY DE PROTECCIÓN DE LOS MAMÍFEROS MARINOS

La Ley de los Estados Unidos de Protección de los Mamíferos Marinos contiene medidas de protección de los delfines que deben cumplir tanto su flota pesquera como los países cuyos barcos pesquen atún aleta amarilla en esa parte del Océano Pacífico. Si un país exporta atún a los Estados Unidos y no puede demostrar a las autoridades estadounidenses que ha cumplido las normas de protección del delfín que establece la

propia legislación estadounidense, el Gobierno dicta el embargo de todas las importaciones de pescado procedentes de ese país³⁴.

- Prohibía el hostigamiento, la caza, la captura o la matanza de mamíferos marinos, o la tentativa de estos actos, y su importación a los Estados Unidos sin autorización expresa.
- Regulaba la captura de mamíferos marinos atrapados incidentalmente en las redes de los pescadores de atún aleta amarilla en el Pacífico tropical oriental, una zona donde se sabe que los delfines nadan por encima de los bancos de atunes.

La ley equivalía a prohibir la importación comercial de pescado o de productos del pescado capturado con técnicas de pesca comercial que provocaban que las muertes y las heridas graves incidentales de mamíferos marinos fueran superiores a las establecidas por las normas estadounidenses³⁴.

A nivel federal existen varias regulaciones en la materia, incluidas la Ley de Sanidad Animal, la Ley General de Vida Silvestre y la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, en especial y más significativa respecto al tema describe la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo)⁴³.

Esta Norma Oficial Mexicana tiene por objeto identificar las especies o poblaciones de flora y fauna silvestres en riesgo en la República Mexicana, mediante la integración de las listas correspondientes, así como establecer los criterios de inclusión, exclusión o cambio de categoría de riesgo para las especies o poblaciones, mediante un método de evaluación de su riesgo de extinción y es de observancia obligatoria en todo el Territorio Nacional, para las personas físicas o morales que promuevan la inclusión, exclusión o cambio de las especies o poblaciones silvestres en alguna de las categorías de riesgo, establecidas por esta Norma⁴³.

En casi todos los Países y en algunos Estados de la República Mexicana, se han promulgado disposiciones al respecto que son de interés público y buscan dar protección a los animales domésticos y silvestres, sancionando severamente a quienes se apartan del cumplimiento de las normas que los protegen para que de esta forma se logre erradicar el maltrato y actos de crueldad contra estos seres vivientes irracionales²⁵.

Brindando protección a los animales de las siguientes especificaciones²⁵.

- I. Bovino, Caprino, Porcino, Canino, Felino, Lanar, Caballar, Asnal, Batracios, **Peces**, Aves.
- II. Especies en exhibición en circos o Zoológicos.
- III. Los animales silvestres que no sean nocivos al hombre.

El objetivo se orientará a²⁵:

- Proteger y regular el crecimiento, vida y sacrificio de las especies de animales útiles al ser humano o que su existencia no lo perjudique.
- Promover su aprovechamiento y uso racional.

- Erradicar y sancionar el maltrato y actos de crueldad.
- Fomentar el amor, respeto y consideración para con ellos.
- Coadyuvar en el cumplimiento de las disposiciones establecidas en los planes ecológicos del Estado, y apoyar la creación y funcionamiento de sociedades protectoras de animales, otorgándoles facilidades para sus fines.

1.4 PESCADO

El término pescado se aplica a los peces que han sido extraídos de su medio natural, generalmente para ser utilizados como alimento¹.

Clasificación según el contenido de grasa¹:

- El pescado blanco tiene un bajo contenido en grasas. En este grupo se encuentran: abadejo, bacalao, lenguado y raya.
- El pescado azul tiene un alto contenido en grasas, como por ejemplo la anguila, atún, boquerón, pez espada, salmón, sardina y sargo.
- Semigrasos: Con un contenido de grasa entre el 2 y el 5%. Este grupo incluye: Besugo, breca, cabracho, carpa, congrio, dorada, rape, rodaballo y trucha.

1.4.1 PESCADO EN CONSERVA

Pescado en conserva, producto alimenticio elaborado de las especies comestibles con pescados frescos y limpios, libres de cabeza y branquias, eviscerados y con tratamiento térmico antes y después de colocarse en envases sanitarios herméticamente cerrados y sometidos a proceso de esterilización comercial que asegure su conservación⁴⁵.

1.5 ATÚN

1.5.1 ATÚN ALETA AMARILLA

Atún aleta amarilla *T. albacares* (Figura 4), pertenece a la familia *Scombridae*, la cual está compuesta por 15 géneros y aproximadamente 53 especies. Estas conforman la mayoría de los peces epipelágicos marinos. La familia *Scombridae* se divide en dos subfamilias¹⁰.

- *Gasterochismatinae* (representada por una sola especie, *Gasterochisma melampus*) y la subfamilia.
- *Sombrean*, a la que pertenecen todos los atunes. Muchas especies de esta familia poseen una vejiga natatoria rudimentaria o ha desaparecido, lo que obliga a estos peces a estar en movimiento continuo para mantenerse a cierta profundidad.

La Tribu de los atunes propiamente dichos, incluye a cuatro géneros con una característica única entre los peces teleósteos. Poseen un sistema de contracorriente de intercambio de calor entre venas y arterias, para retener el calor metabólico que hace que el pez tenga una temperatura más alta que el agua circundante⁸.



Figura 4. El atún aleta amarilla (*T. albacares*)

Fuente: DOF - Diario Oficial de la Federación. 2017

1.5.2 ÁMBITO GEOGRÁFICO

La distribución de los túnidos es muy amplia, cubren prácticamente todos los mares y océanos de aguas cálidas y templadas, clasificándose como altamente migratorios³.

La pesca de este grupo se ha llevado a cabo en aguas tropicales y subtropicales de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico, y ausente en el Mar Mediterráneo¹⁰.

En el Golfo de México la pesca de atún aleta amarilla (*T. albacares*) (Figura 4) con palangre se realiza en aguas oceánicas, frecuentemente en áreas cercanas a la plataforma y talud continental (Figura 5.)¹⁰.

Su aprovechamiento en el Golfo de México se realiza por dos flotas, una pertenece a los Estados Unidos de Norteamérica y la otra a México¹⁶. La actividad de la flota mexicana se ha limitado a la ZEEM (Zona Económica Exclusiva de México) del Golfo de México con incursiones esporádicas en la ZEEM del Mar Caribe a fines de los años ochenta y principios de los noventa. En general la zona de operación de la flota mexicana se delimita por los 18° 30' y 25° 00' latitud norte y de los -89° 00 a -97° 00' longitud oeste¹⁰.

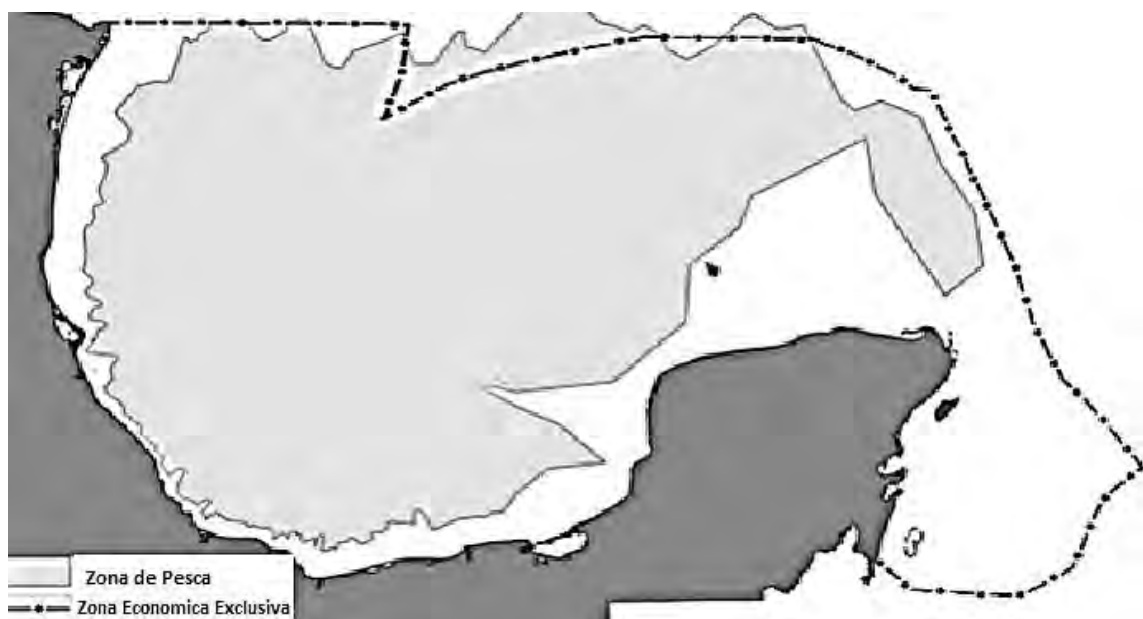


Figura 5. Zona de pesca del atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) en el Golfo de México

Fuente: DOF - Diario Oficial de la Federación. 2017

1.5.3 INICIO DE LA PESCA DE ATÚN

En México, la actividad atunera comenzó a principios del siglo XX, pescadores portugueses operaban cerca de las costas de California en EU y en Baja California, pero el producto era procesado en San Pedro, California, EU. En 1925 comenzó, en Ensenada, el enlatado de atún; las empacadoras “Planta Nacional de Productos Marinos” y “Compañía de Productos Marinos S.A.”, de Cabo San Lucas, fueron las pioneras en este negocio⁴⁸.

1.5.4 CAPTURA

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) puso en marcha un Plan de Manejo Pesquero (PMP) para el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) que se produce en aguas nacionales del océano Pacífico con el objetivo de propiciar el aprovechamiento sustentable (Figura 6) de este recurso, el cual genera una derrama económica superior a los mil 200 millones de pesos¹⁹.

Muchas veces, para aumentar la productividad en estos cuerpos de agua interiores se siembran peces u otros organismos acuáticos (como trucha, lobina, bagre, camarón y langostino), que se producen mediante la acuicultura, actividad que destaca en Veracruz, Hidalgo, Sonora y Tabasco⁹.

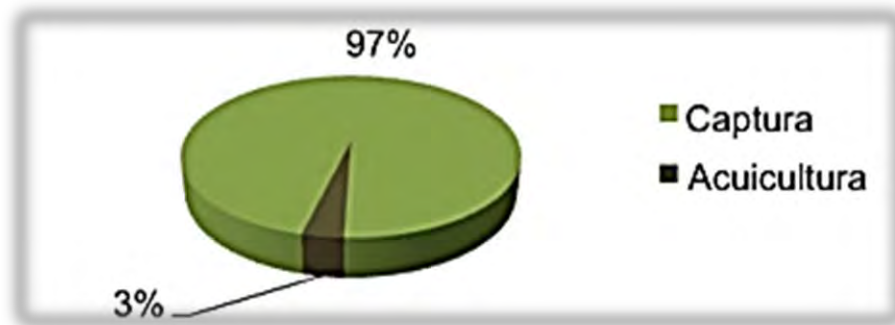


Figura 6. Gráfica de la producción total de atún en 2011

Fuente: Gbcbiotech.com.2016

La actividad de estos ranchos comenzó en México en el año 1994, específicamente en la Isla de Cedros en Ensenada, Baja California. Durante la época permitida de captura se seleccionan organismos de más de 12 kg (que corresponden aproximadamente a peces de 2 años de edad), los cuales son llevados a los ranchos atuneros (Figura 8) ubicados en Baja California y Baja California Sur para engordarlos dentro de jaulas flotantes. Los organismos obtenidos de esta forma tienen una sobrevivencia del 95%, y el tiempo que dura la engorda es de 7-6 meses, siendo cosechados cuando alcanzan pesos de 35-45 kg. La tendencia dentro de esta actividad es convertir la engorda de atún en una industria biotecnológica completa, para no depender de los juveniles de atún de las poblaciones naturales marinas. Sin embargo, este tipo de práctica aún no contribuye con un volumen importante a la producción total de atún, por lo que la mayoría del volumen sigue siendo obtenido mediante la captura (Figura 7)¹⁶.



Figura 7. Pesca (Artesanal)

Fuente: *Cuentame.inegi.org.mx.2016*



Figura 8. Ranchos atuneros

Fuente: *Gbcbiotech.com. 2016*

1.5.5 MEDIDAS PARA LA PROTECCIÓN DEL DELFÍN EN LA CAPTURA DEL ATÚN

Las modificaciones establecían niveles máximos de mortalidad de mamíferos marinos observados por personal de la Comisión Interamericana del Atún Tropical (CIAT) o del programa de protección estadounidense. Cada nación que no cumpliera con este supuesto, se le impondría un primer embargo (primario) que consistía en prohibir la importación de atún y sus productos a Estados Unidos. Si dentro de los 90 días posteriores a la fecha del embargo, no se cambiaban los niveles máximos de mortalidad, se impondría un segundo embargo (secundario) a naciones intermediarias, las cuáles sino prohibían las importaciones en 60 días, del país con embargo primario, se embargaría dicha nación (secundario). Y si cada nación embargada, no cambiaba sus reglas de pesca dentro de los 6 meses posteriores al primer embargo, el bloqueo comercial se extendería a todos los productos de pesca²².

Por consiguiente, el Gobierno Mexicano tuvo que implantar medidas internas para la protección de los mamíferos marinos (Figura 9)⁴⁰.

- Se prohíbe la pesca nocturna y con explosivos
- Se sancionaría con prisión a todos aquellos que no respetarán las vedas y realizarán capturas de mamíferos marinos por negligencia o conscientemente.
- Se impuso el uso del Paño Medina (tela que tiene como objetivo cerrar las mallas y evitar que los mamíferos marinos queden atorados en la red) y la maniobra de retroceso (que consiste en: después de lanzar la red, dar marcha atrás para que de esa manera se forme un canal por el que los mamíferos marinos salgan con la ayuda de los pescadores) en todo buque atunero (Figura 9).
- Se colocaron observadores internacionales en cada flota.
- Se realizó una revisión de métodos y artes de pesca en operación con el objetivo de conservar la diversidad biológica y obtener el máximo rendimiento sostenible. Por lo que se creó el Programa Nacional para el Aprovechamiento del Atún y de Protección de Delfines en 1991.

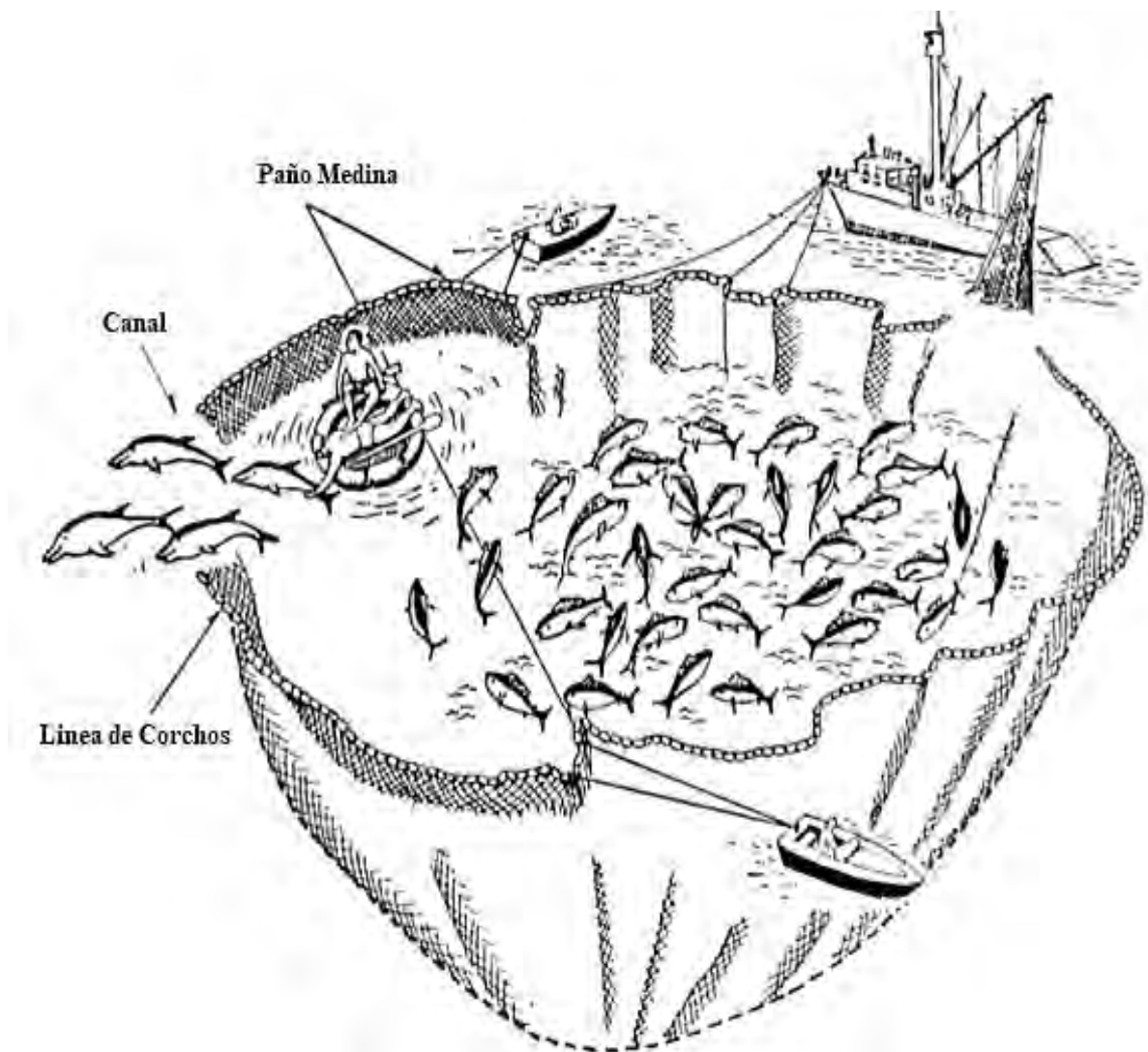





Figura 9. Imagen representativa del paño medina y la maniobra de retroceso

Fuente: Modificado de SEMARNAT

1.5.6 COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL

En el Cuadro 1, se establece una comparación de la composición nutrimental del atún natural (sin procesar y las presentaciones de atún enlatado (en agua y en aceite)².

Cuadro 1. Composición Nutrimental del atún natural y atún enlatado

NUTRIENTES	ATÚN NATURAL	ATÚN ENLATADO EN AGUA	ATÚN ENLATADO EN ACEITE
			
CALORÍAS	226 kcal.	99,40 kcal.	208 kcal.
GRASA	15.50 g.	0.60 g.	12.10 g.
COLESTEROL	48 mg.	51 mg.	39.80 mg.
SODIO	43 mg.	320 mg.	291 mg.
CARBOHIDRATOS	0 g.	0 g.	0 g.
FIBRA	0 g.	0 g.	0 g.
AZÚCARES	0 g.	0 g.	0 g.
PROTEÍNAS	21.50 g.	23.50 g.	24.80 g.
VITAMINA A	60 µg.	60 µg.	62,20 µg.
VITAMINA C	0 mg.	0 mg.	0 mg.
VITAMINA B12	124.30 µg.	4 µg.	5 µg.
CALCIO	40 mg.	28 mg.	27.70 mg.
HIERRO	1 mg.	1 mg.	1.20 mg.
VITAMINA B3	17.05 mg.	18.78 mg.	18.20 mg.

Fuente: Atún - Propiedades del atún.2017

1.5.7 VALOR NUTRIMENTAL

El atún es un alimento rico en proteínas; contiene pocas grasas y es fuente importante de vitaminas –entre las que destacan las A, D y las del grupo B y de minerales como yodo, fósforo, hierro, magnesio y potasio, entre otros⁴¹.

1.5.8 BENEFICIOS DEL ATÚN

La abundancia de yodo que se puede encontrar en este pescado, es beneficiosa para nuestro metabolismo, regulando nuestro nivel de energía y el correcto funcionamiento de las células. Además, el yodo del atún, ayuda a cuidarnos por dentro, regulando nuestro colesterol. Al ser un alimento rico en yodo, también ayuda a procesar los hidratos de carbono, fortalecer el cabello, la piel y las uñas².

El alto contenido de vitamina B3 del atún, hace que sea un alimento beneficioso para el sistema circulatorio. Además, la vitamina B3 o niacina puede ayudar a reducir el colesterol. Por su alto contenido en vitamina B3, este pescado es recomendable para combatir enfermedades como la diabetes y la artritis².

1.5.9 PRESENTACIONES DE ATÚN ENLATADO

La presentación debe declararse en la etiqueta como se muestra en la Figura 10 y cumplir con las siguientes especificaciones⁴¹.

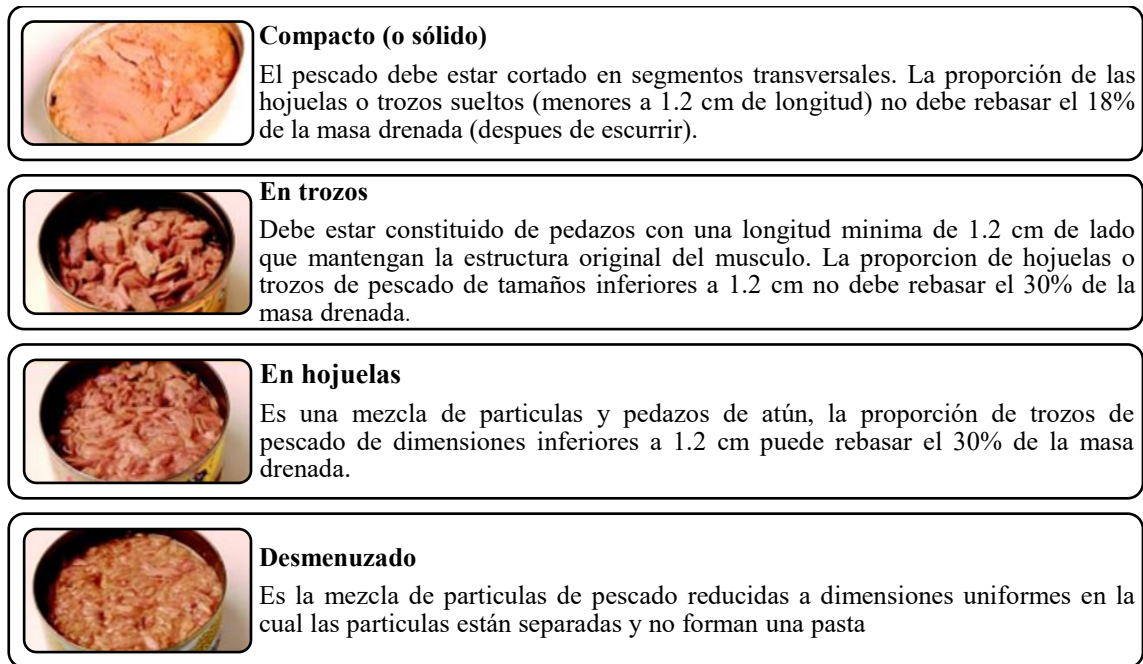


Figura 10. Presentaciones de atún enlatado

Fuente: PROFECO. gob.2016

1.6 FACTORES ECONÓMICOS

1.6.1 ECONOMÍA DE LA PESCA

La mayor producción proviene del mar, donde cada país tiene una zona económica exclusiva para navegar y pescar, de 370.4 km (200 millas náuticas) de extensión de la costa hacia mar adentro. Fuera de ese límite, la captura de especies marinas es libre, pues se consideran aguas internacionales⁹.

1.6.2 VOLUMEN DE PESCA EN TONELADAS AÑO

En la Figura 11, se observa que México ocupa el 4º lugar por su volumen de pesca, en comparación con los países del continente americano que cuentan con litorales⁹.

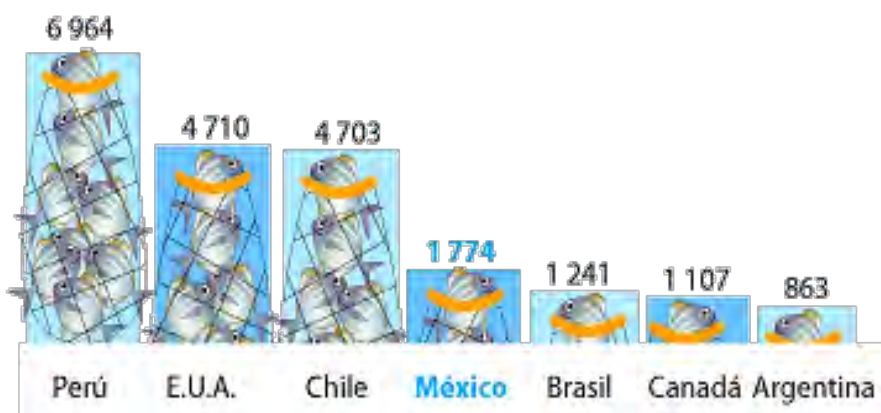


Figura 11. Volumen de la Pesca

Fuente: Cuentame.inegi.org.mx.2016

1.6.3 LITORALES DE MÉXICO

México tiene 11,122 kilómetros de litorales, como se representa en la Figura 12, que significan un gran potencial de recursos pesqueros; sin embargo, la actividad pesquera no está lo suficientemente desarrollada⁹.








Figura 12. Litorales de México

Fuente: Cuentame.inegi.org.mx.2016

Al 2010, las especies que más se exportan son en orden de importancia: sardina, camarón y langostino y atún de aleta amarilla⁹.

La pesca en ríos, lagos, lagunas, presas y esteros es menos representativa que la de mar, pero de gran valor para algunas regiones de México por su aportación alimentaria y económica; En el 2010, en el Cuadro 2 se muestran las cinco principales especies que más se pescaron⁹:

Cuadro 2. Principales especies del mar que más se pescan en México

Espece	Imagen	Toneladas Extraídas
Sardina		872 640
Camarón		196 456
Túnidos (atún, bonito y barrilete)		129 420
Mojarra		77 009
Ostión		42 250

Fuente: Cuentame.inegi.org.mx; 2016

El atún que se captura en los litorales mexicanos (Figura 13) está considerado como una especie marina de exquisito sabor y valiosas propiedades nutrimentales. De todas las especies de túnidos que se pescan en México, la más representativa es el atún aleta amarilla, que anualmente llega a representar hasta el 90% del total de esta pesquería¹⁶, Los litorales de Sinaloa tienen las condiciones geográficas idóneas para la producción del atún³³.



Figura 13. Litorales, potencial productivo de atún

Fuente: Nube.siap.gob.mx. 2016

1.6.4 PRODUCCIÓN NACIONAL

1.6.4.1 PRODUCCIÓN NACIONAL DE ATÚN

Los principales estados productores son Sinaloa que en 2014 – 2015, concentró casi el 60% de la producción nacional, estimada en 68 mil 975 toneladas de pescado vivo, seguido por Colima con 24 mil 932 toneladas y Chiapas con 19 mil 730 toneladas (Figura 14)³³.

Rank	Entidad federativa	Volumen (toneladas)	Variación (%) 2014-2015
	Total nacional	129,937	-20.0
1	Sinaloa	68,975	-25.1
2	Colima	24,932	0.5
3	Chiapas	19,730	-22.6
4	Baja California	11,295	-25.4
5	Veracruz	1,257	-6.9
6	Baja California Sur	1,171	-23.0
7	Nayarit	1,098	142.0
8	Oaxaca	1,088	2.0
9	Guerrero	265	13.2
10	Jalisco	94	-51.7
	Resto	32	-69.3

Figura 14. Volumen de producción, principales entidades productoras

Fuente: Nube.siap.gob.mx.2016

La producción de atún en 2015 resultó 20% menor a la del periodo previo, principalmente por la menor captura en Sinaloa, Baja California y Chiapas (Figura 15)³³.

Más de la mitad de este valioso pez se captura en aguas sinaloenses; su valor en el mercado aportó 743 millones de pesos en 2015, aunque Colima obtiene el mayor valor por la venta de la especie³³.



Figura 15. Porcentaje del valor de la producción por entidad federativa

Fuente: Nube.siap.gob.mx. 2016

La Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA) reporta que las diferentes especies de túnidos son la tercera producción pesquera más importante de México, que en 2014 tuvo un crecimiento de 20% respecto al año anterior, al superar las 162 mil toneladas de peso vivo (Figura 16)³³.

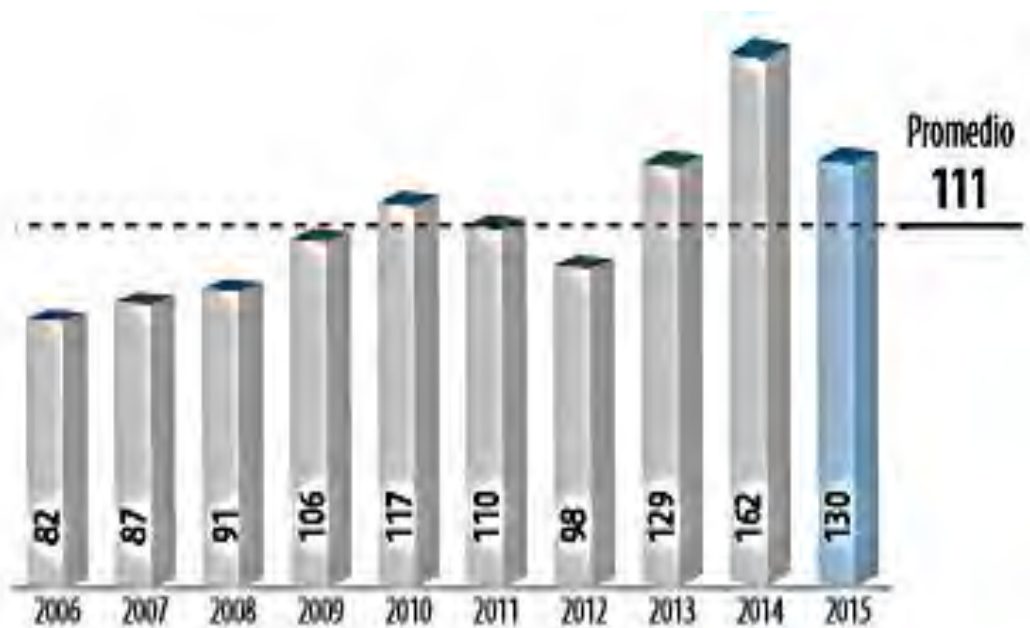


Figura 16. Volumen de la producción nacional 2006 – 2015

Fuente: Nube.siap.gob.mx. 2016

La flota atunera del puerto de Ensenada fue creciendo en número, tecnología y capacidad, por lo que se inició su desplazamiento hacia el sur y el oeste. Así se empezó a capturar, mediante el uso de la red de cerco, a otros túnidos, en particular el atún aleta amarilla y el barrilete, cuyo destino principal era el enlatado para consumo humano¹⁶.

El atún ocupa el cuarto lugar de la producción pesquera total de México, y en cuanto a su valor económico ocupa el segundo lugar. En el Cuadro 3 se presenta la lista de las especies de atún (Figura 17) que son capturadas en el país¹⁶.

Cuadro 3. Especies de atún presentes en México

Nombre común	Nombre científico	Tipo de producción
Atún aleta amarilla	<i>Thunnus albacares</i>	Captura
Atún aleta azul	<i>Thunnus thynnus</i>	Captura y cultivo
Atún patudo	<i>Thunnus obesus</i>	Captura
Albacora	<i>Thunnus alalunga</i>	Captura
Atún aleta negra	<i>Thunnus atlanticus</i>	Captura
Barrilete	<i>Katsuwonus elamis</i>	Captura
Barrilete negro	<i>Euthynnus lineatus</i>	Captura
Bonito	<i>Sarda orientalis</i> y <i>S. chiliensis</i>	Captura

Fuente: Gbcbiotech.com. 2016



Figura 17. Especies de Atún que se pescan en México. a) Atún aleta amarilla, b) Atún aleta azul, c) atún patudo, d) Albacora, e) Atún aleta negra, f) Barrilete, g) Bonito, h) Barrilete negro

Fuente: IBT.unam.mx

1.6.4.2 PRODUCCIÓN INTERNACIONAL

El atún y las especies afines tienen una gran importancia económica y son una fuente significativa de alimentos. Comprenden alrededor de 40 especies presentes en el Atlántico, el océano Índico y el Pacífico, así como en el Mediterráneo. La producción mundial de estas especies ha crecido constantemente desde menos de 0,6 millones de toneladas en 1950 a más de 6 millones de toneladas hoy en día, como se representa en el Cuadro 3 la producción de las especies más comerciales de atún¹⁴.

Las denominadas especies comerciales de atún son las más importantes de las especies de atún y afines, desde el punto de vista del peso a la captura y el valor económico. Se desembarcan en numerosos lugares de todo el mundo, se venden casi en todo el planeta y se elabora y consume en muchos lugares. En 2010 la captura fue de casi 4 millones de

toneladas, lo que representa un 66% del total de la captura de especies de atún y especies afines. Casi todas las capturas de las principales especies comerciales de atún se llevan a cabo en el Pacífico (70.5% del total de la captura de las principales especies comerciales en 2010), y el océano Índico produce mucho más (19.5% en 2010) que el Atlántico y el Mediterráneo (10.0% en 2010)¹⁴.

1.6.5 PRODUCCIÓN NACIONAL DE ATÚN ENLATADO

1.6.5.1 CONSUMO POBLACIONAL

El atún es uno de los pescados azules más consumidos en nuestro país, es recomendable el consumo de atún y otros pescados azules en caso de enfermedades cardiovasculares. El atún es el pescado habitual en la dieta que posee más contenido en proteínas de alto valor biológico (23 gramos por 100 gramos), superior incluso a las carnes³⁹.

En la República Mexicana el principal consumo del atún se hace por sus presentaciones enlatadas, en 95% de los casos, con un consumo promedio de 7 latas o 1.2kg al año por familia (Figura 18), reportó CONAPESCA en 2015²⁹.



Figura 18. Consumo anual per cápita

Fuente: Nube.siap.gob.mx. 2016

1.6.6 IMPORTACIÓN Y EXPORTACIÓN

1.6.6.1 MERCADO DEL ATÚN

A nivel mundial, México se encuentra en el lugar número 6 en cuanto a la producción de atún, como se presenta en la Figura 19. La industria atunera mexicana ha sufrido dos embargos por parte de Estados Unidos, lo que hizo que se buscaran nuevos mercados como el europeo y el asiático¹⁶.



Figura 19. Ranking mundial, producción de atún

Fuente: Nube.siap.gob.mx. 2016

Actualmente el atún mexicano tiene una gran demanda, sobre todo en países asiáticos, el 19% de la producción nacional del bien pesquero se exportó, principalmente a Japón, Italia y Tailandia son mercados atractivos para la venta del atún mexicano (Figura 20)³³.



Figura 20. Origen – destino comercial del atún en México

Fuente: Nube.siap.gob.mx. 2016

El atún se consume fresco o congelado, entero, enlatado, seco o salado (Figura 21).



Figura 21. Diversas presentaciones de atún que existen el mercado

Fuente: Gbcbiotech.com. 2016

Cabe destacar que el atún es la principal especie enlatada en México¹⁶ y su balanza comercial para 2011 fue superior a 323 millones de dólares (Figura 22), la disminución de la captura nacional de atún en 2015 provocó una caída en el volumen que México exporta, a la vez que impulsó el aumento de las importaciones³³.

Evolución del comercio exterior (millones de dólares)

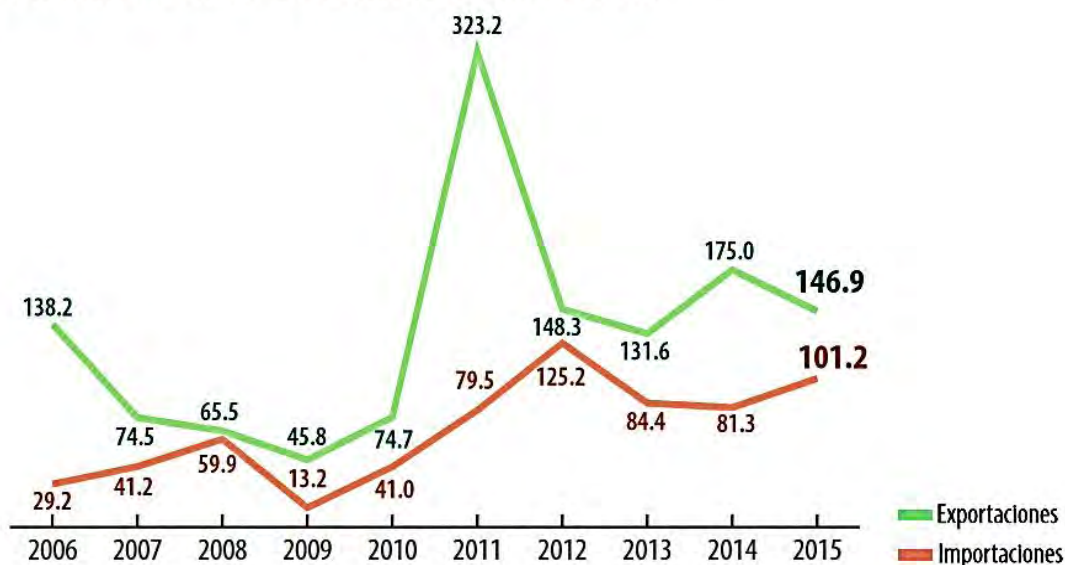


Figura 22. Evolución del comercio exterior de atún

Fuente: Nube.siap.gob.mx. 2016

1.7 AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS

1.7.1 MÉTODOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS

Para prevenir el fraude y el mal etiquetado de los productos alimenticios es necesario poder identificar y cuantificar las especies empleadas en la elaboración de los alimentos procesados. Pero hasta ahora, no había sido posible cuantificar de manera fiable estos constituyentes, debido a su alta susceptibilidad a las condiciones del proceso al que son sometidos. Las nuevas técnicas genéticas, en particular las que se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son muy importantes para desarrollar métodos rutinarios y kits rápidos de análisis²⁰.

El tema de autenticación de alimentos, que va relacionado a la identificación de especies, ha tenido un alto desarrollo en los últimos años con la implementación de protocolos de análisis de alimentos basados en métodos enfocados en las características específicas de las especies, es decir, análisis de proteínas y el análisis de ADN, verificando de esa forma que cuentan con la calidad establecida de acuerdo a su etiquetado.

1.7.1.1 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

El análisis de proteínas de las especies se ha utilizado ampliamente bajo la necesidad de identificar a las especies o distinguir los orígenes del material para consumo humano. Los ensayos se basan en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, tales como tamaño o carga, propiedades que pueden ser reveladas como diferencias en su movilidad electroforética, puntos isoeléctricos o tiempo de elusión cromatográfica. A partir de los resultados obtenidos tras la prueba, se puede comprobar la autenticidad de las especies cuando se compara con un perfil propio de la especie, es decir, la prueba se realiza utilizando a la especie auténtica²⁸.

El análisis de proteínas también se ha utilizado en el área inmunológica para la identificación de especies utilizando anticuerpos que son producidos en contra de un grupo particular de proteínas (proteínas de diagnóstico o antígenos) siguiendo un procedimiento inmunológico estándar, en este caso, el anticuerpo producido es específico para el grupo de proteínas. Por ello, en este ensayo es inespecífico cuando se trata de localizar adulteraciones en los productos por la mezcla de especies no declaradas en la etiqueta. Así mismo, si la proteína ha sufrido desnaturalización, el anticuerpo no es capaz de actuar sobre aquella proteína para la cual fue producido²⁸.

1.7.1.2 ANÁLISIS DE DNA

La molécula de ADN es una molécula biológica extremadamente estable y de larga vida. Tiene la característica de ser específica de las especies, es decir, muestra variabilidad en su configuración inter e, incluso, intra-específica, por la simple mutación en una sola base. Esta característica es lo que hace al análisis de esta molécula, lo más adecuado para la búsqueda de autenticidad en los productos de alimentos procesados³⁰.

La molécula, además, está presente en la mayoría de las células de un organismo, y todas ellas contienen la información idéntica que puede ser obtenida de cualquier muestra de la misma fuente, a pesar del tejido de origen. El ADN puede proveer potencialmente más información que una proteína. La molécula de ADN es más termoestable que muchas proteínas, lo que implica que es menos posible su alteración por el procesamiento de alimentos. Aun cuando llegue a ser degradada durante el tratamiento térmico, es posible obtener fragmentos con diferencias suficientes en la secuencia, que permita diferenciar e identificar a especies cercanamente relacionadas. Si bien es cierto que la molécula de DNA tiende a ser muy estable a bajas temperaturas, cuando el tejido es sometido al proceso de esterilización se degrada rápidamente dejando disponible a la molécula de DNA en fragmentos pequeños. Algunas investigaciones señalan que se han obtenido fragmentos menores de 500 pb. En este sentido, el tipo de tratamiento al que se someten los alimentos a identificar ha sido el principal parámetro para la selección del método adecuado de autenticación^[5, 26 y 28].

1.7.1.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Hay diferentes técnicas que permiten obtener ácidos nucleicos con alto grado de pureza. Las más utilizadas suelen incluir una etapa de ultra centrifugación en gradientes de CsCl o una cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, muchas aplicaciones de laboratorio no necesitan un grado de pureza tal que justifique incluir estas técnicas (laboriosas y/o caras) en los protocolos de purificación. Las etapas del procedimiento que se realizan son las siguientes⁴.

- Desintegración del tejido y solubilización y homogenización de los componentes celulares
- Precipitación de los ácidos nucleicos y disolución en un buffer adecuado

Para la extracción de ADN de las muestras de alimentos se recomienda el protocolo clásico descrito por Sambrook, J. que está basado en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteínasa, extracción de proteínas y polisacáridos con

fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y la precipitación del ADN con etanol, junto con algunas modificaciones⁴⁶.

1.7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es una de las técnicas más conocidas en biología molecular. La replicación de ADN monocatenario de una plantilla utilizando primers sintéticos y una ADN polimerasa 1970^[24 y 38].

La PCR es un proceso bioquímico capaz de amplificar una sola molécula de ADN en millones de copias en poco tiempo. La amplificación se consigue mediante una serie de tres etapas: desnaturalización, hibridación, extensión, estos pasos se repiten ("ciclos") para producir exponencialmente copias exactas del ADN diana, (Figura 26)³⁸.

1.7.2.2 ETAPAS DE LA REACCIÓN

1.7.2.2.1 DESNATURALIZACIÓN

La desnaturalización del ADN es estrictamente requerida para la obtención de hebras simples de la molécula de ADN²⁷.

La desnaturalización se debe tanto a la ruptura de puentes de hidrógeno entre pares de bases, como de las interacciones hidrofóbicas entre bases apiladas al desnaturalizarse, las dos hebras del ADN se separan y pasan a una conformación al azar sin que se altere la estructura primaria, pues no hay rupturas de enlaces covalentes, sin embargo, no puede visualizarse la ruptura de los enlaces hidrofóbicos entre las bases apiladas, aunque si se entiende la separación y ruptura de los puentes de hidrógeno²⁷.

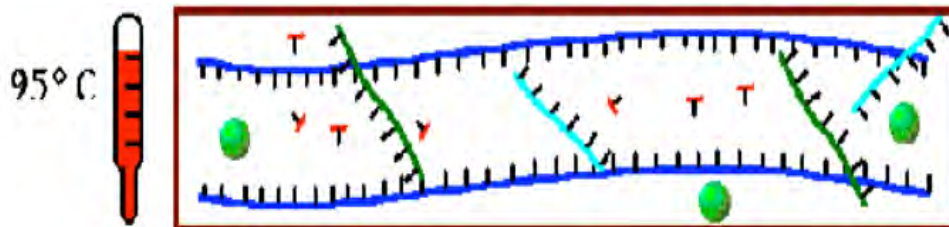


Figura 23. Desnaturalización del ADN

Fuente: IBT.unam.mx

La desnaturalización puede llevarse a cabo por efectos de agentes químicos desnaturalizantes o por calentamiento, que es lo más adecuado para la técnica de PCR, generalmente a temperaturas mayores de 68°C y menores de 97°C, como se muestra en la Figura 23. La temperatura de desnaturalización debe ser superior a la de fusión (T_M) de la región de ADN que se desea amplificar²⁷.

1.7.2.2.2 HIBRIDACIÓN

Se llama así debido a que en esta etapa las hebras sencillas se unen a los oligonucleótidos sintéticos. Esta etapa se asemeja en gran medida al método ya mencionado de hibridación de DNA, aunque en este caso, el ADN se une a una hebra corta (<30 nt) de nucleótidos sintéticos que servirán para iniciar la reacción²⁷.

Esta etapa también se denomina etapa de templado debido a la disminución de temperatura que permite el re asociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica; en inglés, annealing. Los oligonucleótidos (representados por dos cadenas cortas de 3 nucleótidos) se unen a una región específica y complementaria del ADN original en dirección $5' \rightarrow 3'$.²⁷

La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers dependen de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m de los primers. Debido a que las ADN polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los primers puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C . Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C (Figura 24) generan buenos resultados¹⁷.

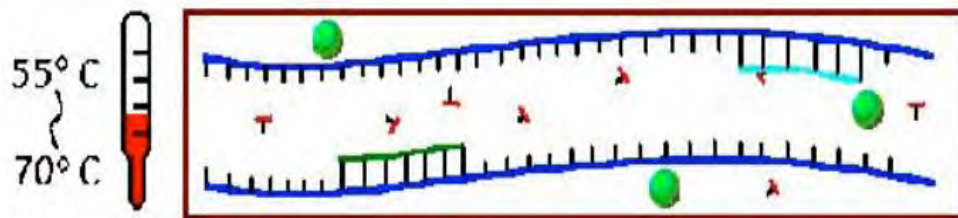


Figura 24. Hibridación del ADN

Fuente: IBT.unam.mx

1.7.2.2.3 ELONGACIÓN (EXTENSIÓN, REPLICACIÓN O POLIMERIZACIÓN)

Esta es la etapa de amplificación dicha, la ADN polimerasa se encarga de elongar, los oligonucleótidos de acuerdo con la hebra sencilla de ADN que en este caso sirve de molde para generar una nueva cadena doble de ADN. Los sustratos de la enzima son los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's)²⁷.

La replicación se lleva a cabo en la dirección $5' \rightarrow 3'$ a partir del extremo $3'$ -OH de cada cebador, hasta terminar la lectura de la plantilla o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización). La enzima ADN polimerasa no ha sido simbolizada, sin embargo, se ha encargado de unir ya algunos dNTP's a la cadena complementaria siguiendo la dirección $5' \rightarrow 3'$ a partir de los cebadores²⁷.

Extensión.

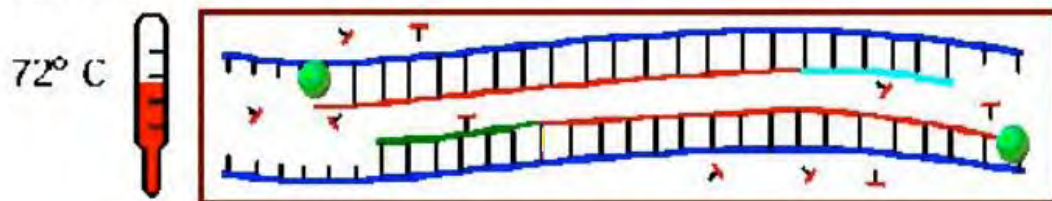


Figura 25. Elongación del ADN

Fuente: IBT.unam.mx

El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del primer se realiza tradicionalmente a 72°C (Figura 25). Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima¹⁹.

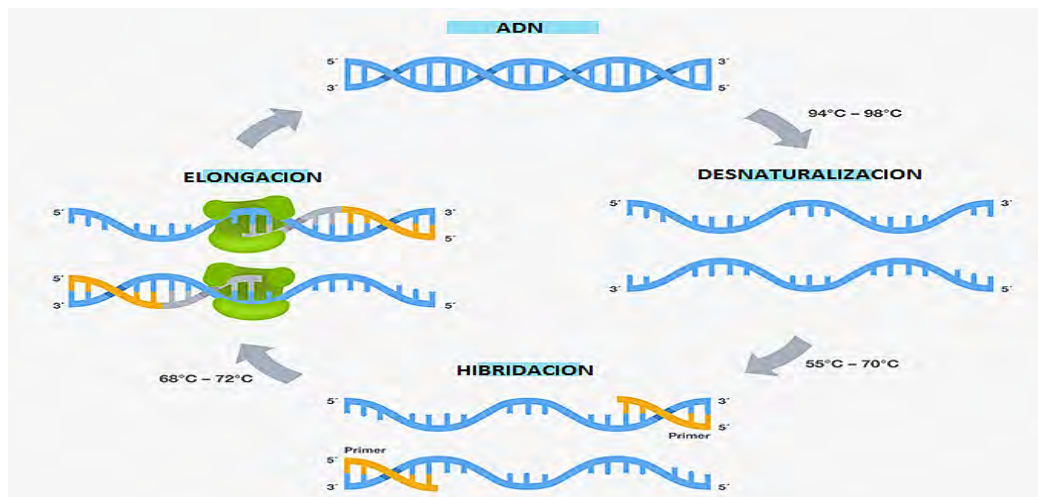


Figura 26. Etapas de la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR)

Fuente: PCR Basics | Thermo Fisher Scientific. 2017

1.7.2.3 COMPONENTES

En función a las etapas antes mencionadas de la reacción de la cadena de polimerasa (PCR), es indispensable conocer los componentes que requiere la reacción para poder llevarla a cabo⁴⁶:

- Los oligonucleótidos o primers específicos para cada una de las especies
- dNTP'S
- La enzima ADN Polimerasa
- El ADN (molde) a amplificar

1.7.2.3.1 OLIGONUCLEOTIDOS

De los tantos factores que influyen la eficiencia y especificidad de la reacción de amplificación, ninguno es más crucial que el diseño de los primers de oligonucleótidos. Estos son moléculas sintéticas de cadena sencilla y de secuencia corta (18 a 30 nucleótidos) cuyas secuencias deben ser complementarias al extremo 3' de cada una de las hebras sencillas del fragmento diana. De este modo, los oligonucleótidos funcionan como cebadores para la replicación del fragmento diana. De acuerdo con lo expuesto, estos oligos determinan la longitud de la plantilla de ADN a amplificar⁴⁶.

El éxito de la reacción, como se expone anteriormente, recae principalmente en un buen diseño de primers, pues la carencia de unión perfecta entre el ADN diana y el extremo 3' del primer puede conducir a un fallo en la PCR. La selección de primers requiere un diseño cuidadoso para la obtención de los productos deseados debido a que tales

primers influyen fuertemente en el éxito o fracaso de la PCR, lo que implica el cumplimiento de características especiales que dependen en gran medida de la secuencia diana por sí misma. Su selección adecuada reflejará el grado de especificidad es éstos ante la especie en cuestión e incluso su correcto desempeño durante la reacción [46 y 50].

La utilización de este protocolo implica el desarrollo de características específicas para la especie a analizar y, sobre todo, el conocimiento previo de la secuencia completa de la especie cuestionada para la selección y diseño de primers apropiados como se ha manejado anteriormente⁵⁰.

Se debe tener presentes los criterios importantes para el diseño y selección de los primers a utilizar para las especies, como se muestra en el Cuadro 4⁴⁶.

Cuadro 4. Diseño de primers: Propiedades de los oligonucleótidos

PROPIEDAD	DISEÑO ÓPTIMO
COMPOSICIÓN DE LAS BASES	El contenido de G+C deberán estar entre 40 y 60% en la secuencia. Las cuatro bases deberán estar distribuidas a lo largo de toda la secuencia.
LONGITUD	La región del primer complementaria a la plantilla de ADN debe ser de 18 a 25 nucleótidos de largo. Así pues, es recomendable que el par de primers sea de la misma longitud o, en todo caso, no rebase una diferencia de 3 nucleótidos.
SECUENCIAS REPETIDAS Y COMPLEMENTARIAS A SÍ MISMAS	No deben presentarse secuencias repetidas en la secuencia invertida (secuencia complementaria) o secuencias complementarias entre primers que sean mayores a 3pb de longitud. Las secuencias de este tipo tienden a formar estructuras tipo horquilla las cuales, si son estables bajo las condiciones de PCR, pueden prevenir efectivamente el annealing del oligonucleótido con su plantilla
COMPLEMENTARIEDAD ENTRE LOS MIEMBROS DE UN PAR DE PRIMERS	Las secuencias terminales en 3' de un primer no deben ser capaces de unirse a cualquier sitio del otro primer. Debido a que los primers se presentan a altas concentraciones en PCR, aun teniendo una débil complementariedad entre ellos permite la formación de híbridos y consecuentemente, la síntesis y amplificación de dímeros de primers. Si se forman prematuramente en la PCR, pueden competir por la ADN polimerasa, primers y nucleótidos, por lo que pueden suprimir a la amplificación de la plantilla de ADN.
LA TEMPERATURA DE FUSIÓN (T _m)	La temperatura de fusión (T _m) calculada para ambos miembros del par de primers no debe de diferir en 5°C o más. La T _m del producto amplificado no debe diferir por más de 10°C con los valores de T _m del par de oligos. Esta propiedad asegura que el producto amplificado será eficientemente desnaturalizado durante cada ciclo de PCR.
LOCALIZACIÓN EN SITIOS DE AMPLIFICACIÓN	Dependiendo del propósito del experimento, la localización de los sitios de amplificación puede estar encerrado por la localización de mutaciones, sitios de restricción, secuencias codificantes o microsatélites.

Fuente: Adaptación de la publicada por Sambrook J. y Russel E. En su libro *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*.

1.7.2.3.2 DESOXINUCLEÓSIDO TRIFOSFATO (dNTP's)

Son nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, es decir, son el sustrato de la enzima ADN polimerasa y serán los componentes de miles de copias del fragmento diana al final de la reacción. Pueden denominarse como dATP's, dTTP's, dGTP's y dCTP's⁵⁰.

1.7.2.3.3. ENZIMA DNA POLIMERASA

La enzima ADN polimerasa se encarga de unir nucleótidos dNTP's a la cadena complementaria a partir del cebador, formando una nueva cadena doble de ADN a partir de una cadena sencilla⁵⁰.

Debido a que las etapas de la reacción involucran temperaturas variables, es requerida una enzima termoestable que, igualmente soporte temperaturas cercanas a los 100°C. Esta característica es la que le permite a la enzima actuar durante varios ciclos sin desactivarse, aunque existe una gran variedad de enzimas, la enzima más empleada es la Taq polimerasa, cuyo nombre se debe a que es procedente de una bacteria llamada *Thermus aquaticus*⁵⁰.

1.7.2.3.4 ADN DIANA

La adición de ADN a la reacción implica su previa extracción de la célula o el tejido y su solubilización en agua. En teoría, si se utilizan las condiciones óptimas en relación con los primers, el número de ciclos aplicados, la concentración del resto de componentes y el volumen de la reacción, -de manera que trabaje al máximo-, entonces debe ser suficiente la adición de una simple cadena de ADN al inicio de la reacción. Es requerida una concentración adecuada para lograr una amplificación adecuada⁴⁶. Si la concentración de ADN es menor, es probable que no se visualice una banda clara en un gel de agarosa, por otro lado, si la concentración es muy alta, la ADN polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de ADN⁵⁰.

La utilización de este protocolo implica el desarrollo de características específicas para la especie a analizar y, sobre todo, el conocimiento previo de la secuencia completa de la especie cuestionada para la selección y diseño de primers apropiados como se ha manejado anteriormente⁵⁰.

1.7.2.4 METODOLOGÍA BÁSICA DE LA PCR

La biotecnología, en un sentido amplio se puede definir como la aplicación de organismos, componentes o sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios. La Ingeniería Genética (I.G.), conocida como tecnología del ADN recombinante in vitro, se caracteriza por su capacidad de cortar y empalmar genes o fragmentos de ADN de organismos distintos, creando nuevas combinaciones no existentes en la Naturaleza, combinaciones que ponemos a trabajar en el interior de una variedad de organismos hospederos, para nuestro provecho. No cabe ninguna duda de que la técnica más revolucionaria de los últimos 15 años ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha dado nuevas alas a la propia Ingeniería genética y a toda la biología molecular. Fue inventada por Kary Mullis a mediados de los años 80¹⁷, para dar un enfoque general de la PCR, en la Figura 27 se representa la metodología general así como los componentes necesarios para la realización de la técnica.

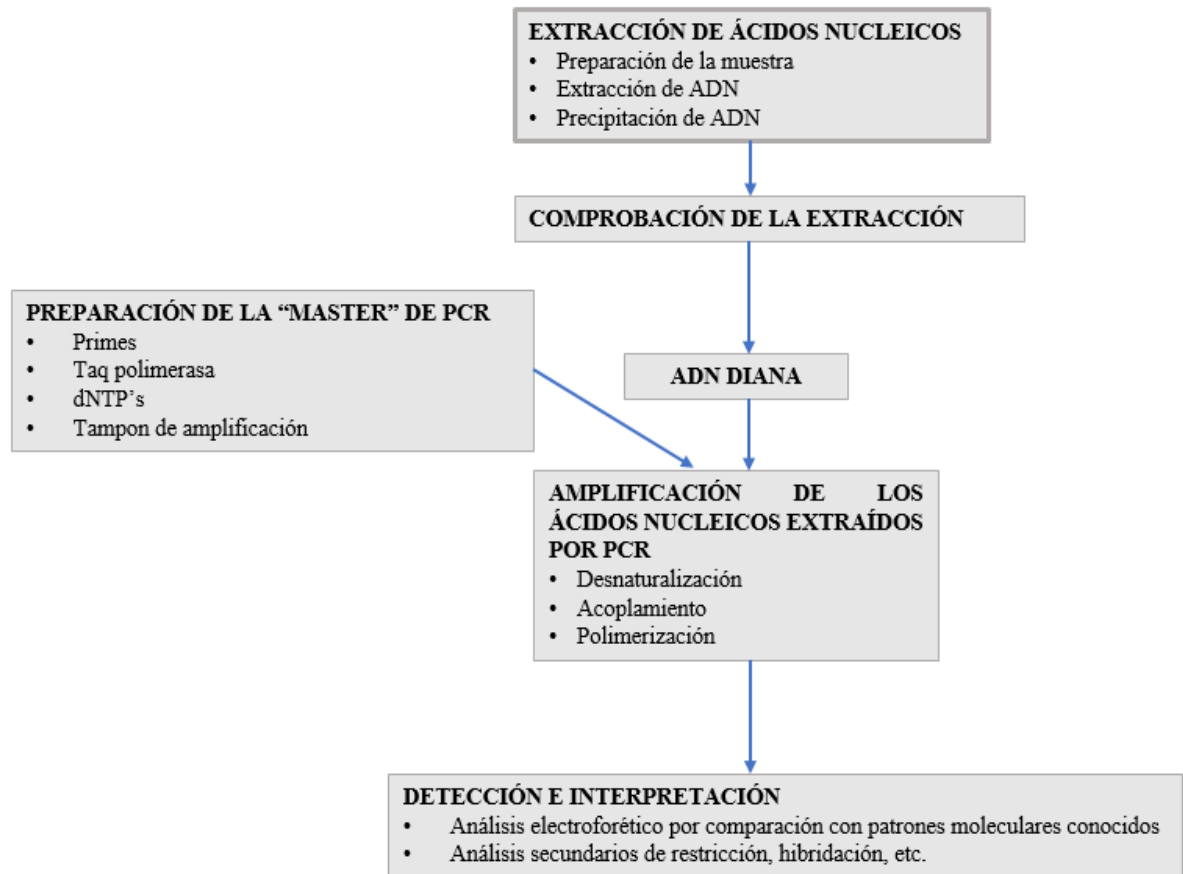


Figura 27. Metodología básica de a PCR

Fuente: IBT.unam.mx

1.7.2.5 ANÁLISIS DEL PRODUCTO DE LA PCR

1.7.2.5.1 ELECTROFORESIS

La técnica de electroforesis horizontal es capaz de separar fragmentos que no pueden ser separados adecuadamente por otros procedimientos. La utilización de agarosa para la separación de moléculas de ADN del tamaño esperado en este estudio, es fundamental pues, mientras que un gel de poliacrilamida puede diferenciar moléculas con un rango de desigualdad de tan solo 1pb, no es capaz de soportar moléculas mayores a 500pb. La agarosa tiene un poder de resolución menor, sin embargo, tiene un mayor rango de separación (50 a 20, 000)⁴⁶.

1.7.2.6 APLICACIONES

PCR tiene una amplia gama de aplicaciones, no sólo en la investigación básica, sino también en las áreas de diagnóstico médico, medicina forense y la agricultura³⁸.

Algunos ejemplos de aplicaciones de PCR incluyen²¹.

- Clonar un gen (molde ADN o ARN).
- Reconocer o conocer secuencias.
- Genes homólogos en especies próximas (primers degenerados).
- Información de secuencia proteica (primers degenerados).
- PCR inversa para clonar gen completo.

- Herramienta en construcciones plasmídicas.
- Análisis de recombinantes y eventos infrecuentes en el ADN.
- Mutagénesis *in vitro*.
- Corte y ligación de fragmentos de ADN *in vitro*.
- Construcción de genes sintéticos o fragmentos *in vitro*.
- Conocer la CDS de un gen, localizar los intrones, (RT-PCR).
- Detectar expresión de un gen, semicuantitativo, (RT-PCR).
- Real Time, PCR cuantitativa, (RT-PCR).
- Clonar extremos 5' y 3' de un transcrito: RACE, (RT-PCR).
- Diagnóstico e identificación.
- Tipado, clasificación, taxonomía (RAPDs, AFLPs, SSRs, SNPs, etc.).
- Aplicaciones Forenses.

1.7.2.7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS

La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del ADN molde⁵⁰.

Es una técnica muy robusta debido, en gran medida, a la gran capacidad de los oligonucleótidos (en este caso de los iniciadores) de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminando fácilmente entre centenares de millares de sitios. La principal desventaja es la necesidad de estandarizar la técnica para el organismo o la técnica de interés, lo cual puede ser tardado y costoso³¹.

CAPITULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 CUADRO METODOLÓGICO

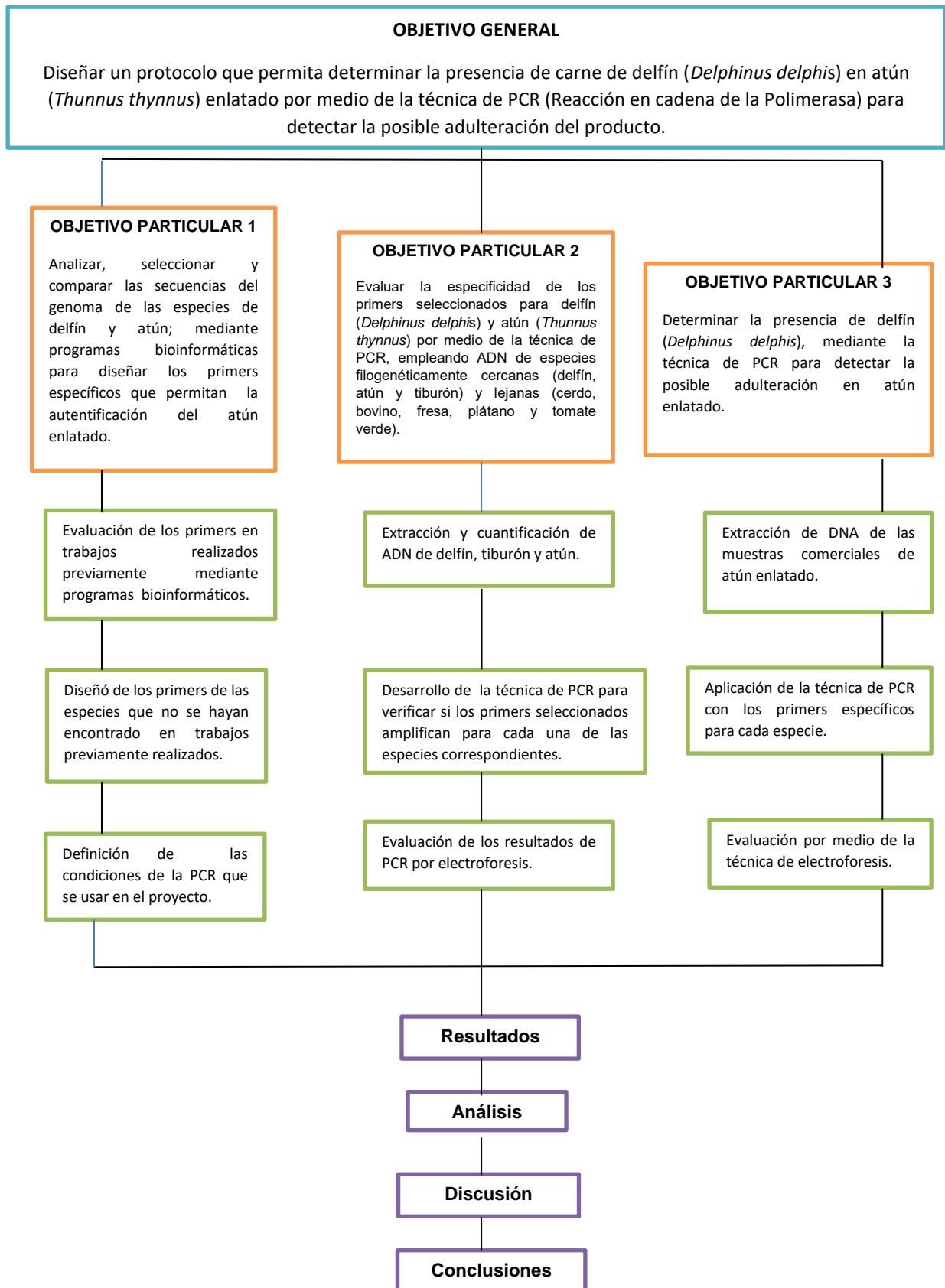


Figura 28. Cuadro Metodológico

2.1.1 PROBLEMA

Identificar carne de delfín (*Delphinus delphis*), en atún enlatado por medio de PCR.

2.1.2 OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo que permita determinar la presencia de carne de delfín (*Delphinus delphis*) en atún (*Thunnus thynnus*) enlatado por medio de la técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) para detectar la posible adulteración del producto.

2.1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

OBJETIVO PARTICULAR 1

Analizar, seleccionar y comparar las secuencias del genoma de las especies de delfín (*Delphinus delphis*) y atún (*Thunnus thynnus*); mediante programas bioinformáticos para diseñar los primers específicos que permitan la autenticación del atún enlatado.

ACTIVIDADES

1. Evaluar primers en trabajos realizados previamente mediante programas bioinformáticas
2. Diseñar los primers de las especies que no se hayan encontrado en trabajos previamente realizados.
3. Definir las condiciones de la PCR que se usar en el proyecto.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Evaluar la especificidad de los primers seleccionados para delfín (*Delphinus delphis*) y atún (*Thunnus thynnus*) por medio de la técnica de PCR, empleando ADN de especies filogenéticamente cercanas (delfín, atún y tiburón) y lejanas (cerdo, bovino, fresa, plátano y tomate verde).

ACTIVIDADES

1. Extracción de ADN de delfín, tiburón, atún, cerdo, bovino, fresa, plátano y tomate verde
2. Desarrollar la técnica de PCR para verificar si los primers seleccionados amplifican para cada una de las especies
3. Evaluar los resultados de PCR por electroforesis.

OBJETIVO PARTICULAR 3

Demostrar la presencia de delfín (*Delphinus delphis*), mediante la técnica de PCR para detectar la posible adulteración en atún enlatado.

ACTIVIDADES

1. Extracción y cuantificación de ADN de las 15 muestras comerciales de atún enlatado.
2. Aplicar la técnica de PCR con los primers específicos para cada especie.
3. Evaluar por medio de la técnica de electroforesis.

2.2 MATERIALES

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para el material biológico de las especies a experimentar se obtuvo (Cuadro 5):

- Carne de delfín (*Delphinus delphis*)
- Carne de tiburón (*Carcharhinidae*)
- Carne de atún (*Thunnus thynnus*)

Cuadro 5. Características de las muestras para el material biológico.

ANIMAL	ESPECIE	PRECIO \$	CANTIDAD (g)	LUGAR DONDE SE OBTUVO	MUESTRA QUE SE VA A EXTRAER
Delfín	<i>Delphinus delphis</i>	-	15	FES Cuautitlán	Carne (hígado)
Tiburón	<i>Carcharhinidae</i>	16.00	180	Mercado	Carne (lomo)
Atún	<i>Thunnus thynnus</i>	76.44	260	Wal - Mart	Carne (lomo)

2.2.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ATÚN ENLATADO

Las muestras se obtuvieron de diversos centros comerciales y mercados municipales (sobre ruedas) como se representa en el Cuadro 6, se juntaron 15 muestras de atún enlatado, 13 fueron de atún enlatado en agua y 2 de atún enlatado en agua con aceite:

Cuadro 6. Referencias de las Muestras de atún

ATÚN ENLATADO		FECHA DE CADUCIDAD	LOTE	PRODUCTO	PRECIO \$
1	A	Febrero 2021	L2PES17048B	Atún aleta amarilla en agua.	6.90
2	B	Julio 2021	L-M61J3110	Atún aleta amarilla en agua.	8.40
3	C	Julio 2019	SC705CADY5	Atún aleta amarilla en agua / aceite, desmenuzado.	9.50
4	D	Febrero 2020	L-0356	Atún aleta amarilla en hojuelas en aceite.	11.50
5	E	Marzo 2022	L-M7211110	Atún aleta amarilla en hojuelas en agua.	7.30
6	F	Agosto 2021	L-M66M3695	Atún aleta amarilla en agua.	7.50
7	G	Agosto 2020	LER1121716	Lomo de atún aleta amarilla en agua.	11.95
8	H	Agosto 2020	LER824416	Atún aleta amarilla en agua.	8.20
9	I	Septiembre 2020	LPH6224	Lomo de atún aleta amarilla en agua.	13.00
10	J	Julio 2020	LPH6165	Atún aleta amarilla en agua.	12.80
11	K	Agosto 2020	EMDW1AL2236	Atún aleta amarilla con soya en agua.	8.90

12	L	Agosto 2020	EUDW2AL2236	Atún aleta amarilla con proteína de soya en agua.	7.20
13	M	Septiembre 2020	ENDW1AL2646	Atún aleta amarilla en agua.	6.90
14	N	Agosto 2021	L-M63L3440	Atún aleta amarilla en agua	9.00
15	Ñ	Diciembre 2021	L-M64M5137	Atún en agua	7.40

2.3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

2.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN

- Método Sambrook
 - Agua des ionizada o bidestilada
 - Solución de lisis (Tris base 0.05M pH=8, EDTA 0.1M y SDS 0.5%)
 - Enzima proteínasa K a concentración de 20mg/mL
 - Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
 - Etanol al 70%
- Kit Wizard® Sistema magnético de purificación de ADN para alimentos
 - Buffer de lisis A, para alimentos
 - Buffer de lisis B, para alimentos
 - Enzima RNase A
 - Solución de precipitación, para alimentos
 - Partículas paramagnéticas MagneSil®

2.3.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN

- Muestra a cuantificar
- agua libre de nucleasas

2.3.3 ELECTROFORESIS

- Agarosa en polvo
- Tris Acetato y EDTA (TAE) IX como solución buffer, pH=8
- Bromuro de etidio en concentración de 10mg/ml
- Marcador de peso molecular
- Tinte cargador blue/Orange

2.3.4 PCR

- Primer (Reversible y Frontal)
- Kit de PCR
 - Agua libre de nucleasas
 - PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA Polimerasa, 400µM de cada dNTP y 3µM de MgCl₂)
- Kit de PCR directo de tejido animal
 - Solución buffer de PCR de tejido animal Phire 2X (incluye dNTP y MgCl₂)

- Enzima Phire Hot Start II ADN polimerasa

2.4 EQUIPOS

- Agitador Vortex Agitador Vortex (Lab-Line), modelo Super Mixer 1290.
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis horizontal
- Equipo de fotografía para luz UV (Kodak Digital Science)
- Espectrofotómetro (Accesolab NanoDrop ND-1000)
- Fuente de poder (Biorad), modelo Power Pac 1000.
- Horno de microondas
- Juego de micropipetas
- Microcentrifuga
- Puntas estériles para micropipetas
- Termoblock
- Termociclador (Perkin Elmer), modelo Gene Amp PCR system 2400.
- Transiluminador (UVP), modelo M - 15E.

2.5 MÉTODOS

2.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Durante la experimentación se utilizaron 2 métodos distintos para la extracción de ADN, tales fueron:

- **Sambrook**, el cual se utilizó para la extracción de ADN, de la carne fresca de delfín, atún aleta amarilla y tiburón.
- **Kit de PCR para productos altamente procesados**, este método se utilizó para las 15 muestras comerciales de atún enlatado.

2.5.1.1 SAMBROOK

Para la extracción de ADN de los materiales biológicos como fue el caso de los productos frescos de delfín, atún, tiburón, plátano, fresa, tomate verde, cerdo y bovino, utilizados en la experimentación, se llevó a cabo el método descrito por Sambrook.

ETAPAS

- **DEGRADACIÓN DEL TEJIDO**
 1. Se limpió perfectamente el área de trabajo con alcohol para que no exista algún tipo de contaminación, usar bata y guantes.
 2. Se pesó 0.125g de la muestra en un tubo eppendorf.
 3. Se adicionó 1.25ml de solución de lisis.
 4. Se agregó 7µl de enzima proteasa previamente concentrada a 20mg/ml.
 5. Se incubó los tubos a 50°C en termoblock por 2 horas.
 6. Se desactivo la enzima manteniendo la temperatura del termoblock a 60°C por lo menos una hora.
- **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y POLISACÁRIDOS.**
 1. Se adicionó al tubo que contiene la muestra 0.25ml de mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

2. Se centrifugó a 10,000rpm por 10min a temperatura ambiente.
3. Se separaron las fases, recuperando solamente la fase acuosa superior que contiene el ADN.
- **PRECIPITACIÓN DE ADN**
1. Se añadió 1ml de etanol frío a cada uno de los tubos de eppendorf que contenían la fase acuosa recuperada
2. Se centrifugaron las muestras a 10,000rpm por 10min
3. Se decantó el etanol y se dejó secar el ADN en la incubadora a 37°C por 1 hora. El ADN se visualizó pegado al tubo como una pequeña mancha blanca.
4. Se adicionó 50µL de agua desionizada a cada tubo para re suspender el ADN, agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.

2.5.1.2 KIT WIZARD® SISTEMA MAGNÉTICO DE PURIFICACIÓN DE ADN PARA ALIMENTOS

Este método se realizó como actividad previa del Kit de PCR directo de tejido animal, para las muestras de atún enlatado, consideradas como productos altamente procesados.

DESCRIPCIÓN

El sistema Wizard® de purificación de ADN magnético para alimentos utiliza MagneSil® partículas paramagnéticas (PMPs). Las partículas paramagnéticas pueden considerarse una "fase sólida móvil". A diferencia de los sistemas basados en columnas, la unión de ácidos nucleicos a partículas magnéticas se produce en solución, dando lugar a una mayor cinética de unión y eficacia de enlace. Las partículas también pueden resuspenderse completamente durante las etapas de lavado del protocolo de purificación, aumentando así el contacto con y la eliminación de contaminantes, lo que aumenta la pureza del ácido nucleico, véase en el Anexo 1.

METODOLOGÍA

1. Se pesó 200 mg de cada una de las muestras de atún enlatado y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2 ml.
2. Se realizaron 3 lavados a cada muestra con agua libre de nucleasas.
3. Con el tubo inclinado hacia un lado y el material seco que cubre el costado del tubo, se agregó 500µl de Lysis Buffer A y 7 µl de RNasa A a la muestra. Se tapó el tubo y se mezcló agitando vigorosamente.
Nota: Dependiendo del volumen y las características del material de partida, el volumen del tampón de lisis puede tener ser ajustado. Para promover la facilidad de manejo de la muestra, recomendamos que la muestra permanezca al costado del tubo mientras agrega los reactivos. Si el material de muestra se aglomera en el fondo del tubo y no se resuspende mediante agitación vorticial, se puede usar una punta de pipeta para resuspender manualmente la muestra.
4. Se agregó 250µl de Lysis Buffer B y vortex por 15 segundos para mezclar. Se colocó el tubo tapado de lado para que el material cubre el lado del tubo.
5. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (22-25 ° C).
6. Se agregó 750µl de solución de precipitación, luego se agitó vigorosamente.
Nota: para la mayoría de las muestras, la mezcla será de color verde en este punto. La muestra debe estar suspendida de manera uniforme en la mezcla. Si el

vortexing no es efectivo, el tubo puede sacudirse vigorosamente para resuspender el material.

7. Posteriormente se centrifugó a 6000rpm durante 10 minutos.
8. Se transfirió el sobrenadante (fase líquida) a un tubo de microcentrífuga nuevo de 2 ml.
Nota: Si hay material flotante encima del líquido, pipetee cuidadosamente debajo de él, evitando la aspiración de material flotante
9. Se mezcló vigorosamente la botella de MagneSil® PMP durante 15-30 segundos para asegurar que las partículas estén completamente resuspendido, se agregó 50µl de MagneSil® PMP resuspendidos al sobrenadante y vortex el tubo vigorosamente.
Nota el volumen de líquido en el tubo y los PMP MagneSil® deben resuspenderse por completo antes de dispensarse desde la botella.
10. Se agregó 0,8 volúmenes de isopropanol (por ejemplo, para 1,000 µl de sobrenadante, agregue 800 µl de isopropanol), invirtiendo el tubo 15 veces para mezclar. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (22-25 ° C) con mezclado ocasional, lavando las superficies internas del tubo, así como las partículas, se insertaron los tubos en la MagneSphere® Technology Magnetic por 1 minuto dejando los tubos en el soporte, descartando la fase líquida por decantación o pipeteo
11. Se retiró el tubo del soporte y se agregó 250µl de Lysis Buffer B a las partículas, invirtiendo el tubo 2-3 veces para mezclar. Reemplace el tubo en el soporte de separación magnética y permita que las partículas se acumulen durante 1 minuto. Retire el líquido como en el paso 10.
12. Se volvió a suspender las partículas en 1 ml de solución de lavado de etanol al 70%, devolviendo los tubos al soporte magnético por 1 minuto. Eliminando y descartando la solución como en el Paso 10.
13. Se colocaron las muestras en el termoblock a 65°C durante 10 minutos.
14. Se agregó 50µl de agua libre de nucleasas, se dio vortex.
15. Se incubó a 65°C por 10 minutos.
16. Se recuperó la fase acuosa de las partículas paramagnéticas, obteniendo el ADN de cada una de las muestras de atún enlatado.

2.5.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN

FUNDAMENTO

Este método es útil para preparaciones de ácidos nucleicos altamente puros pues se detecta cualquier compuesto que absorbe la luz significativamente a 260nm lo cual incluye, por ejemplo, ADN, ARN, EDTA y fenol. La relación de absorbancia a 260nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de ADN y ARN con proteína, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280nm. En este caso, solo un nivel significativo en la relación de absorbancia de ambas longitudes de onda^[30 y 50].

1. Al cuantificar la cantidad de ADN, las lecturas se toman a 260nm y 280nm.

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

2.5.2.1 METODOLOGÍA DE NANO DROP (ESPECTROFOTÓMETRO)

1. Se desinfecto con alcohol el área de trabajo.
2. Se conectó el Nano Drop.
3. Se seleccionó el programa Nano Drop, ingresar a la opción ácidos nucleicos.
4. Se tomó una micropipeta que tenga la graduación apropiada poner la punta para colocar 2µl de agua libre de nucleasas.
5. Se colocaron los 2µl de agua libre de nucleasas para iniciar el equipo “ok”.
6. Se limpió el sensor y poner 2µl de agua libre de nucleasas en el sensor lo cual servirá como blanco.
7. Cuando el equipo registró los valores del blanco, se limpió el sensor por medio de un pañuelo.
8. Se tomó una micropipeta que tenga la graduación apropiada poner la punta para colocar 2µl de la muestra a cuantificar.
9. Se colocaron los 2µl de la muestra que se desea cuantificar y seleccionar “measure” en el programa.
10. Se registraron los valores de relación (260/280) y la concentración (ng/µl).
11. La concentración debe ser de 60ng/µl, en caso de no ser así se realiza la dilución.

2.5.2.2 DILUCIÓN DE ADN

1. La concentración de ADN debe ser de 60ng/µl.
2. Cuando se obtienen valores distintos (60ng/µl) se debe realizar la dilución correspondiente.
3. Se resuelve por medio de una regla de 3.

$$\begin{aligned} \text{ml de la solución a cuantificar} &= \text{concentración obtenida en el Nano Drop} \\ &\times = 60\text{ng}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

4. Para obtener una muestra de 50µl, la concentración de 60ng/µl, se considera el valor de “x” como la muestra original y se le agrega agua libre de nucleasas hasta completar los 50µl.

2.5.3 ELECTROFORESIS

2.5.3.1 METODOLOGÍA PARA LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se realizó el gel de agarosa, para de determinar la integridad del ADN y la visualización de los productos de la PCR durante la experimentación.

1. Se pesó los gramos correspondientes de agarosa conforme al gel que se iba a utilizar (integridad del ADN o productos de la PCR).
2. Se disolvió en 50ml de TAE IX (Buffer).
3. Se calentó la dilución en el horno de microondas aproximadamente 1 min por espacios de 20s.
4. Se añadió una gota de Bromuro de Etidio (BrEt) y se mezcló.
5. Se cerraron las aperturas laterales del soporte del gel.
6. Se vertió la mezcla en el soporte cuidando que no se formen burbujas y colocar los peines.
7. Se esperó a que la solución gelifique.
8. Se retiraron los peines y se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis.
9. Se agregó TAE IX a la cámara de modo que el gel quede cubierto.

2.5.3.2 CARGA Y CORRIDA DE GEL

1. Se colocó en un trozo de parafina 3 μ l de Bromuro de Etidio (BrEt); 3 μ l de colorante blue/Orange, 5 μ l de la muestra y 1 μ l de marcador de peso molecular.
2. Se activó el campo eléctrico a 60V, por medio de la fuente de poder.
3. La duración de la corrida permaneció hasta que el colorante se visualizó cerca del extremo opuesto.

2.5.3.4 VISUALIZACIÓN DE PIGMENTOS

1. Se colocó el gel en el transiluminador.
2. Se acomodó el gel de modo que quedara en el centro y encender el transiluminador.
3. Se encendió la cámara y se tomó la fotografía al gel.

2.5.4 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA - AMPLIFICACIÓN DE DNA)

2.5.4.1 PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN

Para la preparación de la reacción es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes (primers y ADN).

Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 250 μ M, mientras que el ADN requiere una concentración relativamente baja puesto que, teóricamente, una sola copia del ADN implica la colecta de millones de cadenas originales.

2.5.4.2 METODOLOGÍA PARA PCR

1. Se agregaron los componentes del Kit de PCR (Cuadro 7).

Cuadro 7. Componentes del Kit de PCR

COMPONENTE		PROPORCIÓN POR MUESTRA
Kit Master Mix		12.5µl
Primer	Frontal	0.5µl
	Reverso	0.5µl
DNA		2µl
Agua Libre de Nucleasas		10.5µl

2. Se añadió a cada tubo la muestra que les corresponda.
3. Se colocaron los tubos en la microcentrífuga (5 seg aproximadamente).
4. Se introdujo los tubos al termociclador (Figura 29) y programarlo a las condiciones de la PCR.



Figura 29. Termociclador (Perkin Elmer), modelo Gene Amp PCR system 2400

4. Se programaron los ciclos que indique el programa de PCR.

2.5.4.3 METODOLOGÍA - KIT DE PCR DIRECTO DE TEJIDO ANIMAL DESCRIPCIÓN

El Kit de PCR directo de tejido animal Thermo Scientific Phire ha sido desarrollado para la amplificación de ADN directamente de una gran variedad de tejido animal, como de ratones, peces, aves e insectos. El Kit contiene todos los componentes necesarios para la amplificación de ADN directamente de tejido animal: reactivos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) optimizados, tampón de dilución y aditivo DNARElease, que se puede utilizar para mejorar la liberación de ADN a partir de tejido animal. Además, el kit incluye primers de control para controlar las reacciones positivas que son universales y funcionan con numerosas especies de animales. Se proporciona un manual detallado que describe los protocolos para trabajar con los diferentes tipos de tejidos⁵¹.

1. Se agregaron los componentes del Kit de PCR directo de tejido animal, como se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Componentes del Kit de PCR directo de tejido animal

COMPONENTE		PORCIÓN POR MUESTRA
Buffer		10 μ L
Primer	Frontal	1 μ L
	Reverso	1 μ L
Enzima		0.4 μ L
ADN		1 μ L
Agua libre de nucleasas		7.6 μ L

2. Se añadió a cada tubo la muestra que les corresponda.
3. Se colocaron los tubos en la microcentrífuga (5 seg aproximadamente).
4. Se introdujeron los tubos al termociclador (Figura 29) y se programaron a las condiciones de la PCR.

CAPITULO III. ANÁLISIS Y RESULTADOS

3.1 OBJETIVO PARTICULAR 1 - DISEÑO Y SELECCIÓN DE PRIMERS

La determinación del diseño de los primers es la parte más importante de la etapa experimental para la realización de la técnica de PCR, para ello se debe considerar las actividades propuestas en el objetivo particular 1 del capítulo 2.

A diferencia de otras especies, el delfín, el tiburón, la tortuga y el atún no tienen designados primers específicos por lo que el principal objetivo de este trabajo fue diseñarlos para cada uno, de manera que se pudiera identificar en las muestras de atún para comprobar la autenticidad del producto. Para cumplir con dicho planteamiento se llevó a cabo el protocolo mencionado anteriormente en el capítulo 2 por medio de los programas bioinformáticos NCBI y Primerquest tool ^[32 y 18], véase el Anexo 3.

3.1.1. PRIMERS PARA DELFÍN

3.1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRIMERS

A continuación, se muestran las propiedades que deberá tener la propuesta para los primers (frontal y reverso) utilizados para la detección de carne de delfín en el atún enlatado, se muestra la secuencia 5' → 3', su temperatura de fusión (TM), la ubicación dentro del genoma mitocondrial (Anexo 6) y el tamaño del amplificado que se espera obtener tras la experimentación, de igual forma se presenta el programa que se utilizará para el termociclador en la experimentación de uso de los primers para el delfín (Cuadro 9).

Cuadro 9. Características de los primers para delfín

PRIMER	SECUENCIA	UBICACIÓN	TM (°C)	TAMAÑO (bases)	TAMAÑO DE AMPLIFICACIÓN (pb)
FRONTAL 5' → 3'	CCACAACA TCACAGTA CTACGTC	58 - 81	55.2	23	424
REVERSO 5' → 3'	GGGCCTGA TTTAAGAA CCAGAT	460 - 482	54.8	22	
PROMEDIO DE LA TM (°C)			55		

3.1.1.2 PROGRAMA DE PCR

Para la amplificación de los primers de delfín se realizó bajo las condiciones del programa de PCR descrito en el Kit de PCR directo de tejido animal (véase el Anexo 2) modificando únicamente la temperatura de hibridación (TM), usando la temperatura que se muestra en las hojas de especificaciones de los primers de delfín (véase el Anexo 4) obteniendo de esta manera el programa de PCR para la detección de carne de delfín como se muestra en la Figura 30, desglosando cada una de las 4 etapas de la PCR que son:

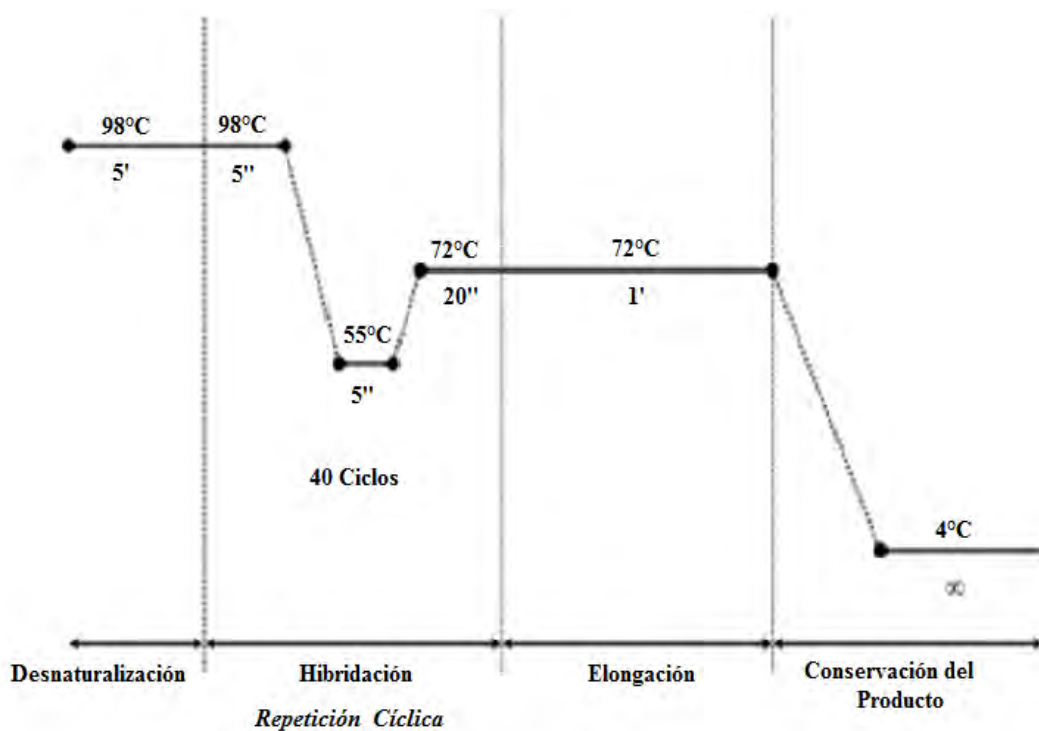


Figura 30. Programa de PCR para delfín

3.1.2 PRIMERS PARA ATÚN

3.1.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRIMERS

Se describen las propiedades de los primers (frontal y reverso) utilizados para la detección de carne de atún, se muestra la secuencia 5' → 3', su temperatura de fusión, la ubicación dentro del genoma mitocondrial (Anexo 6) y el tamaño del amplificado como se muestra en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Características del primer para atún

PRIMER	SECUENCIA	UBICACION	TM (°C)	TAMAÑO (bases)	TAMAÑO DE AMPLIFICACION (pb)
FRONTAL 5' → 3'	GTCCCATAT GTCGGA ACTC	457 - 479	54.4	22	468
REVERSO 5' → 3'	GTGCAGGA AGGGA ACTA CTATAA	902 - 905	53.9	23	
PROMEDIO DE LA TM (°C)			54.15 = 54		

3.1.2.2 PROGRAMA DE PCR

La amplificación de los primers de atún se realizó bajo las condiciones del programa de PCR descrito en el Kit de PCR directo de tejido animal (véase el Anexo 2) modificando únicamente la temperatura de hibridación (TM), usando la temperatura que se muestra

en las hojas de especificaciones de los primers de atún (véase el Anexo 4) obteniendo de esta manera el programa de PCR para la detección de carne de atún como se muestra en la Figura 31, desglosando cada una de las 4 etapas de la PCR que son:

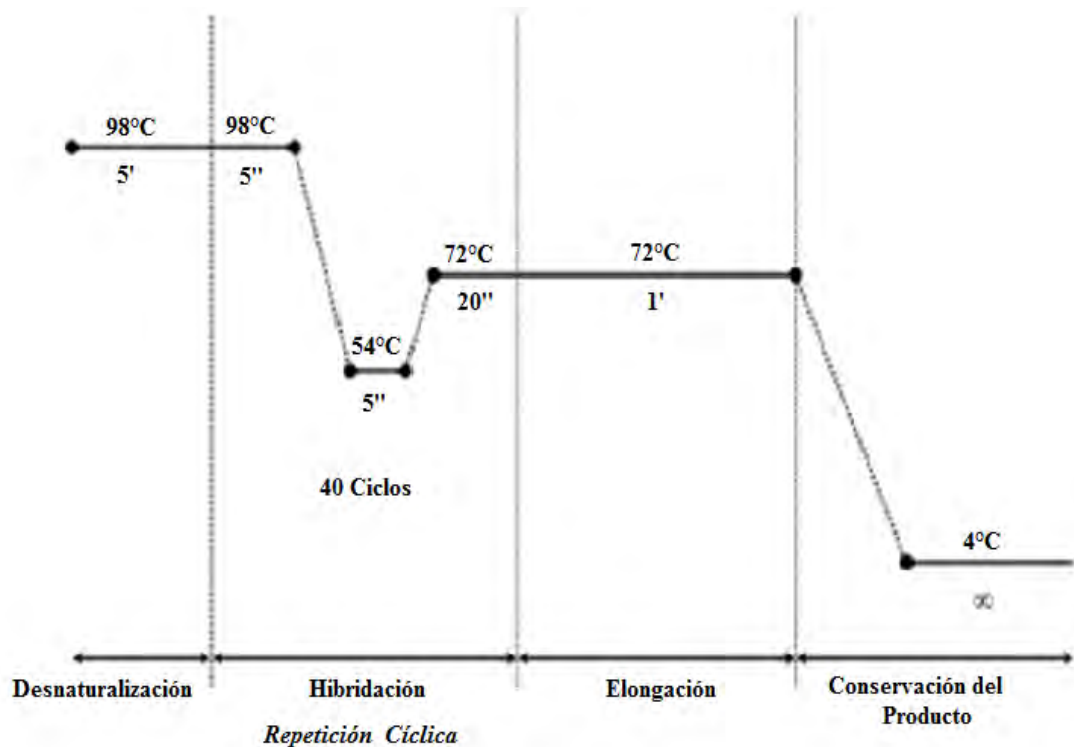


Figura 31. Programa de PCR para la amplificación de atún

3.2 OBJETIVO PARTICULAR 2 – ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS

3.2.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para la especificidad de los primers, se realizó la extracción de las muestras frescas de atún, delfín y tiburón por medio del método de Sambrook, haciendo el duplicado por cada muestra, posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de las muestras para obtener la concentración y la pureza del ADN extraído como se muestra en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Cuantificación de las muestras frescas

MUESTRA	RELACIÓN 260/280	CONCENTRACIÓN (ng/μL)	Las muestras seleccionadas (naranja) son las que se usaron para electroforesis y PCR.
Atún	1.93	380.4	
Atún	1.95	391.7	
Delfín	1.83	5206.6	
Delfín	1.92	5478.2	
Tiburón	1.91	985.3	
Tiburón	1.95	1180	

Procedente a la cuantificación, se desarrollaron los cálculos para obtener la cantidad de muestra requerida para la PCR (aproximadamente 60ng/μL) según la concentración de cada ADN (véase Anexo 5), los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Cuantificación Muestras frescas, diluidas

MUESTRA	RELACIÓN 260/280	CONCENTRACIÓN (ng/ μ L)
Atún	1.94	91
Delfín	1.91	86.3
Tiburón	1.89	79

Teniendo los datos de la cuantificación de las muestras frescas concentradas y diluidas de atún, delfín y tiburón, se elaboró el gel de integridad por medio de electroforesis (Figura 32), obteniendo que en las muestras diluidas se presenta un poco de degradación en el ADN a comparación de las muestras concentradas las cuales el ADN se presenta integro, usando las muestras diluidas para la PCR de especificidad de los primers conforme a los datos presentados en el Cuadro 12, estableciendo que el ADN es óptimo por medio del rango de valores de pureza y concentración para realizar la PCR.

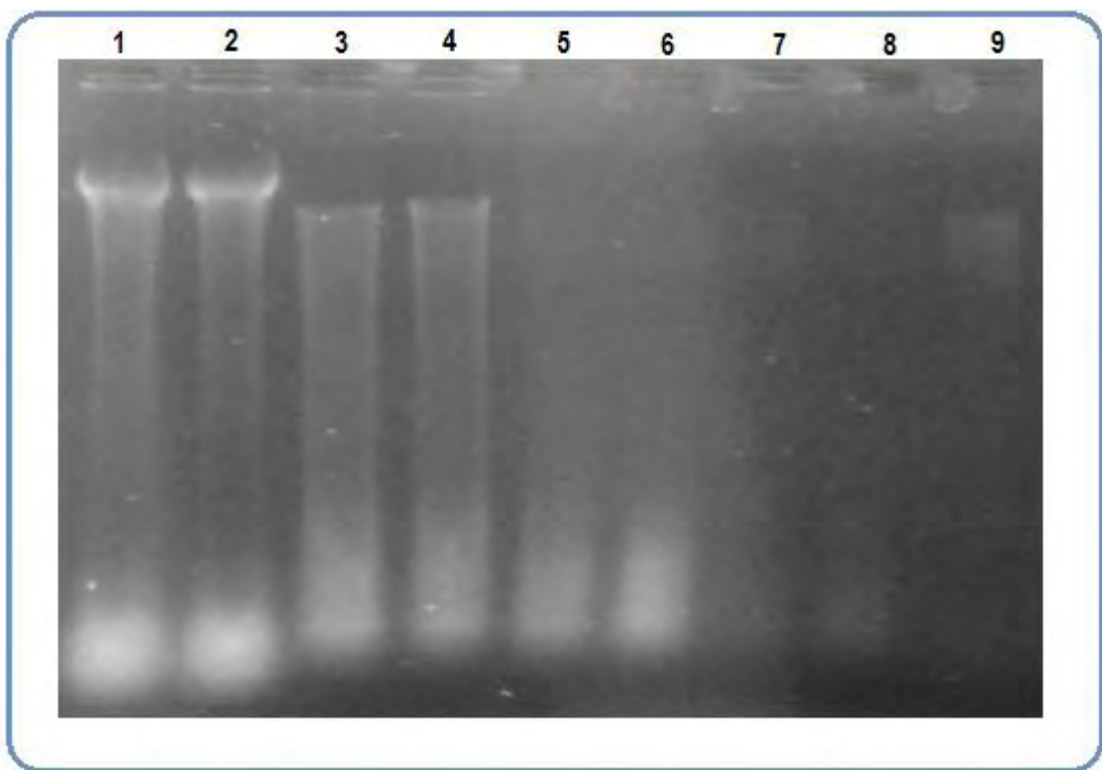


Figura 32. Gel de agarosa al 1% de la integridad de las muestras frescas, (1 y 2) muestras concentradas de delfín, (3 y 4) muestras concentradas de tiburón, (5 y 6) muestras concentradas de atún, (7) muestra diluida de delfín, (8) muestra diluida de atún y (9) muestra diluida de tiburón

3.2.2 PCR PARA ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS

Al tener concretada la extracción de ADN de las muestras frescas, se ejecutó la PCR, verificando que los primers diseñados para la detección de delfín y atún, son específicos para cada una de las especies correspondientes, y que se obtuviera el amplificado establecido en las condiciones de los primers, para delfín el tamaño de amplificación es de 424pb y para atún de 468pb, como se presenta en la Figura 33, realizando cada muestra de delfín y atún por duplicado, mostrando el mismo tamaño de amplificado correspondiente a cada uno y con su muestra blanco comprobando que no se obtuvo algún tipo de contaminación.

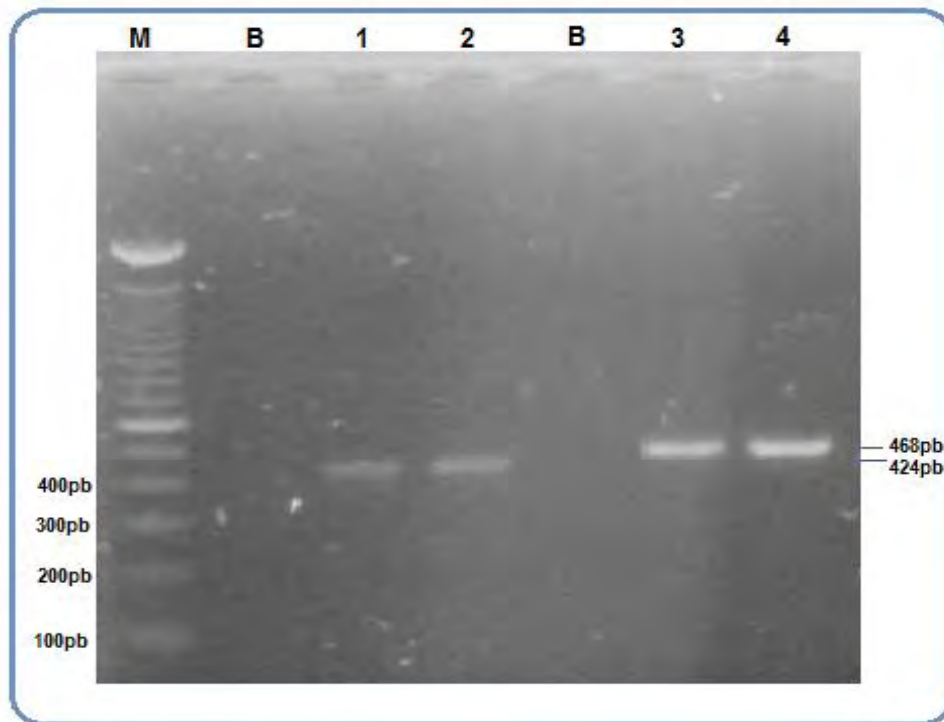


Figura 33. Gel de agarosa al 1.5% de la comprobación del tamaño de amplificado de los primers, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) Blanco para cada una de los primers, (1 y 2) primers de delfin, (3 y 4) primers de atún

En la Figura 34 se representa la especificidad de los primers de delfín, con especies filogenéticamente cercanas las cuales fueron atún, tiburón, cerdo y bovino, y con especies filogenéticamente lejanos como plátano, fresa y tomate verde, mostrando la distribución de las especies en el Cuadro 13, observando sólo una banda en el gel de electroforesis exclusivamente en el carril 1 correspondiente al control positivo (delfín), asumiendo la especificidad de los primers de delfín solo amplifican para esta especie, evitando amplificadas no específicas para otras especies presentes en las muestras de atún enlatado.

Cuadro 13. Distribución de las especies para el gel de especificidad de los primers de delfín

NUMERO	ESPECIE	PRIMERS UTILIZADOS
1	Delfín	Delfín
2	Atún	
3	Tiburón	
4	Cerdo	
5	Bovino	
6	Plátano	
7	Fresa	
8	Tomate verde	

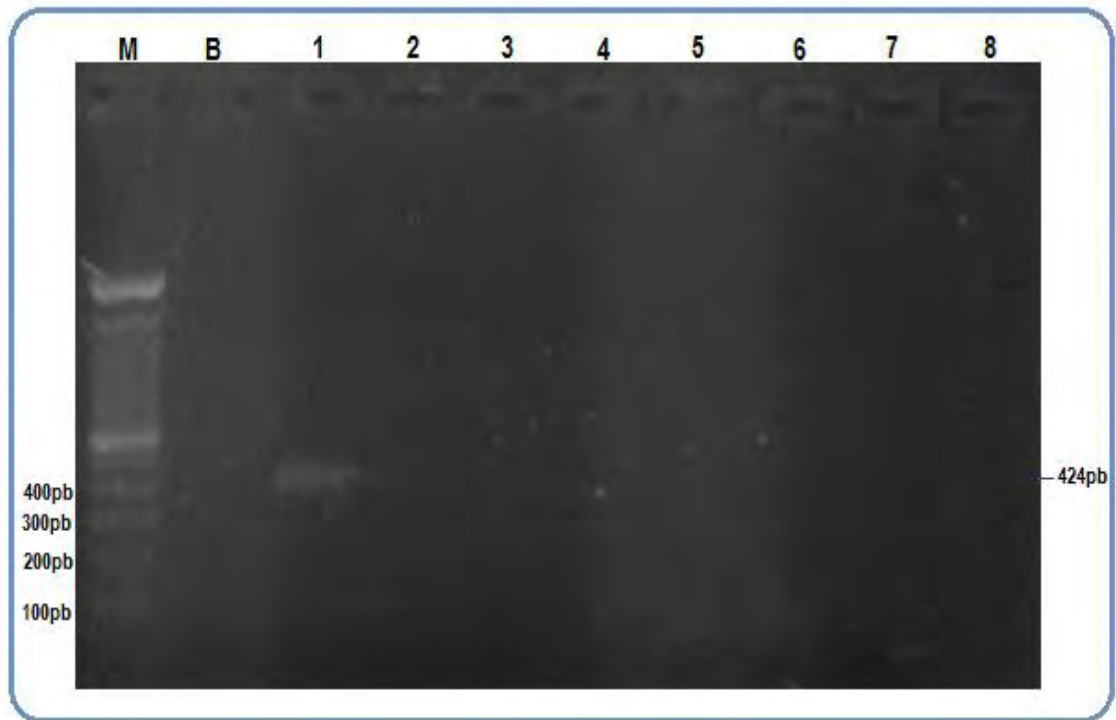


Figura 34. Gel de agarosa al 1.5% de especificidad de los primers de delfín, (M) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (1) delfín, (2) atún, (3) tiburón, (4) cerdo, (5) bovino, (6) plátano, (7) fresa, (8) tomate verde

En la Figura 35, se presenta el gel de especificidad para los primers de atún, los cuales se comprobaron usando solamente delfín, tiburón y como control positivo atún, como se muestra en el Cuadro 14, ya que en este análisis de electroforesis solo se requiere corroborar de que si existe presencia de atún en el atún enlatado.

Cuadro 14. Distribución de las especies para el gel de especificidad de los primers de atún

NUMERO	ESPECIE	PRIMERS UTILIZADOS
1	Atún	Atún
2	Delfín	
3	Tiburón	

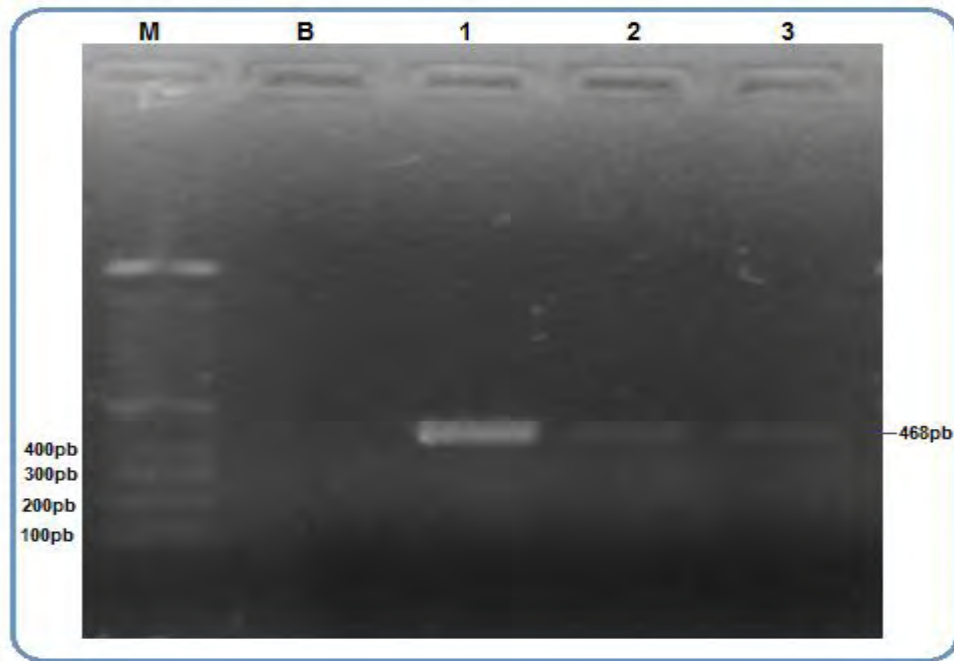


Figura 35. Gel de agarosa al 1.5% para especificidad de los primers de atún, (M) marcador de peso molecular 100p, (B) blanco, (1) atún, (2) delfín, (3) tiburón

Como se muestra en la Figura 35, los primers de atún no son específicos para esta especie, ya que se presentan amplificados en los carriles 2 y 3 correspondientes a las especies de delfín y tiburón, de igual forma se puede visualizar que la banda más brillante corresponde al atún, haciendo uso de tales primers para las siguientes actividades ya que solo se ocuparan para verificar que hay presencia de atún en las muestras a experimentar.

3.3 OBJETIVO PARTICULAR 3 – PRESENCIA DE DELFÍN EN ATÚN ENLATADO

3.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE ATÚN ENLATADO

La extracción de las 15 muestras de atún enlatado, se desarrolló por medio del kit Wizard® sistema magnético de purificación de ADN para alimentos, ya que son productos que han tenido un tratamiento térmico y además se le añaden aditivos para su conservación, por ende estas sustancias químicas inhiben la PCR, si se desarrolla por el método convencional (master mix), de esta manera para lograr obtener el ADN de dichos productos se realizó el procedimiento del kit antes mencionado y el método de PCR directo para tejido animal, asegurando extraer el material genético de la muestra.

De tal manera que, al ejecutar ambos métodos, no se elabora la cuantificación de ADN, ya que se obtenía muy poca concentración al realizar el primer método de purificación.

3.3.2 PCR DE LAS MUESTRAS DE ATÚN ENLATADO CON LOS PRIMERS DE ATÚN

En la Figura 36 - 38, se presenta los 3 el geles de electroforesis al 1.5% correspondientes a los productos de la PCR de las 15 marcas de atún enlatado con los primers de atún (Cuadro 15), se realiza esta etapa de experimentación corroborando que hay presencia de atún en las 15 marcas que se ocuparon en la experimentación,

evaluando que en las Figuras 36, 37 y 38 se visualiza un amplificado en cada una de las muestras de atún enlatado y para comprobar también se presenta el amplificado en control positivo que es atún y de igual forma se visualiza que no se tuvo ningún tipo de contaminación ya que la muestra “blanco” de los 3 geles permanece sin tener amplificación, por lo tanto se asume que las 15 muestras de atún enlatado, como se presenta la distribución en el Cuadro 15, tiene presencia de atún en su composición.

Cuadro 15. Distribución de las muestras de atún enlatado de 1 – 15, usando los primers para detección de atún

NÚMERO	ATÚN ENLATADO	PRIMERS UTILIZADOS
1	A	Atún
2	B	
3	C	
4	D	
5	E	
6	F	
7	G	
8	H	
9	I	
10	J	
11	K	
12	L	
13	M	
14	N	
15	Ñ	

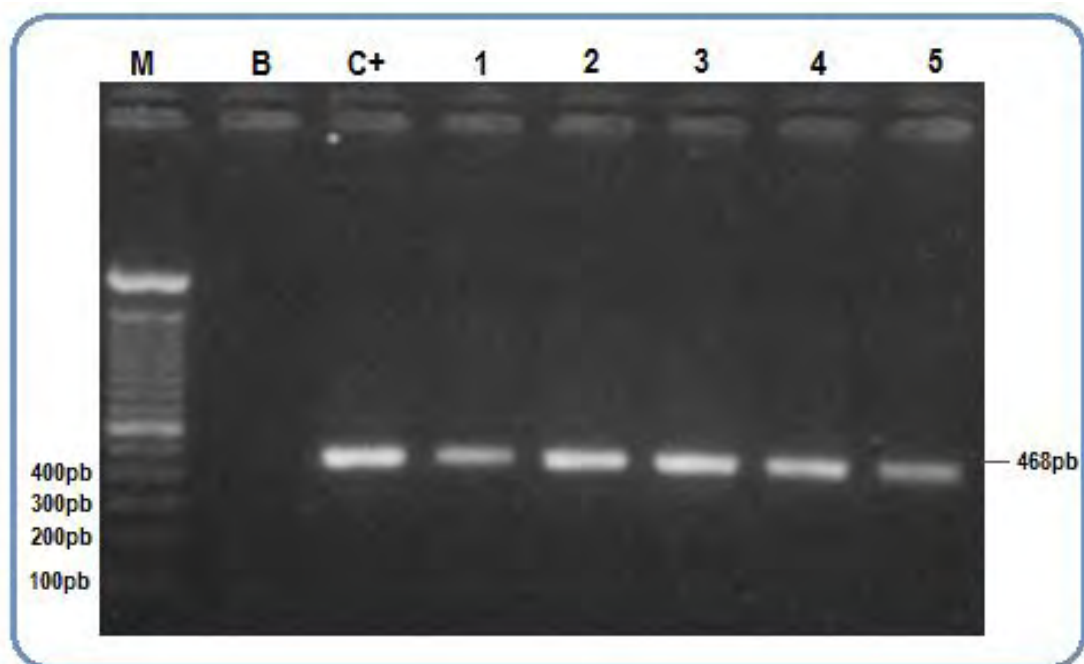


Figura 36. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (1 -5) con primers de atún, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo – atún, (1-5) muestras de atún enlatado

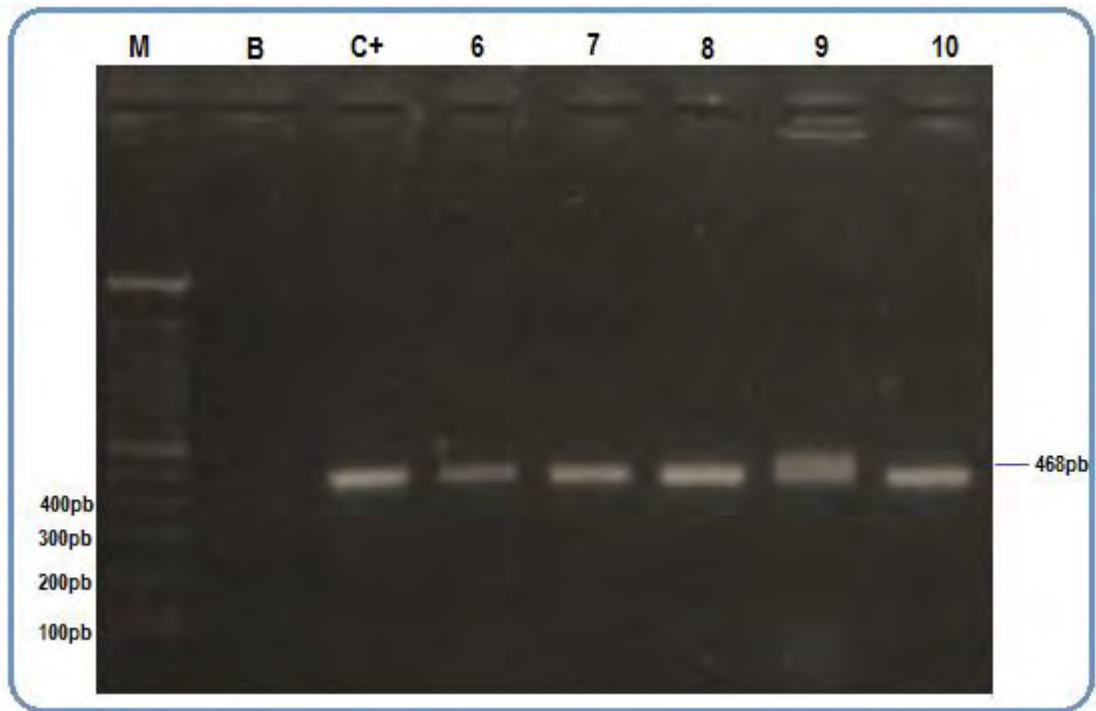


Figura 37. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (6 - 10) con primers de atún, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo – atún, (6 - 10) muestras de atún enlatado

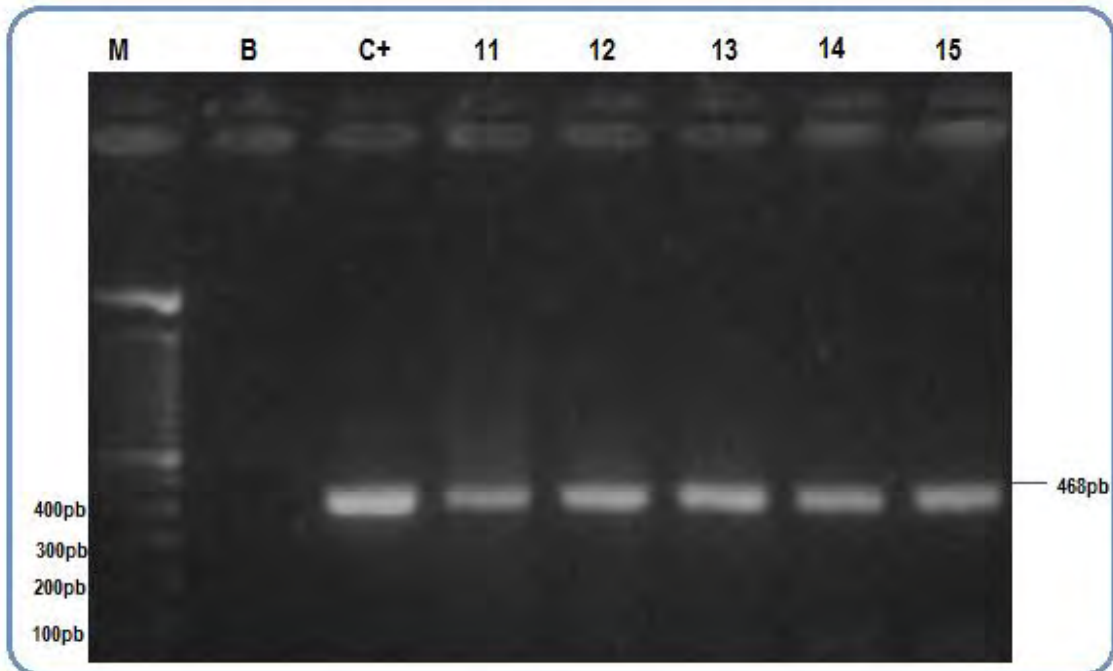


Figura 38. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (11 - 15) con primers de atún, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo – atún, (11-15) muestras de atún enlatado

3.3.3 PCR DE LAS MUESTRAS DE ATÚN ENLATADO CON LOS PRIMERS DE DELFÍN

En el Cuadro 16, se presenta la distribución de las 15 marcas de atún enlatado en los geles de electroforesis al 1.5% para los productos de la PCR de las 15 marcas de atún con los primers de delfín.

Cuadro 16. Distribución de las muestras de atún enlatado de 1 – 15, usando los primers para detección de delfín

NÚMERO	ATÚN ENLATADO	PRIMERS UTILIZADOS
1	A	Delfín
2	B	
3	C	
4	D	
5	E	
6	F	
7	G	
8	H	
9	I	
10	J	
11	K	
12	L	
13	M	
14	N	
15	Ñ	

En la Figura 39, se indican, el gel de electroforesis al 1.5% para los productos de la PCR de las marcas 1 a 5 (Cuadro 16) de atún enlatado con los primers de delfín, visualizando el amplificado de 424pb en el carril del “C+” (control positivo) que es carne delfín y de igual manera se visualiza el amplificado de 424pb en las muestras 3 y 4 correspondientes al atún enlatado “C” y “D” respectivamente, comprobando que en estas marcas hay presencia de delfín en su composición, verificando que no hay amplificación en la muestra “blanco” y por ende se afirma que existe una adulteración con respecto al etiquetado de dichas marcas.

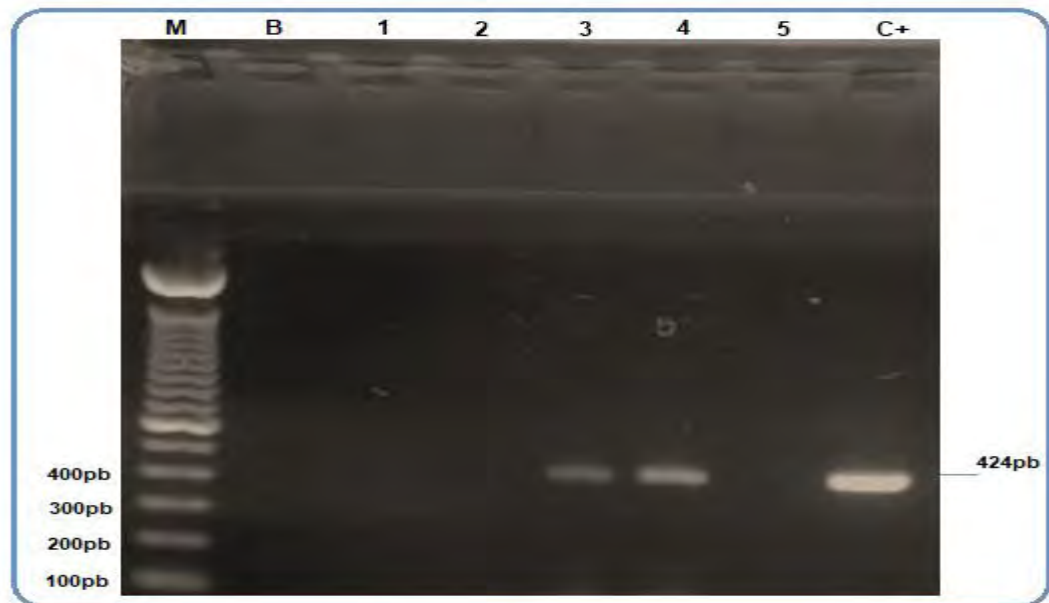


Figura 39. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (1 -5) con primers de delfín, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (1 -5) muestras de atún enlatado, (C+) control positivo – delfín

En la Figura 40, se muestra el gel de electroforesis al 1.5% de los productos de la PCR de las muestras 6 a 10 (Cuadro 16) con primers de delfín, en el cual, solo se presenta el amplificado de 424pb en la muestra “C+” (control positivo) que es carne de delfín y no se visualiza otro amplificado en las muestras de atún enlatado, comprobando que de la muestra 6 a la 10, no se tiene presencia de delfín en sus composiciones, verificando que no se tuvo ningún tipo de contaminación ya que la muestra “Blanco” no presentó amplificado.

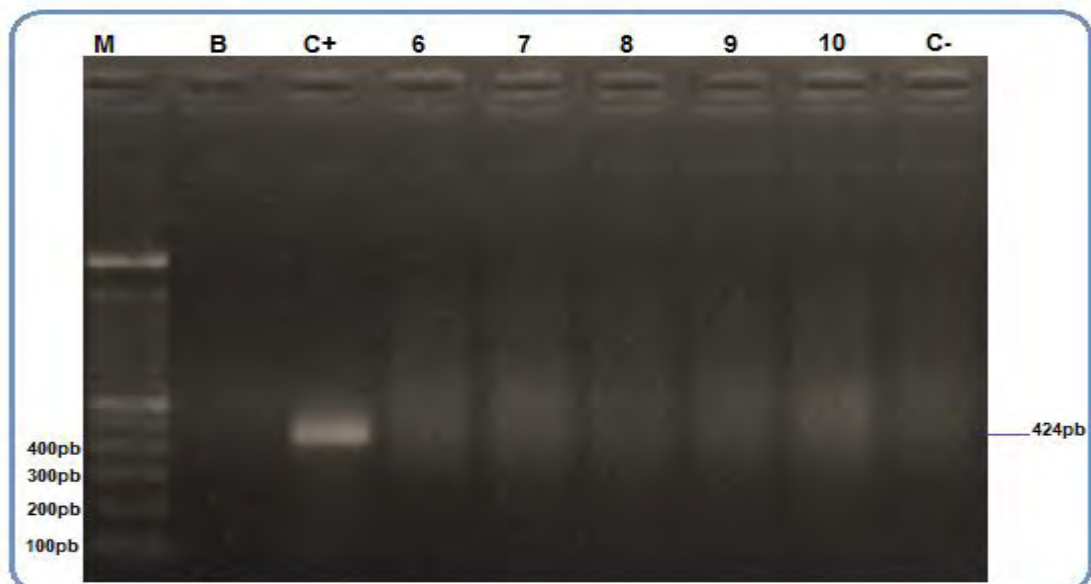


Figura 40. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (6 -10) con primers de delfín, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo - delfín, (6-10) muestras de atún enlatado, (C-) control negativo – atún

La Figura 41, representa el gel de electroforesis al 1.5% de los productos de la PCR de las muestras 11 a 15 (Cuadro 16) de atún enlatado con los primers de delfín, donde se puede visualizar un amplificado de 424pb en la muestra 13 correspondiente al atún enlatado “M”, comprobando que el “C+” que es delfín, también se visualiza el amplificado de 424pb, demostrando que la muestra 13 tiene presencia de carne de delfín dentro de su composición, detectando la adulteración del producto ya que durante la experimentación no se tuvo contaminación en las muestras, verificando que la muestra “Blanco” no presentó amplificación.

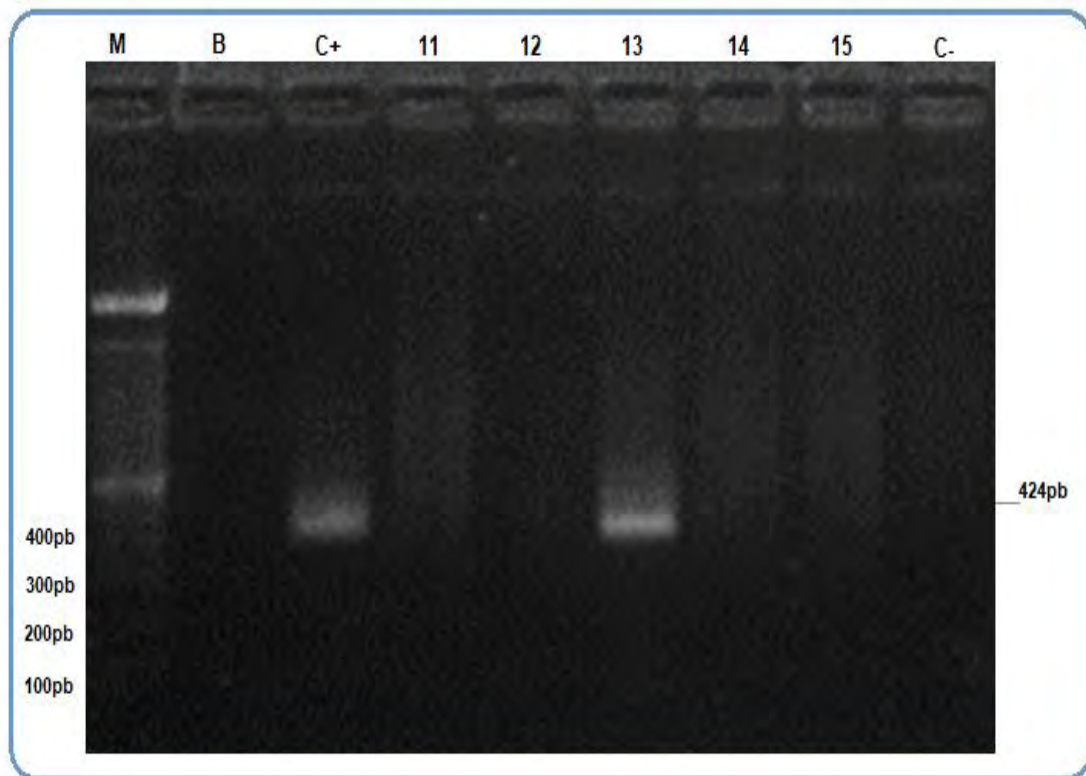


Figura 41. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de las muestras de atún enlatado (11 -15) con primers de delfín, (M) marcador de peso molecular de 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo - delfín, (11-15) muestras de atún enlatado, (C-) control negativo – atún

En la Figura 42, se muestra el gel de electroforesis al 1.5% de los productos de la PCR de las muestras 3, 4 y 13 de atún enlatado correspondientes a las marcas “C”, “D” y “M” respectivamente, que presentaron amplificado de 424pb con los primers de delfín, verificando que nuevamente se obtiene el amplificado de 424pb, no presentado contaminación al realizar la experimentación ya que en la muestra “Blanco” no se visualiza amplificado y la muestra “C+” que es carne de delfín de igual manera presenta amplificación en la sección 424pb, asegurando que la prueba se realizó correctamente y que las muestras 3,4 y 13 de atún enlatado, tiene presencia de carne de delfín dentro de su composición.

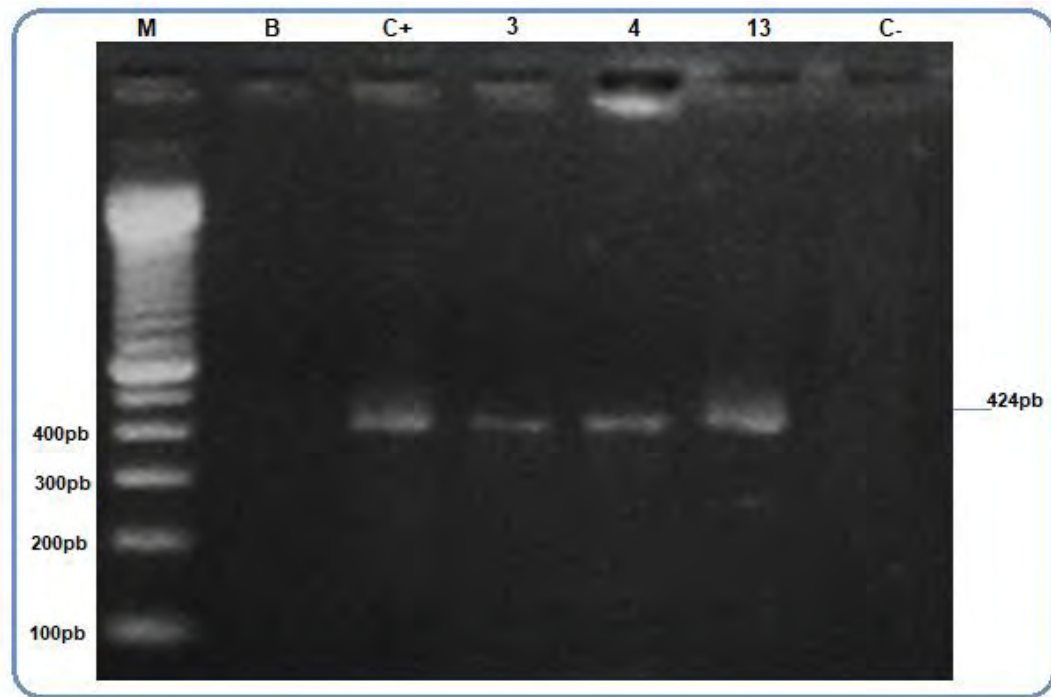


Figura 42. Gel de agarosa al 1.5% de la PCR de la comprobación de las muestras de atún enlatado que amplificaron con primers de delfín, (M) marcador, (B) blanco, (C+) control positivo- delfín, (3, 4 y 13) muestras de atún enlatado, (C-) control negativo – atún

Como se representa en la Figura 42, las bandas de amplificación propias de las marcas que contiene carne de delfín y por ende se clasifican como productos adulterados, ya que, en la legislación alimentaria mexicana, se aplican diversas normas para este tipo de situaciones, con la finalidad de que el consumidor tenga la certeza de que el producto a consumir es de la calidad deseable y seguro a la ingesta del consumidor.

Para ello la Procuraduría Federal del consumidor (PROFECO) desarrollo un dictamen general, en el cual se elabora un dictamen sobre el atún enlatado donde se describe:

En cuanto a la calidad, los alimentos enlatados deben cumplir con normas oficiales referentes al etiquetado, contenido neto y al envasado; así como con una norma mexicana referente el consumo de los productos del mar enlatados⁴².

Las normas son las siguientes⁴²:

- **NOM 084 SCFI 1994.** Información comercial-Especificaciones de información comercial y sanitaria para productos de atún y bonita preenvasados.
- **NOM 002 SCFI 1993.** Productos preenvasados contenido neto tolerancias y métodos de verificación.
- **NMX F 220 1982.** Alimentos para uso humano. pesca. Atún y pescados similares en aceite enlatados

En ellas se describe de forma resumida⁴²:

1. Que se utilicen materias primas e ingredientes de calidad.
2. Los aditivos permitidos.

3. Los factores que determinan la calificación del contenido y del envase.
4. La lista de ingredientes en la etiqueta.
5. Identificación del lote de fabricación.
6. Los datos del fabricante.
7. La fecha de consumo preferente.

RECOMENDACIONES AL COMPRAR

1. Revisa la etiqueta del producto para ver si es el que deseas adquirir.
2. La variedad de atún blanco, por lo general, tiene un precio mayor.
3. Lee la fecha de caducidad o de consumo preferente (Por lo regular son dos años desde su elaboración).
4. Revisa la lata que no esté golpeada, abombada u oxidada.
5. Una vez abierta la lata, conserva su contenido en un recipiente de cristal para que no absorba los olores del refrigerador.
6. Tapa muy bien el frasco para que tampoco el olor de las sardinas impregne a los demás alimentos.
7. Nunca los guardes en su misma lata en el refrigerador.

La información obligatoria que debe constar en las etiquetas de los productos enlatados es la denominación de venta (tipo de pescado, presentación y medio de cobertura), identificación de la empresa, lista de ingredientes, contenido neto y masa drenada, código de lote y fecha de consumo preferente⁴².

Con la información que se muestra anteriormente se verifica la información que debe tener la etiqueta de las latas de atún, y con los datos obtenidos en la experimentación se comprueba la adulteración de las marcas de atún enlatado “C”, “D” y “M”, describiendo las características de cada una de las marcas que amplificaron en la detección de carne de delfín, observando que no se tiene el etiquetado adecuado, y no se describe en su totalidad la composición y por ende se dictaminan como productos adulterados.

CAPITULO IV. DISCUSIÓN

Para la realización de este proyecto, se llevó a cabo la extracción de ADN de las muestras biológicas de lomo de atún, hígado de delfín y carne de tiburón, las primeras 2 muestras (atún y delfín) se utilizaron para los controles positivos de los geles de electroforesis en la detección de carne de atún y delfín en las 15 muestras de atún enlatado.

La extracción de ADN de atún y delfín se llevó a cabo por el método de Sambrook, mientras que para la extracción de las 15 muestras de atún enlatado se desarrolló usando 2 métodos, el primero consistía en el uso del sistema de purificación Kit Wizard® Sistema magnético de purificación de ADN para alimentos y el segundo se realizó por el Kit de PCR directo de tejido animal, al utilizar ambos métodos se asegura la total extracción de las muestras ya que al ser un producto altamente procesado, teniendo un tratamiento térmico y la adición de sustancias como agua, aceite y los aditivos que lo conforman para su conservación, inhibían la PCR al realizar el método de Sambrook para la extracción y la metodología convencional (Master Mix) de la PCR, por tal motivo para este proyecto se implementaron los 2 métodos (Kit Wizard® Sistema magnético de purificación de ADN para alimentos y Kit de PCR directo de tejido animal) complementarios para la obtención de los resultados requeridos de la experimentación.

Posteriormente se efectuó la cuantificación del ADN extraído de atún, delfín y tiburón, teniendo altas concentraciones de ADN que van desde los 5200ng/μl hasta 350ng/μl, se realizó por duplicado cada muestra con variación de concentraciones insignificativas entre las repeticiones, debido a los altos valores se diluyeron las muestras obteniendo concentraciones de 60ng/μl – 100ng/μl para la realización de la PCR.

Los primers que se utilizaron para determinar presencia de carne y atún, se diseñaron por medio de programas bioinformáticos, en base al ADN mitocondrial de las especies (Anexo 6), y conforme a sus características proporcionadas por los programas, también se diseñaron los programas de la PCR que se emplearían siguiendo la metodología del Kit de PCR directo, cambiando únicamente la temperatura de hibridación de los primers por las temperaturas descritas en las hojas de especificaciones (Anexo 3).

Se utilizó la técnica de electroforesis para confirmar que los primers amplificaban para atún y delfín y el tamaño de las bandas de amplificación era el descrito, por lo que se usó el ADN extraído de atún y delfín como controles positivos,

realizando por duplicado cada muestra, como se presenta en la Figura 33, visualizando los amplificadores de 424pb para delfín y 468pb para atún.

Para la comprobación de la especificidad de los primers diseñados de atún y delfín, se elaboró la PCR correspondiente a cada pareja con sus respectivas condiciones.

En la prueba de especificidad de los primers de atún, se realizó la amplificación con las muestras de atún, delfín y tiburón, para visualizar los productos de la PCR se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% como se muestra en la Figura 35, donde se observan 3 bandas de 468pb correspondientes a los carriles 1 (atún), 2 (delfín), 3 (tiburón), esto comprueba que los primers diseñados para atún no son específicos, de tal manera que se usaron en la experimentación para corroborar que hay presencia de atún en el atún enlatado.

Para rectificar la especificidad de los primers diseñados para la detección de carne de delfín en el atún enlatado, se llevó a cabo con muestras de delfín como control positivo, atún, tiburón, cerdo, bovino, plátano, fresa y tomate verde, las 5 últimas muestras se tomó el material genético de proyectos de extracción de ADN anteriormente realizados, para comprobar la especificidad de los primers se desarrolló la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para el análisis de los productos de la PCR, como se muestra en la Figura 34, se visualiza únicamente un banda de 424pb correspondiente al carril “C+”, donde se colocó muestra de delfín y no se aprecia ningún otro amplificado en los demás carriles que involucra a las muestras de las otras especies, demostrando que los primers diseñados son específicos para detectar delfín y no amplifican para otras especies, determinando que la presencia de las especies que no tuvieron amplificación no interfieren en los resultados obtenidos en la detección de carne de delfín en las 15 muestras de atún enlatado usadas en la experimentación ya que únicamente amplifican para delfín.

Los resultados obtenidos de los geles de electroforesis para la detección de carne de delfín en las marcas de atún enlatado, primero se evaluó que los 15 muestras tuvieran atún en su composición, como se muestra en las Figuras 36, 37 y 38, visualizando que las 15 marcas se observa el amplificado de 468pb, determinando que hay presencia de carne de atún, para la determinación de carne de delfín, se desarrolló el mismo procedimiento como se presenta en las figuras 39, 40 y 41, que observa se muestra el amplificado de 424 en el control positivo (delfín) y en las marcas 3, 4 y 13, constatando que hay presencia de carne de delfín en dichas marcas de atún enlatado.

Se deduce que la técnica es apropiada para la detección de carne de delfín en atún enlatado, corroborando que las marcas que presentaron amplificación se dictaminan como adulteradas, presentando ingredientes adicionales no establecidos en la etiqueta como deberían de prescribirse para conocer su completa composición, como

se establece en las normas oficiales mexicanas NOM 084 SCFI 1994, NOM 002 SCFI 1993, NMX F 220 1982, para productos de atún.

Los resultados que se obtuvieron, con los que se han realizados en trabajos anteriores relacionados al tema, muestran la importancia de desarrollar estudios confiables y precisos en relación a la autenticación de especies en los alimentos, con técnicas basadas en el uso de ADN, presentando un panorama más amplio de la conformación de un alimento, otorgando seguridad y confianza al consumidor.

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La utilización de la técnica de PCR en la autenticación de especies y la detección de adulteraciones, es una de las más confiables y específicas ya que se requiere del uso del material genético de la especie que se pretende identificar en muestras “poco confiables” que puedan contener elementos no propios de su composición generando la adulteración del producto; como se describe en el presente proyecto para la detección de carne de delfín en atún enlatado.

Por lo cual para iniciar con la metodología se logró extraer el ADN de las 15 muestras de atún enlatado, realizando 3 lavados previos a cada muestra y utilizando 2 métodos (Kit Wizard® Sistema magnético de purificación de ADN para alimentos y Kit de PCR directo de tejido animal) obteniendo el ADN para la ejecución del análisis con la PCR, al obtener amplificadas se demuestra que no se presentó inhibición de la PCR y se tuvo ADN integro al realizar los 2 métodos para la extracción, de igual manera los primers diseñados con sus respectivos programas de PCR fueron adecuados a las características de los primers permitiendo la visualización de las bandas de amplificación de 424pb para delfín y 468pb para atún.

Por medio de los datos obtenidos de la PCR para la detección de atún en las 15 marcas de atún enlatado, se concluye que en las respectivas muestras empleadas en la experimentación se detecta la presencia de atún, no obstante, sabiendo que los primers diseñados para la detección de esta especie no son específicos, corroborando lo ya mencionado en el etiquetado y en páginas de instituciones gubernamentales (PROFECO) que las 15 marcas de atún contienen atún en su composición.

La técnica diseñada para la detección de carne de delfín en atún enlatado es altamente específica, que no amplifica con otras posibles especies presentes como tiburón, cerdo, bovino, etc. Así que no intervinieron en la autenticación del producto, por ello se comprueba que las muestras analizadas de atún enlatado 3 (“C”), 4 (“D”) y 13 (“M”) presentan adulteración, ya que en su composición tienen presencia de carne de delfín y el contenido de está no se encuentra reportado en su etiqueta.

En general para ser un proyecto más integro, se recomienda aumentar las muestras a analizar de atún enlatado, con la finalidad de proporcionar una respuesta más amplia y concreta con respeto al tema de productos comercializados de atún – mamífero marino, así como determinar la composición nutrimental al consumir carne de delfín, ofreciendo un criterio propio al consumidor sobre los efectos buenos y malos de la ingesta al ser humano, así como también conociendo la composición que ofrece el producto y que sea decisión propia el consumirlo o no, involucrando que el principal motivo por el cual no se pesca el delfín para consumo es por la preservación de la

especie, considerada una de las más protegidas por diversas asociaciones “Greenpeace” y de protección a los animales.

Siendo un animal inteligente que otorga diversos beneficios al estar en contacto con el ser humano y que algunas especies de delfín están en peligro de extinción, se debería implementar un sistema más estricto en cuestión de la pesca ilegal o de la mala actividad pesquera, que permita el bienestar de los delfines al realizarse la pesca de atún con el objetivo de no ocasionarles grandes lesiones y el mayor de los casos la muerte.

De tal manera que el presente proyecto se puede emplear como una herramienta o un procedimiento adicional para el análisis de calidad del atún enlatado, añadiendo parámetros más estrictos a los estipulados con el fin de preservar y proteger las especies animales involucradas en su proceso de elaboración, brindando un producto totalmente confiable al consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asociación Salud y vida. com. 2016. Programa para el Consumo de Pescado Fresco. Obtenido de: <http://www.asociacionsaludyvida.com/archivos/PESCADO%20FRESCO.pdf>. (Accesado en Octubre de 2016).
2. Atún - Propiedades del atún. (2017). Alimentos.org.es. Obtenido de: <http://alimentos.org.es/atun>. (Accesado en Enero de 2017).
3. Beltrán P. Rodolfo, Sofia Ortega García, Tomás Campos Alfaro, Alejandro Tome Vázquez y F. Gerardo Bravo Mendoza. 2001. Desarrollo de la industria atunera en Mazatlán, Sinaloa. *El Vigía* 6 (12).
4. Biblioteca.upibi.ipn.mx Obtenido de: <http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Manual%20del%20Laboratorio%20de%20Biotecnologia%20Molecular.pdf>. (Accesado en Marzo de 2017).
5. Bossier, P. Authentication of Seafood Products by DNA Patterns. *Journal of Food Science*. (64), 2. 189-193. 1999.
6. Carpenter, K. 2002. The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 3: Bony fishes part 2 (Opisthognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Roma. 1375-2127.
7. Caudillo, E. 2005. Los embargos atuneros en México sus impactos y actores sociales. UNAM. Casa Juan Pablos. México. 215.
8. COLLETTE, B. B. 1978. Adaptations and systematics of the mackerels and tunas. In Sharp, G.D. y A. E. Dizon (editores). *The Physiological Ecology of Tunas*:7-39.
9. Cuentame.inegi.org.mx. 2016. Economía. Pesca. Obtenido de <http://cuentame.inegi.org.mx/Economia/primarias/pesca/default.aspx?tema=E>. (Accesado en Noviembre de 2016).
10. DOF - Diario Oficial de la Federación. (2017). Dof.gob.mx. Obtenido de: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5391713. (Accesado en Marzo de 2017).
11. Dreyfus, M. Robles, H. 2006. Atún del Océano Pacífico. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México Evaluación y Manejo. SAGARPA. México. 39-61.
12. Ecosafetuna.org. 2016. Por qué el atún "Dolphin-Safe" de EE.UU. no lo es - Campaña de Atún Eco-Safe. Obtenido de: <http://www.ecosafetuna.org/es/case-for-ecosafe-tuna/why-dolphin-safe-tuna-isnt.html>. (Accesado en Noviembre de 2016).
13. Eleconomista.com.mx. 2016. México gana a EU en la OMC conflicto atunero. Obtenido de: <http://eleconomista.com.mx/industrias/2011/05/22/mexico-gana-eu-omc-conflicto-atunero>. (Accesado en Octubre de 2016).
14. Fao.org. 2016. FAO Pesca Capturas nominales mundiales del atún. Obtenido de: <http://www.fao.org/fishery/statistics/tuna-catches/es>. (Accesado en Noviembre de 2016).

15. Flores, K. Silva, K. 2006. Embargo Atunero: Una forma de Proteccionismo Estadounidense. Tesis de Licenciatura. Instituto Politécnico Nacional. 128.
16. Gbcbiotech.com. 2016. Red de Genómica, Pesca y Acuicultura para la Innovación. Obtenido de: <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/especies/peces/atun.html>. (Accesado en Octubre de 2016).
17. IBT.unam.mx. Obtenido de: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>. (Accesado en Abril de 2017).
18. Idtdna.com En: Idtdna.com. 2016. PrimerQuest Tool | IDT. Obtenido de: <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>. (Accesado en Octubre de 2016).
19. Inapesca.gob.mx. 2016. Establece SAGARPA plan de manejo pesquero para el atún aleta amarilla del océano Pacífico Mexicano. Obtenido de: <http://www.inapesca.gob.mx/portal/sala-de-prensa/boletines/390-establece-sagarpa-plan-de-manejo-pesquero-para-el-atun-aleta-amarilla-del-oceano-pacifico-mexicano>. (Accesado en Noviembre de 2016).
20. Ishikawa, Karou. 1994. "Introducción al control de calidad ". Ed. Díaz de santos; Madrid España.
21. Izt.uam.mx. 2016. APLICACIONES PCR. Obtenido de: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/pacopp/8-APLICACIONES_PCR.pdf. (Accesado en Octubre de 2016).
22. James, J. 1994. The tuna-dolphin controversy in the eastern pacific ocean: Biological, economic, and political impacts. *Ocean Development and International Law*. 25(1). 1-30.
23. Jefferson, T. Leatherwood, S. Webber, M. 1993. FAO species identification guide. *Marine Mammals of the world*. Roma. 587.
24. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R y col.(1971) Estudios sobre polinucleótidos. XCVI. Reparar las replicaciones de ADN sintético corto como catalizado por ADN polimerasas. *J Mol Biol* 56 (2): 341 - 361.
25. Ley Protectora de Animales del Estado de México. 2016. Ley Protectora de Animales del Estado de México. Obtenido de: http://www.cuautitlan.unam.mx/descargas/cicuae/ley_proteccion_animales_estado_de_mexico.pdf. (Accesado en Noviembre de 2016).
26. Lockley, A.K. y Bardsley, R.G. DNA Based Methods for Food Authenticaaction, *Trends in Food Science and Technology*. 11, 67-77. 2000.
27. Luque, J. y Herraes, A. *Biología Celular e Ingeniería Genética*. Madrid, España, Harcourt, 2001.
28. Mackie, I.M. et. Al. Challenges in the identification of Species of Canned Fish. *55Trends in Food Science and Technology*. 10, 99-114. 1999.
29. Mexican Business Web. 2014. Sinaloa, Colima y Chiapas, principales productores de atún. Obtenido de: <http://www.mexicanbusinessweb.mx/59825/sinaloa-colima-y-chiapas-principales-productores-de-atun/>. (Accesado en Diciembre de 2016).

30. Meyer, R. y Candrian, U. PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 29, 1-9. 1996.
31. Mullis K. B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique* 48: 579-82.
32. Ncbi.nlm.nih.gov. 2016. National Center for Biotechnology Information. Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Accesado en Septiembre de 2016).
33. Nube.siap.gob.mx. 2016. Publicaciones SIAP 2016. Obtenido de: http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016. (Accesado en Diciembre de 2016).
34. OMC | Medio Ambiente - Diferencia 4. 2017. Wto.org. Obtenido de: https://www.wto.org/spanish/tratop_s/envir_s/edis04_s.htm. (Accesado en Febrero de 2017).
35. OMC | Solución de diferencias - las diferencias - DS381. Obtenido de: https://www.wto.org/spanish/tratop_s/dispu_s/cases_s/ds381_s.htm. (Accesado en Febrero de 2017).
36. Páez, R. 1997. Mercado global del atún y embargo estadounidense (un caso de neoproteccionismo comercial). *EPSSA*. México. 394.
37. Panet A, Khorana HG (1974) Estudios sobre polinucleótidos. La vinculación de las plantillas de desoxirribucleucléotidos a la celulosa y su uso en su replicación. *J Biol Chem* 249 (16): 5213 – 5222.
38. PCR Basics | Thermo Fisher Scientific. (2017). *Thermofisher.com*. Obtenido de: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>. (Accesado en Abril de 2017).
39. Pescadosymariscos.consumer.es. 2016. Atún | Propiedades nutritivas | Pescados y mariscos | CONSUMER EROSKI. Obtenido de: <http://pescadosymariscos.consumer.es/propiedades-nutritivas>. (Accesado en Noviembre de 2016).
40. Portilla, G. 2010. El conflicto del embargo atunero México-Estados Unidos en la historia de la relación bilateral y su situación actual. *Razón y Palabra*. México. (62).
41. PROFECO. gob. 2016. Atún Enlatado. Obtenido de: http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_05/atun_mzo05.pdf. (Accesado en Noviembre de 2016).
42. Profeco.gob.mx. Obtenido de: https://www.profeco.gob.mx/encuesta/brujula/bruj_2010/bol163_lata.asp. (Accesado en Noviembre de 2016).
43. Profepa.gob.mx (2017). Obtenido de: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf. (Accesado en Abril de 2017).
44. Red de Genómica, Pesca y Acuicultura para la Innovación. (2017). *Gbcbiotech.com*. Obtenido de: http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/pesca_en_mexico.html. (Accesado en Febrero de 2017).

45. Salud.gob.mx. 2016. 03-03-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-028-SSA1-1993, Bienes y servicios. Obtenido de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/028ssa13.html>. (Accesado en Noviembre de 2016).
46. Sambrook, J. y Russel, D. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. EUA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
47. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, “México es uno de los principales productores de atún en el mundo”, Boletín de prensa, 30 de septiembre de 2011.
48. Secretaría de Agricultura, P. (2017). Pesca de atún, actividad generadora de alimentos y recursos. gob.mx. Obtenido de: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/pesca-de-atun-actividad-generadora-de-alimentos-y-recursos>. (Accesado en Febrero de 2017).
49. SEMARNAP. 1998. Pesca del atún y protección del delfín: El embargo atunero de 1991. Cuaderno de trabajo. México. 49.
50. Shibata D., W. J. Martin y N. Arnheim. 1988. Analysis of DNA Sequences in FortyYear-Old Paraffin-embedded Thin-Tissue. Cancer Research 48: 4564-4566.
51. Thermofisher.com. (2017). Phire Animal Tissue Direct PCR Kit (without sampling tools) - Thermo Fisher Scientific. Obtenido de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F140WH>. (Accesado en Abril de 2017).

ANEXOS

ANEXO 1. KIT WIZARD® SISTEMA MAGNÉTICO DE PURIFICACIÓN DE ADN PARA ALIMENTOS



Technical Bulletin

**Wizard® Magnetic
DNA Purification System
for Food**

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS EF3750 AND EF3751.

PRINTED IN USA.

www.promega.com



Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food

All technical literature is available on the Internet at www.promega.com/tbs
Please visit the web site to verify that you are using the most current version of this
Technical Bulletin. Please contact Promega Technical Services if you have questions on use
of this system. E-mail techserv@promega.com.

1. Description.....	1
2. Product Components and Storage Conditions	3
3. Protocols	4
A. Sample Preparation Using 200mg of Starting Material.....	4
B. Sample Preparation Using 1g of Starting Material	6
C. Purification of DNA from Vegetable Oils	8
D. Purification of DNA from Lecithin and Chocolate	10
E. Protocol Notes.....	11
4. Composition of Buffers and Solutions	13
5. Related Products	13

1. Description

The isolation of DNA from food using traditional protocols can be a lengthy and potentially hazardous process. Further, many procedures yield relatively low amounts of DNA or have substantial carryover of inhibitors. The Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food^(b) avoids the use of lengthy incubations with Proteinase K, the use of hazardous organic solvents such as chloroform for most samples and eliminates multiple centrifugation steps required for many common food DNA isolation procedures. The system provides a single protocol that works with a wide variety of food items and purifies a representative sample of DNA from food.

The Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food is designed for purification of DNA from a variety of food samples including corn seeds, cornmeal, soybeans, soy flour and soy milk. In addition, DNA can be purified from processed food such as corn chips, chocolate and chocolate-containing foods; lecithin and vegetable oils may also be used with the appropriate optimized protocols. The DNA purified from many of these samples can be used in PCR^(b)-based testing for Genetically Modified Organism (GMO) DNA sequences including quantitative analysis using the TaqMan® instrument.

Note: The protocols for lecithin and chocolate use hexanes and chloroform.

Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road • Madison, WI 53711-5399 USA
Toll Free in USA 800-356-9526 • Phone 608-274-4330 • Fax 608-277-2516 • www.promega.com

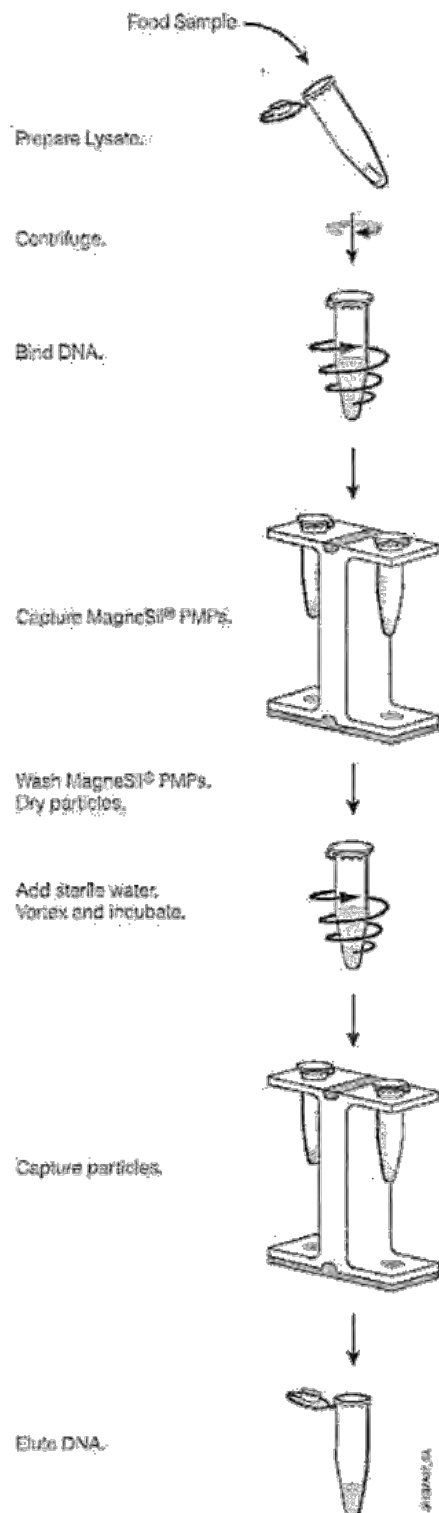


Figure 1. Schematic of DNA isolation using the Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food.



The Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food utilizes MagneSil® Paramagnetic Particles® (PMPs). Paramagnetic particles can be considered a "mobile solid phase". Unlike column-based systems, the binding of nucleic acids to magnetic particles can occur in solution, resulting in increased binding kinetics and binding efficiency. Particles can also be completely resuspended during the wash steps of a purification protocol, thus enhancing the contact with and removal of contaminants, which increases nucleic acid purity.

Selected Citations Using the Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food

- Bailey, A.M. *et al.* (2003) Robotic nucleic acid isolation using a magnetic bead resin and an automated liquid handler for biological agent simulants. *J. Assoc. Lab. Automation* 8(6), 113-20.

This study describes the development of a system that can rapidly and accurately detect traces of biological agents from environmental samples. Using *Erwinia herbicola* and *Bacillus subtilis* var. niger as models for potential biological warfare agents, a method for DNA extraction using the Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food, MagneSil® Blood Genomic, Max Yield System, and a combination of the two was automated on a Beckman Coulter Biomek® FX robotic liquid handling system.

For additional peer-reviewed articles that cite use of the Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food, visit: www.promega.com/citations/

2. Product Components and Storage Conditions

Product	Size	Cat.#
Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food	200 preps	FF3750
	400 preps	FF3751

Cat.# FF3750 contains sufficient reagents to perform approximately 200 × 200mg preparations. Cat.# FF3751 contains sufficient reagents to perform approximately 400 × 200mg preparations. Cat.# FF3750 includes:

- 100ml Lysis Buffer A, for Food
- 100ml Lysis Buffer B, for Food
- 1ml RNase A
- 150ml Precipitation Solution, for Food
- 19ml MagneSil® Paramagnetic Particles

Note: 70% ethanol wash solution is not included. Directions for preparing solutions are provided in Section 4.

Storage Conditions: Store all components at room temperature (20–25°C).



Do not freeze MagneSil® Paramagnetic Particles.



3. Protocols

The Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food assay procedures have been optimized for the purification of DNA from soy flour, soybeans, cornmeal, corn seeds and soymilk. Lysis Buffers, Precipitation Solution, MagneSil® PMPs and elution volumes may need to be optimized for other sample types depending on the characteristics of the starting material (DNA content, inhibitors, etc.). Some sample types may require a minimum of 1g of starting material per purification. Optimized protocols are included for lecithin, chocolate and oil. See Sections 3.C-E for protocol suggestions for these and other starting materials.

Fine particulate or liquid samples can be processed directly. Solid samples need to be finely ground for optimum yield. An economic choice for grinders may be a home coffee grinder. Other grinders, such as the Mixer Mill MM 200 (Retsch/Brinkmann) may be used if higher throughput is required. Be careful to clean the grinder with detergent and alcohol between samples to eliminate cross-contamination of samples.

The use of disposable rubber gloves is recommended to minimize potential contamination and as protection for the laboratory worker.

3.A. Sample Preparation Using 200mg of Starting Material

This protocol is intended to provide directions for isolating genomic DNA from up to 200mg (dry weight) of food material per isolation. Fifty microliters of MagneSil® PMPs (Step 8) allows the purification of up to 5µg of DNA eluted in 100µl of water (Step 14). For samples with low amounts of DNA (e.g., corn chips, cornflakes and soy milk) the procedure for 1g samples is recommended (Section 3.B). For oil samples, use the protocol provided in Section 3.C. For lecithin and chocolate samples, use the protocol provided in Section 3.D.

Materials to Be Supplied by the User

(Solution compositions are provided in Section 4.)

- 70% ethanol wash solution
- ethanol, 95% or 100%
- disposable rubber gloves
- pipette tips (ART®)
- tabletop centrifuge (capable of 13,000 × g)
- vortex mixer
- Nuclease-Free Water (Cat.# P1193)
- 2ml microcentrifuge tubes
- MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand (for 2 tubes, Cat.# Z5332; for 12 tubes, Cat.# Z5342)
- isopropanol



3. Protocols

The Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food assay procedures have been optimized for the purification of DNA from soy flour, soybeans, cornmeal, corn seeds and soymilk. Lysis Buffers, Precipitation Solution, MagneSil® PMPs and elution volumes may need to be optimized for other sample types depending on the characteristics of the starting material (DNA content, inhibitors, etc.). Some sample types may require a minimum of 1g of starting material per purification. Optimized protocols are included for lecithin, chocolate and oil. See Sections 3.C-E for protocol suggestions for these and other starting materials.

Fine particulate or liquid samples can be processed directly. Solid samples need to be finely ground for optimum yield. An economic choice for grinders may be a home coffee grinder. Other grinders, such as the Mixer Mill MM 200 (Retsch/Brinkmann) may be used if higher throughput is required. Be careful to clean the grinder with detergent and alcohol between samples to eliminate cross-contamination of samples.

The use of disposable rubber gloves is recommended to minimize potential contamination and as protection for the laboratory worker.

3.A. Sample Preparation Using 200mg of Starting Material

This protocol is intended to provide directions for isolating genomic DNA from up to 200mg (dry weight) of food material per isolation. Fifty microliters of MagneSil® PMPs (Step 8) allows the purification of up to 5µg of DNA eluted in 100µl of water (Step 14). For samples with low amounts of DNA (e.g., corn chips, cornflakes and soy milk) the procedure for 1g samples is recommended (Section 3.B). For oil samples, use the protocol provided in Section 3.C. For lecithin and chocolate samples, use the protocol provided in Section 3.D.

Materials to Be Supplied by the User

(Solution compositions are provided in Section 4.)

- 70% ethanol wash solution
- ethanol, 95% or 100%
- disposable rubber gloves
- pipette tips (ART®)
- tabletop centrifuge (capable of 13,000 × g)
- vortex mixer
- Nuclease-Free Water (Cat.# P1193)
- 2ml microcentrifuge tubes
- MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand (for 2 tubes, Cat.# Z5332; for 12 tubes, Cat.# Z5342)
- isopropanol



Before you begin, prepare wash solution (Section 4).

1. Weigh 1g of material and place in a 50ml conical tube.
2. With the tube tilted to one side and the dry material covering the side of the tube, add 2.5ml of Lysis Buffer A and 25 μ l of RNase A to the sample. Cap the tube and mix by vortexing.

Note: Depending on the volume and characteristics of the starting material, the volume of lysis buffer may have to be adjusted. To promote ease of sample handling, we recommend that the sample remain at the side of the tube. Should the sample material clump in the bottom of the tube and the material cannot be resuspended by vortexing, a pipette tip may be used to manually resuspend the sample.

3. Add 1.25ml of Lysis Buffer B and vortex for 10–15 seconds to mix. Lay the capped tube on its side so the material coats the side of the tube.
4. Incubate for 10 minutes at room temperature (22–25°C).
5. Add 3.75ml of Precipitation Solution, then vortex vigorously.

Note: For most samples, the mixture will be green in color at this point. The sample should be evenly suspended in the mixture. If vortexing is not effective, the tube may be shaken vigorously to resuspend material. A clean small pipette tip may also be used to break up clumps.

6. Spin in a centrifuge for 10 minutes at 3,000–5,000 $\times g$.

Note: For 50ml tubes, centrifuge at highest possible speed in a Beckman or Sorvall[®] tabletop centrifuge. If separation is incomplete, extend centrifugation time to 20 minutes.

7. Transfer the supernatant (liquid phase) to a fresh 50ml tube.

Note: If floating material is present on top of the liquid, carefully pipet under it, avoiding aspiration of floating material.

8. Vigorously mix the bottle of MagneSil[®] PMPs for 15–30 seconds. Add 100 μ l of resuspended MagneSil[®] PMPs to the supernatant. Vortex the tube vigorously. Note the volume of liquid in the tube.



MagneSil[®] PMPs must be thoroughly resuspended before being dispensed from the bottle.

Note: Unless more than 10 μ g of DNA is required, no more than 100 μ l of MagneSil[®] PMPs should be used.

9. Add 0.8 volume of isopropanol (e.g., for 4ml of supernatant, add 3.2ml of isopropanol) and invert the tube 10–15 times to mix. Incubate for 5 minutes at room temperature (22–25°C) with occasional mixing. Insert tubes into a PolyATtract® System 1000 Magnetic Separation Stand for 1 minute. Leaving the tube in the stand, discard the liquid phase by decanting into a waste container or by pipetting.
10. Remove tube from the stand and add 1.25ml of Lysis Solution B to the particles. Invert the tube 2–3 times to mix, washing the inner surfaces of the tube as well as the particles. Replace tube on the Magnetic Separation Stand, and allow the particles to separate 1 minute, then remove the liquid as in Step 9.
11. Resuspend the particles in 5.0ml of 70% ethanol wash solution, and place the tube back on the Magnetic Separation Stand for 1 minute. Remove and discard solution as in Step 9.

3.B. Sample Preparation Using 1g of Starting Material (continued)

12. Repeat Step 11 twice for a total of 3 washes. After the final wash, remove and discard as much of the liquid phase as possible using a pipette.
13. Dry the particles at room temperature for 15–30 minutes (or at 65°C for 10 minutes). Drying times may be extended depending on ambient conditions. For more information about drying conditions, see Section 3.E.
14. Add 100–400µl of TE buffer or Nuclease-Free Water, vortex to mix and incubate at 65°C for 5 minutes. Use a smaller amount of elution volume for samples containing smaller amounts of DNA. Insert the tube in the Magnetic Separation Stand for 1 minute. Collect the DNA by leaving the tube in the stand and carefully transferring the liquid phase to a fresh tube.

Note: If more than 100µl of MagneSil® PMPs are used, the volume of Nuclease-Free Water may need to be adjusted.

ANEXO 2. KIT DE PCR DIRECTO DE TEJIDO ANIMAL

Thermo
SCIENTIFIC

PRODUCT INFORMATION
**Thermo Scientific
Phire Animal
Tissue Direct
PCR Kit**

#F-140WH 200 rxns
Lot _____ Expiry Date _____
Store at -20°C

www.thermoscientific.com/onebio

Ordering information

Component	#F-140WH 500 rxns × 20 µL 200 rxns × 50 µL
Phire Hot Start II DNA Polymerase	200 µL
2X Phire Animal Tissue PCR Buffer (includes dNTPs and MgCl ₂)	5 × 1.25 mL
Universal control primer mix (25 µM each)	40 µL
Dilution Buffer	2 × 5 mL
DNARelease Additive	3 × 100 µL

Shipping and storage

Upon arrival, store the components at -20°C. The Dilution Buffer can also be stored at 4°C once it is thawed.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Performance in PCR is tested by the amplification of 7.5 kb fragment from human genomic DNA.

Quality authorized by:  Jurgita Zilinskiene

Rev.3

1. INTRODUCTION

Thermo Scientific™ Phire™ Animal Tissue Direct PCR Kit is designed to perform PCR directly from non-fixed animal derived tissue samples with no prior DNA purification. Tissues such as mouse ear and tail, zebrafish fin and *Drosophila* are suitable starting materials. The samples can either be fresh or stored at -20 °C. A list of animal tissues tested with this kit is available at www.thermoscientific.com/directpcr. The Phire Animal Tissue Direct PCR Kit employs Phire Hot Start II DNA Polymerase, a specially engineered enzyme with a DNA-binding domain that enhances the processivity of the polymerase. Phire Hot Start II DNA Polymerase also exhibits extremely high resistance to many PCR inhibitors found in animal tissues. The Phire Animal Tissue Direct PCR Kit contains reagents and tools for two alternative protocols: direct and dilution protocols. See Section 4.1 for information about protocol options. The kit includes a pair of universal control primers that is compatible with a number of vertebrate species (see section 7). For other species such as *Drosophila* and zebrafish, validated control primer sequences are available at www.thermoscientific.com/directpcr. The kit is recommended for end point PCR protocols.

2. IMPORTANT NOTES

- Use 98 °C for denaturation.
- The annealing temperatures for Phire are different from many common DNA polymerases (such as Taq DNA polymerase). Read Section 6.3 carefully.
- Use 50 µL reaction volume for direct protocols
- Add the sample directly into a PCR reaction instead of an empty tube.
- Clean the sampling tool between each sample.
- The dilution protocol (see 4.1) is recommended:
 - When working with new sample materials or a new primer pair.
 - With difficult samples or long amplicons.
 - When performing multiple reactions from the same sample.

3. GUIDELINES FOR PCR

Carefully mix and spin down all tubes before opening to ensure homogeneity and improve recovery. The PCR setup can be performed at room temperature. Always add the sample last to the reaction. Read Section 4 carefully for sampling guidelines.

Table 1. Pipetting instructions (add items in this order)

Component	20 μ L rxn	50 μ L rxn*	Final conc.
H ₂ O	add to 20 μ L	add to 50 μ L	
2X Pure Animal Tissue PCR Buffer	10 μ L	25 μ L	1X
Primer A	X μ L	X μ L	0.5 μ M
Primer B	X μ L	X μ L	0.5 μ M
Pure Hot Start II DNA Polymerase	0.4 μ L	1 μ L	
Sample (see Section 4) Direct protocol:	-	Amount depends on the sample**	
Dilution protocol:	1 μ L	2.5 μ L	

* 50 μ L reaction volume is recommended for the direct protocol.

** 0.5 mm punch or a small sample of animal tissue

(see www.thermoscientific.com/directpcr)

Table 2. Cycling protocol

Cycle step	2-step protocol		3-step protocol		Cycles
	Temp.	Time	Temp.	Time	
Initial denaturation	98 °C	5 min	98 °C	5 min	1
Denaturation	98 °C	5 s	98 °C	5 s	40
Annealing (see 6.3)	-	-	X °C	5 s	
Extension (see 6.4)	72 °C	20 s \leq 1 kb 20 s/kb >1 kb	72 °C	20 s \leq 1 kb 20 s/kb >1 kb	
Final Extension	72 °C 4 °C	1 min hold	72 °C 4 °C	1 min hold	1

4. GUIDELINES FOR SAMPLE HANDLING

To obtain small and uniform samples, we recommend using punches that are 0.5 mm or 0.35 mm in diameter. If the puncher is to be reused, it is very important to clean the cutting edge properly to prevent cross-contamination between samples. Use 2% NaClO solution for cleaning and cross contamination prevention.

Other ways to take a sample is by cutting with scalpel to obtain 0.35 – 0.50 mm sample. Scalpel must be cleaned properly to prevent cross-contamination between samples.

4.1. Sample types and protocols

This kit is optimized for various animal tissue samples. Please visit www.thermoscientific.com/directpcr to see a list of tested animal tissues and recommendations for sample sizes. With a few exceptions, both direct and dilution protocols are

compatible with all sample types and applications. However, when amplifying longer fragments (e.g. > 500 bp from fish fin tissue or > 1 kb from other tissues) the dilution protocol is recommended. The dilution protocol is also useful when multiple PCR reactions are performed from the same sample or in some challenging applications where template amount is critical and titration is needed. When working with new sample materials or a new primer pair, start with the dilution protocol, as it allows several PCR reactions to be performed from the same sample if optimization is required.

4.1.1. Direct protocol

1. Take a sample of 0.5 mm in diameter from animal tissue by using sampling tool or use a sterile scalpel to cut a very small piece of tissue (e.g. one *Drosophila* wing).
2. Place the sample directly into the PCR reaction (50 μ L of volume). It is recommended to place the sample into the liquid rather than into an empty tube. Make sure that you see the sample in the solution.

Gel electrophoresis

In the direct protocol, it is recommended to use the DNARelease™ Additive in the loading buffer for gel electrophoresis as otherwise cell debris present in the PCR products can cause DNA fragments to get trapped in the agarose gel wells. Mix 100 μ L of DNARelease Additive with 1 mL of gel loading dye. The mix is stable for 2 weeks at +4 °C. For long term use, store the mix at -20 °C. Before agarose gel electrophoresis, add 15 μ L of the pre-mixed gel loading dye into a 50 μ L PCR reaction.

4.1.2. Dilution protocol

Before beginning, warm a heat block to 98 °C.

1. Place the tissue sample into 20 μ L of Dilution Buffer.
2. Add 0.5 μ L of DNARelease Additive. Mix by vortexing the tube briefly, and spin down the solution. If a larger sample is used, adjust the volume of the Dilution Buffer and DNARelease Additive accordingly. Make sure the sample is covered with the solution.
3. Incubate the reaction for 2–5 minutes at room temperature and then place the tube into the pre-heated (98 °C) block for 2 minutes.
4. Spin down the remaining tissue and store the supernatant at -20 °C if not used immediately.

Usually 1 μ L of supernatant is sufficient for a 20 μ L PCR reaction. In some cases the supernatant may have to be diluted 1:10 or 1:100, or the PCR reaction performed in a 50 μ L volume. In the dilution protocol, it is not necessary to use the DNARelease Additive in the gel loading dye.

5. NOTES ABOUT REACTION COMPONENTS

5.1. Enzyme

Phire Hot Start II DNA Polymerase possesses the following activities: 5'→3' DNA polymerase activity and a weak 3'→5' exonuclease activity. When cloning fragments amplified with Phire Hot Start II DNA Polymerase blunt end cloning is recommended. If TA cloning is required, it can be performed by adding A overhangs to the blunt PCR product with Thermo Scientific Tag DNA Polymerase, for example (protocol available at www.thermoscientific.com/pcrcloning).

5.2. Phire Animal Tissue PCR Buffer

The 2X Phire Animal Tissue PCR Buffer has been optimized for Direct PCR from animal tissues. It contains the dNTPs and provides 1.5 mM MgCl₂ concentration in the final reaction.

5.3. Dilution Buffer

The Dilution Buffer has been optimized to release DNA from a wide variety of different animal tissues when supplemented with DNARelease Additive (see Section 5.4). This buffer is also suitable for storing the DNA sample for 4 weeks at +4 °C. For long term storage, it is recommended to transfer the supernatant into a new tube and store at -20 °C.

5.4. DNARelease Additive

DNARelease Additive is required in the gel loading dye when PCR is performed directly from certain tissue samples using the direct protocol. Cell debris present in these PCR products can cause DNA fragments to get trapped in the agarose gel wells. DNARelease Additive eliminates this problem. DNARelease Additive is also used in the dilution protocol to improve the release of DNA from the tissue sample.

5.5. Primers

The recommendation for the final primer concentration is 0.5 μM. The results from primer T_m calculations can vary significantly depending on the method used. Always use the T_m calculator and instructions on our website www.thermoscientific.com/tmc to determine the T_m values of primers and optimal annealing temperature.

6. NOTES ABOUT CYCLING CONDITIONS

6.1. Initial denaturation

In Direct PCR protocols, the initial denaturation step is extended to 5 minutes to allow the lysis of cells, making genomic DNA available for PCR.

6.2. Denaturation

Keep the denaturation time as short as possible. Usually 5 seconds at 98 °C is enough for most templates. Note that the denaturation time and temperature may vary depending on the ramp rate and temperature control mode of the thermal cycler.

6.3. Primer annealing

Note that the optimal annealing temperature for Phire Hot Start II DNA Polymerase may differ significantly from that of Taq-based polymerases. **Always use the T_m calculator and instructions on Thermo Scientific website www.thermoscientific.com/pcrwebtools to determine the T_m values of primers and optimal annealing temperature.** As a basic rule, for primers >20 nt, anneal for 5 seconds at a T_m +3 °C of the lower T_m primer. For primers ≤20 nt, use an annealing temperature equal to the T_m of the lower T_m primer. In some cases, it may be helpful to use a temperature gradient to find the optimal annealing temperature for each template-primer pair combination. The annealing gradient should extend up to the extension temperature (two-step PCR). Two-step cycling without an annealing step is recommended for high-T_m primer pairs (T_m at least 69–72 °C).

6.4. Extension

The extension is performed at 72 °C. The recommended extension time is 20 seconds for amplicons ≤1 kb, and 20 s/kb for amplicons >1 kb.

7. CONTROL REACTIONS

7.1. Direct PCR control reaction using the control primer mix

When using mammalian tissue samples (e.g. mouse tissue), we recommend performing Direct PCR control reactions with both direct and dilution protocols using the control primers supplied with this kit. As a template, use the same tissue material as in the actual experiment. The universal control primer mix contains degenerate primers that amplify a 237 bp fragment of mammalian genomic DNA. The amplified region is a highly conserved non-coding region upstream of the SOX21 gene,¹ and the primers are designed to amplify this region from a wide range of vertebrate species.

Each primer concentration is 25 μM.

Primer #1 (24-mer)

5'- AGCCCTTGGGGASTTGAATTGCTG -3'

Melting point: 73.5 °C

Primer #2 (27-mer)

5'- GCACTCCAGAGGACAGCRGTGTCAATA -3'

Melting point: 72.2 °C (R=A), 75.3 °C (R=G)

Please note that these control primers are not compatible with fish or insect samples. The recommended control primer sequences for *Drosophila* and zebrafish are available at www.thermoscientific.com/directpcr.

Table 3. Pipetting instructions for control reactions.

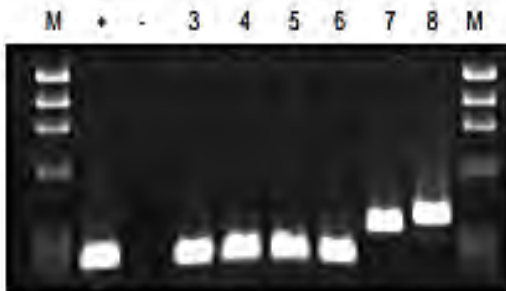
Component	20 μ L rxn	50 μ L rxn*	Final conc.
H ₂ O	add to 20 μ L	add to 50 μ L	
2X Phire Animal Tissue PCR Buffer	10 μ L	25 μ L	1X
Universal control primer mix	0.4 μ L	1 μ L	0.5 μ M
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0.4 μ L	1 μ L	
Sample/Direct protocol:	–	Amount depends on the sample**	
Sample/Dilution protocol:	1 μ L	2.5 μ L	

*50 μ L volume is recommended for direct protocol.

**0.5 mm punch or a small sample of animal tissue (see www.thermoscientific.com/directpcr)

Table 4. Cycling instructions for control reactions using primers included in the kit.

Cycle step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	98 °C	5 min	1
Denaturation	98 °C	5 s	40
Annealing/Extension	72 °C	20 s	
Final Extension	72 °C 4 °C	1 min hold	1



Amplification of the control DNA fragment from various animal tissues. A small sample of tissue was placed directly into a 50 μ L PCR reaction. The fragments in lanes 3–6 were amplified with the control primers included in the kit. Fragments in lanes 7 and 8 were amplified using primers whose sequences are available on www.thermoscientific.com/directpcr. + denotes the positive control reaction with purified DNA and – denotes the no-template control.

7.2. Positive control reaction with purified DNA

When optimizing the reactions, it is recommended to perform a positive control with purified DNA to ensure that the PCR conditions are optimal. If the positive control with purified DNA fails, the PCR conditions should be optimized before continuing further.

7.3. Negative control

It is recommended to add a no-template control to all Direct PCR assays. To monitor the efficiency of cleaning the sampling tool, the cleaned tool can be dipped into the negative control sample. A second negative control performed without dipping the sampling tool is recommended to control for other sources of contamination.

8. Troubleshooting

No product at all or low yield	
General: If the positive control reaction with purified DNA using your own primers does not yield a product: <ul style="list-style-type: none"> • Make sure the pipetting and cycling protocols were performed as recommended. • Check primer design. • Optimize annealing temperature (run a temperature gradient). • Titrate template amount. • Optimize denaturation time. • Increase extension time. Direct protocol: If the actual samples yield no product, but the positive control reaction with purified DNA using your own primers and Direct PCR control reaction are working: <ul style="list-style-type: none"> • Make sure to add DNARElease Additive to gel loading dye. • Use a smaller sample punch (e.g. 0.35 mm). • Use the dilution protocol. 	Dilution protocol: If the actual samples yield no product, but the positive control reaction with purified DNA using your own primers and Direct PCR control reaction are working: <ul style="list-style-type: none"> • Dilute the supernatant 1:10 or 1:100 with H₂O or TE buffer, and use 1 μL as a template in PCR. • Make sure to perform the 2 minute incubation at 98 °C (see 4.1.2, step 3). • Try incubating the dilution reaction at elevated temperature (up to 65 °C) instead of room temperature. • Try crushing the sample in the tube.
Non-specific products - High molecular weight smears	
<ul style="list-style-type: none"> • Increase the annealing temperature or perform temperature gradient. • Reduce the total number of cycles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Decrease primer concentration. • Shorten extension time. • Design new primers.
Non-specific products - Low molecular weight discrete bands	
<ul style="list-style-type: none"> • Increase the annealing temperature or perform a temperature gradient PCR. • Shorten extension time. 	<ul style="list-style-type: none"> • Decrease primer concentration. • Reduce the total number of cycles. • Design new primers.

NOTICER TO PURCHASER:

- The purchase price of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. and foreign patents owned by BIO-RAD Laboratories, Inc., to use this product. No other license under these patents is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product.
- This product is sold under license from Affibody AB, Sweden.

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.thermoscientific.com/onebio for Material Safety Data Sheet of the product.

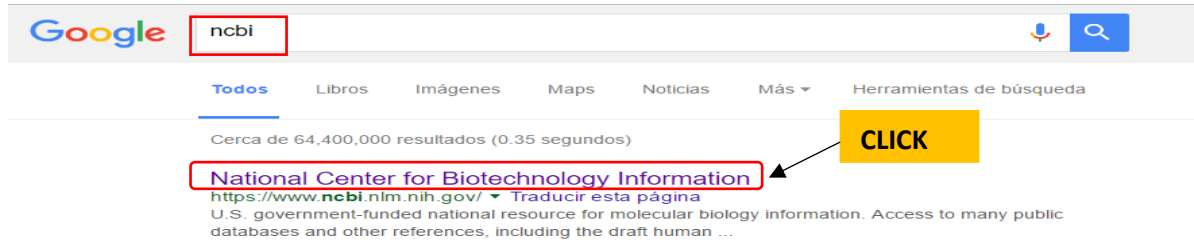
© 2014 Thermo Fisher Scientific, Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

ANEXO 3. DISEÑO DE PRIMERS

METODOLÓGIA

➤ DELFÍN

1. Por medio del buscador (google), entrar a la página de NCBI.



2. Colocar el nombre científico de la especie a estudiar

3. Para buscar una secuencia de ADN, colocar

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Advanced Help

GenBank Send to: Change region shown Customize view

Delphinus delphis isolate Dd10 mitochondrial D-loop, partial sequence

GenBank: AY168605.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: |

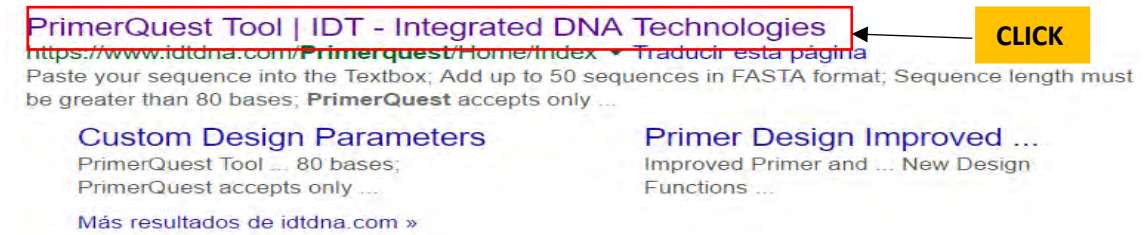
LOCUS AY168605 526 bp DNA linear MAM 15-OCT-2003
 DEFINITION Delphinus delphis isolate Dd10 mitochondrial D-loop, partial sequence.
 ACCESSION AY168605
 VERSION AY168605.1 GI: **27362948**
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Delphinus delphis (saddleback dolphin)
 ORGANISM *Delphinus delphis*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Cranialia; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Cetacea;
 Odontoceti; Delphinidae; Delphinus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 526)
 AUTHORS Matzen Silva,J., Norberto,R., Matos,J., Mendonca,D., Simoes,F. and Azevedo,J.
 TITLE Mitochondrial DNA analysis of common dolphins (*Delphinus delphis*) from the Azores Islands
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 526)
 AUTHORS Matzen Silva,J., Norberto,R., Matos,J., Mendonca,D., Simoes,F. and Azevedo,J.

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence

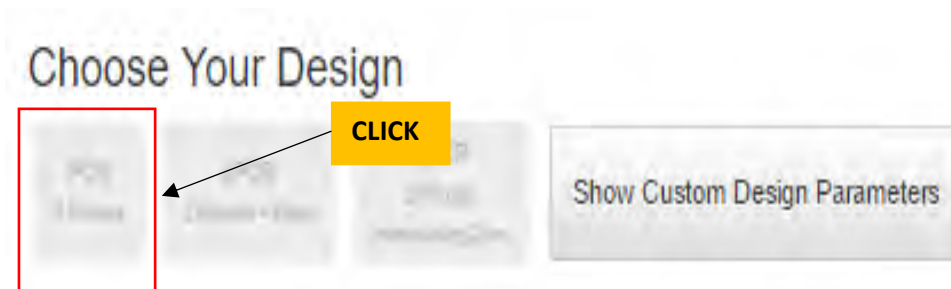
Related information
 Taxonomy

Recent activity
 Delphinus delphis isolate Dd10 mitochondrial D-loop, partial sequen Nucleotide
 Delphinus delphis (1332) Nucleotide
 Selachimorpha (0) Genomes

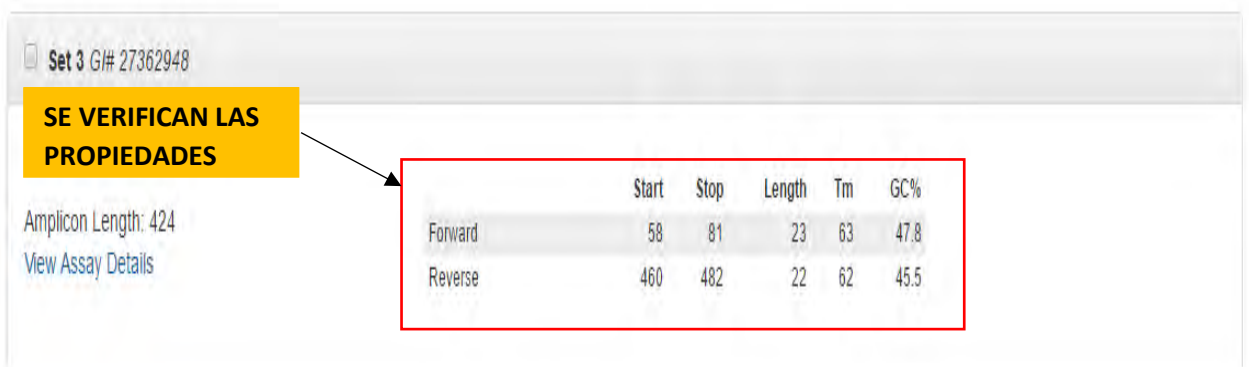
4. Se ingresa el número del GI (el número que se copió) al programa Primerquest Tool.



5. Se ingresa a los primers que te realiza el programa.



6. Se selecciona el primer que cuento con todas las propiedades.



7. Se comprueban los datos, las temperaturas y que realmente amplifique para la especie de interés

Assay Design / Results / Help / About

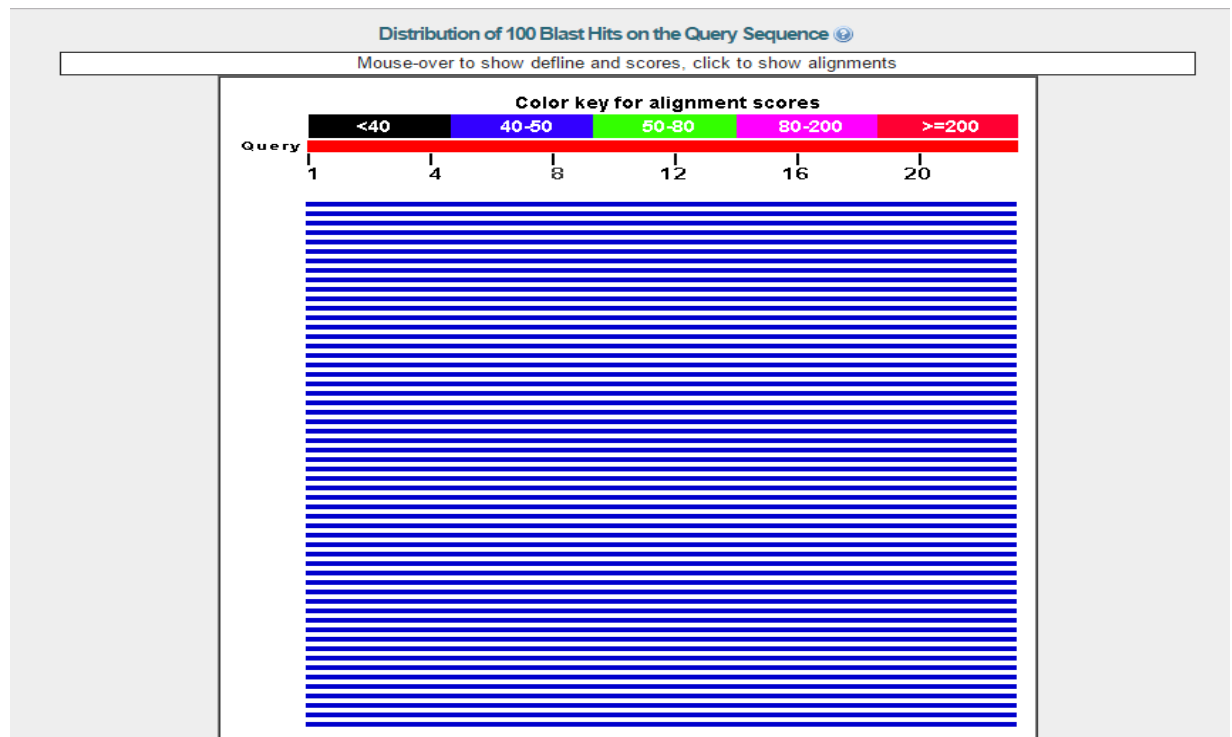
GI# 27362948 Assay Set 3 Details

[Back to Results](#)

Parameter Set: General PCR (Primers only)
Sequence Name: GI# 27362948
Amplicon Length: 424

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	CCACAACATCACAGTACTACGTC (Sense)	58	81	23	63	47.8
Reverse	GGGCCTGATTAAGAACCAGAT (AntiSense)	460	482	22	62	45.5

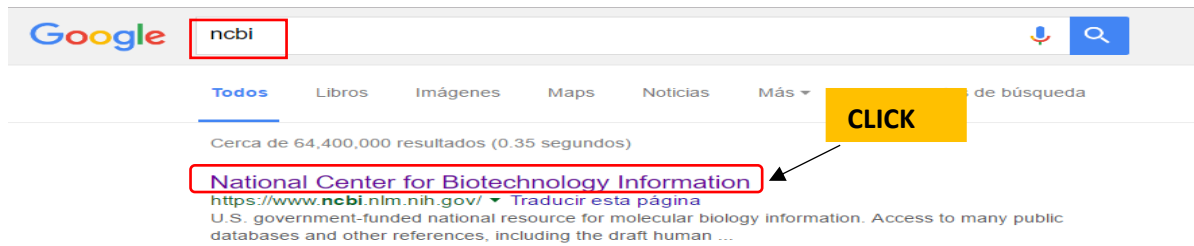
Base	Sequence
1	TCACCCAAAGCTGAAGTCTACATAAACTATTCCTTGAAAAAGCTTATTGTACAATTA CCACAACATCACAGTACTACGTC CAGTATTAAGTAATTTGTT
101	TTAAAAACATTTTACTGTACATATTACATACACATACACATGTACATGCTAATATTTAGTCTCTCCTTGTAATATTTCATATATTCATGCTATGATTAT
201	TGTGCATTTCATTTATTTCCATACGATAAGTTAAAGCTCGTATTAATTATTATTAATTTTACATATTACATAATATGCATCCTTTACATATTATATATC
301	CCCTTCAATTTTCATTTCCATTATACCTATGGTCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGGTGAAACCAAGCACACCGCTGGCAGGATC
401	CCTCTTCTCGCACCGGGCCCATATCTCGTAGGGTAGCTAATAATGATCTTTATAAGTCA CTCTGGTCTTAAATCAGGCC CATTTTAACTTAAATCGCC
501	CGGTCGAAATCTTAAATAAGACATC



8. Posteriormente se verifican los primers con la secuencia mitocondrial (MITOMAP) (Mitomap.org) para comprobar que realmente amplifiquen para la especie de interés (delfín).

➤ ATÚN

1. Por medio del buscador (google), entrar a la página de NCBI.



2. Colocar el nombre científico de la especie a estudiar

3. Para buscar una secuencia de ADN, colocar

Thunnus thynnus voucher TunThy-EM-02 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial

GenBank: EU036523.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

Go to

LOCUS EU036523 1141 bp DNA linear VRT 11-FEB-2016

DEFINITION Thunnus thynnus voucher TunThy-EM-02 cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial.

ACCESSION EU036523

VERSION EU036523.1

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Thunnus thynnus (Atlantic bluefin tuna)

ORGANISM *Thunnus thynnus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Pelagiaria; Scombriformes; Scombridae; Thunnus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1141)

AUTHORS Krey,G., Favre-Krey,L., Leontarakis,P. and Tsangridis,A.

CONSRTH FishTrace

TITLE The sequence of the cytochrome b gene from 50 marine fish species of the North Aegean Sea (Eastern Mediterranean)

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1141)

AUTHORS Krey,G., Favre-Krey,L., Leontarakis,P. and Tsangridis,A.

CONSRTH FishTrace

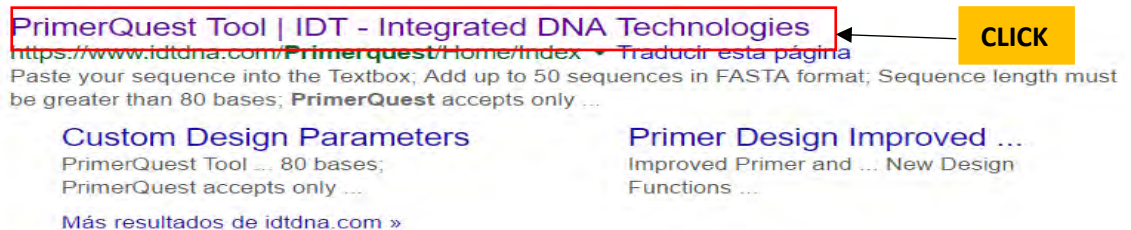
TITLE Direct Submission

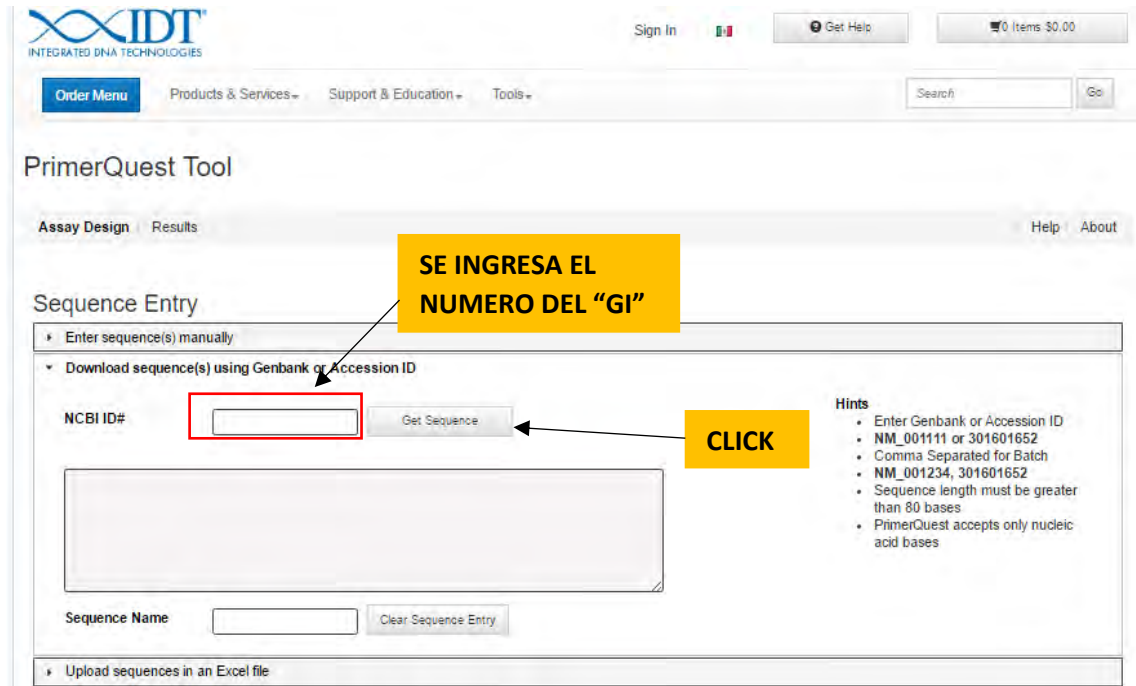
JOURNAL Submitted (11-JUL-2007) Fisheries Research Institute, National

SE COPIA EL NUMERO "GI"

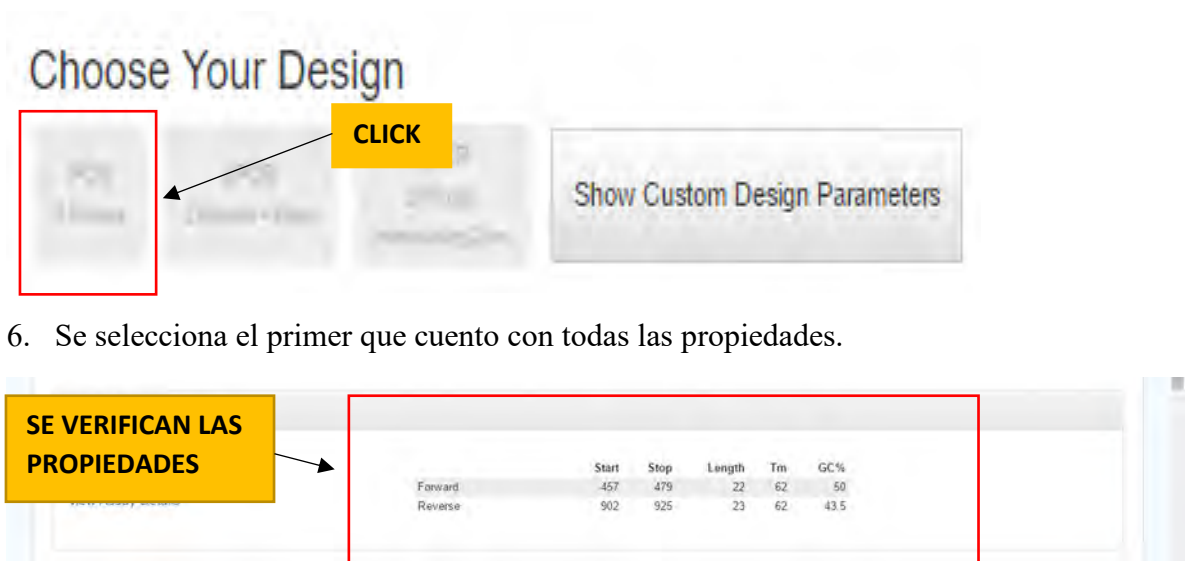
GI:154745075

4. Se ingresa el número del GI (el número que se copió) al programa Primerquest Tool.





5. Se ingresa a los primers que te realiza el programa.

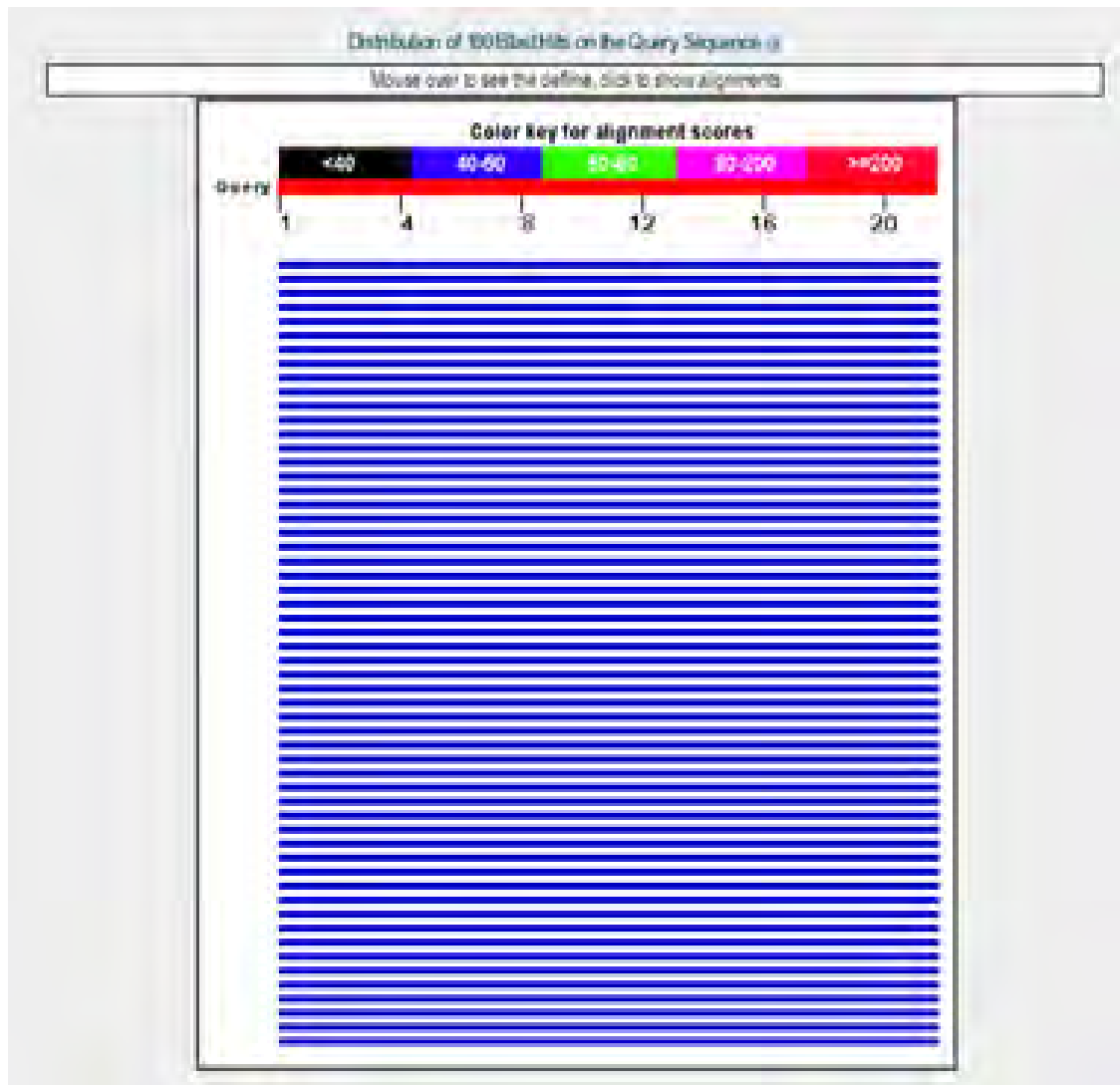


6. Se selecciona el primer que cuento con todas las propiedades.

7. Se comprueban los datos, las temperaturas y que realmente amplifique para la especie de interés

		Start	Stop	Length	Im	GC%
Forward	GTCCCATATGTCGGA ACTACTC (Sense)	457	479	22	62	50
Reverse	GTGCAGGAAGGGA ACTACTATAA (AntiSense)	902	925	23	62	43.5

Base	Sequence
1	ATGGCAAGCCTCCGAAAACTCACCCGCTACTAAAAATCGCTAACGACGCACTAGTTGACCTTCCTACCCCTCTAATATCTCTGCATGATGAAACTTGG
101	GCTCACTACTTGGCCTTTGCCTTATTCTCAGATCCTTACAGGACTATTCTCGCAATACACTACACCCCTGATGTCGAATCAGCCCTTCGCCTCAGTAGC
201	CCACATTTGCCGAGATGTCAACTTCGGTTGACTTATCCGGAACCTCCACGCAACGGGGCCTCTTTCTCTTTATCTGTATCTACTTCCACATCGGCCGA
301	GGACTTTACTACGGCTCTTACCTATACAAGAAACATGAAACATCGGAGTAGTACTCCTACTCCTAGTTATGATGACCGCCTTCGTTGGCTACGTCCTTC
401	CCTGAGGACAAATGTCTTTCTGAGGAGCTACCGTCATTACTAACTCCTATCCGCA GTCCCATATGTCGGA ACTACTC TCGTTGAATGAATCTGAGGAGG
501	CTTTTCAGTAGCAATGCCACCCCTCACCCGATTCTTCGCAATCCACTTCCTATTCCCATTCGTCATCGCAGCTATGACAATTCCTCACCTTCTTTTCTCT
601	CACGAACAGGTTCAAATAATCCAATCGGATTAACCTCAAATGCAGATAAAATCTCATTCCACCCACTTCTCTTACAAGACCTCCTTGGTTTCGTGA
701	TCCTGCTAGTAGCACTCGCCTCTCTAGCACTATTCTCCCTAACCTCCTAGGAGATCCAGACACTTCACCCCTGCCAACCCATGGTTACTCCACCTCA
801	CATTAACCTGAATGATATTTCTATTTGCATACGCAATTCTTCGGTCCATCCAAACAACCTAGGAGGAGTACTAGCCCTCCTAGCCTCCATCCTTTGTA
901	CTTATAGTAGTTCCTTCCTGCAC ACTTCAAAACAGCGAACTCTAACATTCGACCAAGTTTCCCAATTCCTATTCTGAACCTTATTGCAGACGTAGCCA
1001	TTCTTACCTGAATCGGGGTATGCCAGCAGAACGCCCTTCATTATTATCGGCCAAGTAGCTTCGGTCTCTACTTCTCCCTATTCTTGTCTTTCTTCCC
1101	ACTTCAGGCTGAGCTGAGAACAAATCCTTGGATGATCCT



- Posteriormente se verifican los primers con la secuencia mitocondrial (MITOMAP) (Mitomap.org) para comprobar que realmente amplifiquen para la especie de interés (atún).

ANEXO 4- HOJAS DE ESPECIFICACIONES DE LOS PRIMERS



SPECIFICATION SHEET

www.idtdna.com

19-Jan-2017

Order No. **12407204**

Ref. No. **154989160**

Sequence - Atun R

25 nmole DNA Oligo, 23 bases

5'- GTG CAG GAA GGG AAC TAC TAT AA -3'

Properties

T_m (50mM NaCl)¹: 53.9 °C
 GC Content: 43.5%
 Molecular Weight: 7,145.7
 nmoles/OD260: 4.1
 ug/OD260: 29.6
 Ext. Coefficient: 241,800 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

6.8 = 28 = 0.20
 OD260 nmoles mg
 For 100 µM: add 280 µL

Shipped To

VERONICA LOPEZ
 UNIPARTS, S.A. DE C.V.
 GALILEO 92, POLANCO
 D.F., 11550
 MEXICO

Customer No. 252667 PO No. 14830

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.56 at 25 °C
 Strongest Folding T_m: 40.8 °C

Oligo Base Types

Quantity

DNA Bases: 23

Modifications and Services

Quantity

Standard Desalting 1

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID215129729

Labels - Peel here



INSTRUCTIONS

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg²⁺ and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/scitools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

M



SPECIFICATION SHEET www.idtdna.com

19-Jan-2017

Order No. **12407204**

Ref. No. **154989159**

Sequence - Atún F

25 nmole DNA Oligo, 22 bases

5'- GTC CCA TAT GTC GGA ACT ACT C -3'

Properties	Amount Of Oligo	Shipped To
T _m (50mM NaCl)*: 54.4 °C	6.4 = 30.7 = 0.21	VERONICA LOPEZ
GC Content: 50.0%	OD260 nmoles mg	UNIPARTS, S.A. DE C.V.
Molecular Weight: 6,670.4	For 100 µM: add 307 µl	GALILEO 92, POLANCO
nmoles/OD260: 4.8		D.F., 11550
µg/OD260: 32.2		MEXICO.
Ext. Coefficient: 207,300 L/(mole·cm)		

Customer No. 252667 PO No. 14830

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.23 at 25 °C
 Strongest Folding T_m: 20.9 °C

Oligo Base Types	Quantity
DNA Bases	22
Modifications and Services	Quantity
Standard Desalting	1

Disclaimer

See on reverse page notes (i) (ii) & (iii) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID 215129728

Labels - Peel here



I N S T R U C T I O N S

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of this oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg²⁺ and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/software to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

M



SPECIFICATION SHEET

www.idtdna.com

19-Jan-2017

Order No. **12407204**

Ref. No. **154989154**

Sequence - Delfin R

25 nmole DNA Oligo, 22 bases

5'- GGG CCT GAT TTA AGA ACC AGA T -3'

Properties	Amount Of Oligo	Shipped To
T_m (50mM NaCl) ¹ : 54.8 °C	6.1 = 27.8 = 0.19	VERÓNICA LOPEZ UNIPARTS, S.A. DE C.V. GALILEO 92, POLANCO D.F., 11550 MEXICO
GC Content: 45.5%	OD ₂₆₀ nmoles mg	
Molecular Weight: 6,783.5	For 100 µM: add 278 µL	
nmoles/OD ₂₆₀ : 4.5		
µg/OD ₂₆₀ : 30.8		
Ext. Coefficient: 219,900 L/(mole·cm)		

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.60 at 25 °C
Strongest Folding T_m : 31.8 °C

Customer No. 252667 PO No. 14830

Oligo Base Types	Quantity
DNA Bases	22
Modifications and Services	Quantity
Standard Desalting	1

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID215129723

Labels - Peel here



INSTRUCTIONS

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

¹The T_m shown takes no account of Mg²⁺ and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/softools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

M



SPECIFICATION SHEET

www.idtdna.com

19-Jan-2017

Order No. **12407204**

Ref. No. **154989153**

Sequence - Delfin F

25 nmole DNA Oligo, 23 bases

5'- CCA CAA CAT CAC AGT ACT ACG TC -3'

Properties	Amount Of Oligo	Shipped To
T _m (50mM NaCl): 55.2 °C	7.4 = 33.4 = 0.23	VERONICA LOPEZ
GC Content: 47.8%	OD 260 nmols mg	UNIPARTS, S.A. DE C.V.
Molecular Weight: 6,921.6	For 100 µM: add 334 µL	GALILEO 92, POLANCO
nmols/OD260: 4.5		D.F., 11550
µg/OD260: 31.3		MEXICO
Ext. Coefficient: 221,400 L/(mole·cm)		

Customer No. 252667 PO-No. T4830

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.88 at 25 °C
 Strongest Folding T_m: -0.4 °C

Oligo Base Types	Quantity
DNA Bases	23
Modifications and Services	Quantity
Standard Desalting	1

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties.

Mfg. ID: 215129722

Labels - Peel here



INSTRUCTIONS

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg²⁺ and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/schools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

M

ANEXO 5 – CÁLCULOS DE DILUCIONES

Se resuelve por medio de una regla de 3.

$$\begin{aligned} \text{ml de la solución a cuantificar} &= \text{concentración obtenida en el Nano Drop} \\ x &= 60\text{ng}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Para obtener una muestra de 50 μl , la concentración de 60ng/ μl , se considera el valor de “x” como la muestra original y se le agrega agua libre de nucleasas hasta completar los 50 μl .

➤ MUESTRAS FRESCAS

- Atún = $\frac{50\mu\text{L} \text{---} 380.4\text{ng}/\mu\text{L}}{x \text{---} 60\text{ng}/\mu\text{L}}$

$$X = 8\mu\text{L ADN}; + 42\mu\text{L agua libre de nucleasas para } 50\mu\text{L}$$

- Delfín = $\frac{50\mu\text{L} \text{---} 5206.6\text{ng}/\mu\text{L}}{x \text{---} 100\text{ng}/\mu\text{L}}$

$$X = 1\mu\text{L ADN}; + 49\mu\text{L agua libre de nucleasas para } 50\mu\text{L}$$

- Tiburón = $\frac{50\mu\text{L} \text{---} 985.3\text{ng}/\mu\text{L}}{x \text{---} 60\text{ng}/\mu\text{L}}$

$$X = 3\mu\text{L ADN} + 47\mu\text{L de agua libre de nucleasas para } 50\mu\text{L}$$

ANEXO 6 – CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL PARA EL DISEÑO DE LOS PRIMERS

➤ Delfín

Genoma mitocondrial de la especie *Delphinus delphis*, determinando la secuencia de el gen DDA04 tRNA-Thr, secuencia parcial y D-loop.

```

TCACCCAAAGCTGAAGTCTACATAAACTATTCTT
TGAAAAAGCTTATTGTACAATTA CCACAACATCAC
AGTACTACGTCAGTATTTAAAGTAATTTGTTTTAA
AAACATTTTACTGTACATATTACATACACATACAC
ATGTACATGCTAATATTTAGTCTCTCCTTGTAAT
ATTCATATATTCATGCTATGTATTATTGTGCATTC
ATTATTTTCCATACGATAAGTTAAAGCTCGTATT
AATTATTATTAATTTTACATATTACATAATATGCAT
CCTCTTACATATTATATATCCCCTTCAATTCATTCC
CATTATACCCTATGGTCGCTCCATTAGATCACGAG
CTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAAGCAACCC
GCTTGGCACGGATCCCTCTTCTCGCACCGGGCCCA
TATCTCGTAGGGGTAGCTAATAATGATCTTTATAA
GTC ATCTGGTTCTTAAATCAGGCCATTTTAACTTA
AAATCGCCCGGTGCGAAAATCTTAAATAAGACATC
  
```

Fragmentos del ADN para el diseño de los primers de delfín.

➤ **ATÚN**

Genoma mitocondrial de la especie *thunnus thynnus* del gen citocromo b (cytb), secuencia parcial.

ATGGCAAGCCTCCGAAAACTCACCCGCTACTAAAAATCG
 CTAACGACGCACTAGTTGACCTTCTACCCCCTCTAATATC
 TCTGCATGATGAACTTTGGCTCACTACTTGGCCTTTGCCT
 TATTTCTCAGATCCTTACAGGACTATTCCTCGCAATACACT
 ACACCCCTGATGTGCAATCAGCCTTCGCCTCAGTAGCCCA
 CATTGCCGAGATGTCAACTTCGGTTGACTTATCCGGAACC
 TCCACGCAAACGGGGCCTCTTTCTTTTATCTGTATCTACT
 TCCACATCGGCCGAGGACTTTACTACGGCTTTACCTATAC
 AAAGAAACATGAAACATCGGAGTAGTACTCCTACTCCTAGT
 TATGATGACCGCCTTCGTTGGCTACGTCTTCCCTGAGGAC
 AAATGTCTTTCTGAGGAGCTACCGTCATTAACCTCCTAT
 CCGCA**GTCCCATATGTCGGA**ACTCTCGTTGAATGAATCT
 GAGGAGGCTTTTCAGTAGACAATGCCACCCTCACCCGATTC
 TTCGATTCCACTTCTATTCCCATTTCGTCATCGCAGCTATGA
 CAATTCTCACCTTCTTTTCTTACGAAACAGGTTCAAATAA
 TCCAATCGGATTAACCTCAAATGCAGATAAAATCTCATTCCA
 CCCATACTTCTTACAAAGACCTCCTTGGTTTCGTGATCCT
 GCTAGTAGCACTCGCCTCTCTAGCACTATTCTCCCCTAACCT
 CCTAGGAGATCCAGACAACCTCACCCCTGCCAACCCAATGG
 TTA

Fragmentos del ADN para el diseño de los primers de atún.