



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Identificación de la presencia de soya, carne de cerdo y bovino como adulterantes en productos de carne de venado mediante la técnica de PCR.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

MAHELY MORALES CAMARGO

ASESORES: Dr. José Francisco Montiel Sosa

M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
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.

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.**

Identificación de la presencia de soya, carne de cerdo y bovino como adulterantes en productos de carne de venado mediante la técnica de PCR

Que presenta la pasante: **Mahely Morales Camargo**

Con número de cuenta: **415055640** 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 21 de junio de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	I.A. María Guadalupe López Franco	
2do. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	

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

La autora de la presente agradece el apoyo de los programas PIAPI1837, “Aplicaciones de herramientas moleculares en el área agroalimentaria y diagnóstico de enfermedades mitocondriales” y PAPIIT No. IN2264, “Asociación del fondo genético mitocondrial en enfermedades mitocondriales de la población mexicana” por el apoyo otorgado para el financiamiento del trabajo realizado.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNAM-FES CUAUTITLÁN** por abrirme las puertas hace cinco años y proporcionarme no solo los más preciados aprendizajes sino a personas y experiencias que han hecho mi vida mejor, por formarme y darme las herramientas para enfrentarme al mundo.

A la **Oficial B** mi preparatoria y todos mis profesores por mostrarme que muchas cosas buenas pueden pasar si sales de tu zona de confort.

Al **Dr. Montiel** por darme la oportunidad de conocer una parte de la ciencia a través de sus enseñanzas y por el apoyo para la realización de este proyecto

A la **M. en C. Ana Elvia** por recorrer a mi lado el largo camino de la experimentación para este proyecto, por sus consejos, apoyo y paciencia para lograrlo.

A la **Mtra. Josefina** por su apoyo y consejos durante la experimentación sin ser esa su responsabilidad.

A todos **mis profesores** que alguna vez me impartieron clases durante la carrera, por sus valiosas enseñanzas y por formarme como ingeniera en alimentos, cada una de ellas me llevo a este momento.

A mi **mamá**, Delia Camargo, por darme una parte de ti cada día desde que supiste que iba a nacer, por ser la mejor compañera, amiga y maestra cuando mi hermana y yo lo necesitamos, por trabajar diario como si no hubiera un mañana y por sacrificar tantas cosas para que yo tuviera todo, por ser la única que siempre va a soportar mis cambios de humor sin reclamarme nada. Gracias por apoyarme tanto emocional como económicamente desde el día que decidí salir a estudiar lejos de casa, por darme siempre la confianza que me hizo la mujer que soy y por permitirme crecer alado de un modelo de mujer que me enseñó no solo a ser fuerte e independiente sin importar los obstáculos sino también a ser buena persona, paciente y compasiva con todos y todo lo que nos rodea. Simplemente no tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí, lo que me has dado y me has enseñado, estaré en deuda contigo cada día de mi vida y prometo hacerte sentir muy orgullosa y demostrarte que valió la pena cada esfuerzo que hiciste. Te amo mucho y espero poder tenerte a mi lado en cada meta cumplida.

A mi **papá**, Miguel Morales por el apoyo desde que inicie este camino, tanto emocional como económico y por todos los sacrificios que realizaste para que tanto a mi hermana como a mí nunca nos faltara nada, por dejarme ser yo misma y tomar mis decisiones, por siempre demostrar lo orgulloso que estas de mí y de lo que he logrado y que a pesar de todo siempre has visto por mi bienestar, por esos regaños que a veces parecían innecesarios pero que forjaron a la persona que soy hoy y por enseñarme que sin importar de donde vengas puedes salir adelante y forjarte un futuro mejor. Te amo mucho y espero tenerte a mi lado en muchos logros más alcanzados como lo has hecho hasta ahora.

A mi **hermana**, Pamela Morales, por ser mi compañera desde el día uno, por reír, pelear y llorar conmigo porque todo eso me hizo lo que soy hoy, por enseñarme sobre cosas que salen de mi ámbito de estudio y por siempre estar con mi mamá y mi Lenin cuando yo no podía estarlo. Siempre voy a amarte y a estar para ti.

A mi **compañero de cumpleaños y novio**, Diego Ordoñez, por estar a mi lado en el último año de carrera y durante la realización de este proyecto, por darme ánimos y la confianza cuando me sentía derrotada, por tener siempre para mí un abrazo, un beso, unas palabras de aliento o simplemente tu compañía. Te agradezco por enseñarme tantas cosas sobre temas que antes ignoraba, por soportar mis enojos y momentos de estrés durante este proceso pero también por estar a mi lado para celebrar por los triunfos obtenidos. Por hacerme parte de tu familia cuando sabías que me hacía falta y por convertirte en mi familia y por siempre cumplir mis antojos después de un largo día en el laboratorio, pero sobre todo te agradezco por todo tu amor incondicional, por llegar a mi vida en el momento indicado y por hacer de mí una mejor persona. Te amo con todo mi corazón y espero tener la suerte de tenerte a mi lado muchos años más.
19N

A la **familia Camargo**, papá Angel, mamá Delia, tíos y primos, por siempre ser parte de mi vida, celebrar mis triunfos a mi lado y ayudarme a ser quien soy hoy en día.

A mi **mejor amiga**, desde la secundaria, **Montse**, por emprender conmigo esta aventura de vivir solas, por aguantar mis distracciones, por aconsejarme en cada aspecto de mi vida y sobre todo por siempre estar a mi lado sin importar nada, por darme la confianza en mí misma que a veces me faltaba. Te quiero mucho amiga y espero tenerte en mi vida para siempre.

A mis amigos **Meli, Zian, Ana, Sebas, Luis e Ivan**, por mostrarme la vida en la ciudad, acompañarme en mis momentos de tristeza y soledad, pero también en los de alegría, por recorrer a mi lado este largo camino en el que caímos y nos levantamos juntos. Los quiero mucho y espero tenerlos muchos años más en mi vida, les deseo a todos lo mejor en cada camino que emprendan.

A la familia **Ordoñez Godínez y Vega Araos** por permitirme entrar a sus vidas y formar parte de sus familias cuando la mía estaba muy lejos.

A mis papás, todo su esfuerzo, dedicación y sacrificio valió la pena, este proyecto marca el fin de una etapa para los tres, gracias por darme la herramienta más valiosa para afrontar el mundo, la educación.

“Sin importar el tamaño de la ciudad o pueblo donde nacen los hombres y mujeres, ellos finalmente son el tamaño de su obra, de su voluntad de engrandecer y enriquecer a sus hermanos.”

-Ignacio Allende

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	4
1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA CARNE	4
1.1.2 Importancia económica de la carne en México	5
1.2 CARNES CONVENCIONALES	7
1.3 CARNES EXÓTICAS	10
1.3.1 Carne de venado	10
1.3.2 Distribución e importancia económica del venado	13
1.4 PRODUCTOS CÁRNICOS	17
1.4.1 Productos a base de carne de venado	18
1.5 ADULTERACIONES EN PRODUCTOS CÁRNICOS	20
1.5.1 Sustitución de ingredientes	21
1.5.2 Adición de sustancias no permitidas	22
1.6 ADULTERACIONES EN EL ETIQUETADO	24
1.5 TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ADULTERACIONES	25
1.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	27
1.8.1 Fundamento	28
1.8.2 Etapas de la PCR	28
1.8.3 Componentes de la reacción	30
1.8.4 Ventajas y desventajas de la PCR	31
1.8.5 Aplicaciones de la PCR	32
1.9 JUSTIFICACIÓN	33
1.10 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	35
CAPITULO II: METODOLOGÍA	37
2.1 ESQUEMA EXPERIMENTAL	37
2.1.1 Descripción de actividades del esquema experimental	38
2.2 MATERIALES	40
2.3 MÉTODOS	43

2.3.1 Extracción de ADN	43
2.3.2 Cuantificación de ADN.....	44
2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa	45
2.3.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	46
2.3.5 Diseño de primers de ciervo rojo	48
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION	50
3.1 RESULTADOS DEL OBJETIVO 1	50
3.2 RESULTADOS DEL OBJETIVO 2	54
3.3 RESULTADOS DEL OBJETIVO 3	60
3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	69
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS	76
ANEXOS.....	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Carne en las diferentes etapas del rigor mortis	5
Figura 2: Grafico de la producción de las carnes más consumidas en México en 2017.....	6
Figura 3: Corte de carne de bovino	7
Figura 4: Corte de carne de cerdo.....	8
Figura 5: Ciervo rojo macho, adulto	11
Figura 6: Corte de carne de ciervo	13
Figura 7: Mapa de distribución del ciervo rojo en México (Gallina, 2009)	15
Figura 8: Grafica del número de UMA en cada estado de la República Mexicana (Gallina, 2009)	16
Figura 9: Productos cárnicos a base de diversas carnes	17
Figura 10: Salchicha de carne de venado	19
Figura 11: Cecina de venado	19
Figura 12: Etapas de la técnica de PCR.....	29
Figura 13: Esquema experimental.....	37
Figura 14: Marcador de peso molecular utilizado. Marcado de peso Invitrogen de 100pb por banda	47
Figura 15: Programa de PCR para primers de cerdo y bovino	52
Figura 16: Programa de PCR para primers de soya.....	53
Figura 17: Programa de PCR para primers de ciervo rojo.....	53
Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para identificación de cerdo y bovino. MP: marcador de peso (Invitrogen), B: blanco, Bo1: bovino con sim 1, Bo2: bovino con sim 2, C1: cerdo con sim 1, C2: cerdo con sim 2	55
Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de soya. S: soya, MP: marcador de peso (Invitrogen), B: blanco.....	56
Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para especificidad de primers de venado. MP: marcador de peso (Invitrogen), C+: venado, Ce: cerdo, Co: conejo, S: soya, M: maíz, A: avena, T: trigo	57
Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para especificidad de primers de soya. MP: marcador de peso (Invitrogen), S: soya, M: maíz, A: avena, T: trigo, Bo: bovino, Ce: cerdo, Co: conejo y P: pescado	57
Figura 22: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para especificidad de primers de bovino. MP: marcador de peso (Invitrogen), Bo: bovino, Ce: cerdo, Co: conejo, P: pescado, S: soya. M: maíz, A: avena y T: trigo	58
Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para especificidad de primers de cerdo. MP: marcador de peso (Invitrogen), Ce: cerdo, B: bovino, C: conejo, M: maíz, S: soya, T: trigo y A: avena.....	58
Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de carne de venado en productos, continuación de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen).....	61

Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de carne de venado en productos. MP: marcador de peso (Invitrogen)	62
Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de carne de venado, repetición de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen)	62
Figura 27: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones con soya e productos de carne de venado. MP: marcador de peso (Invitrogen).....	64
Figura 28: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones con soya en productos de carne de venado. , continuación de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen).....	64
Figura 29: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones con cerdo en productos de carne de venado. MP: marcador de peso (Invitrogen).....	65
Figura 30: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones con cerdo en productos de carne de venado, continuación de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen).....	66
Figura 31: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones de bovino en productos de carne de venado. MP: marcador de peso (Invitrogen).....	67
Figura 32: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones de bovino en productos de carne de venado, continuación de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen).....	67
Figura 33: Etiqueta de uno de los productos utilizados para la experimentación..	72
Figura 34: Secuencia de ADN de ciervo rojo utilizada para el diseño se primers .	81
Figura 35: Selección de la secuencia de ADN mitocondrial de ciervo rojo utilizada	82
Figura 36: Opciones de pares de primers arrojadas por el programa	82
Figura 37: Par de primers seleccionados para ciervo rojo	82
Figura 38: Blast para primer frontal de ciervo rojo	82
Figura 39: Blast para primer reverso de ciervo rojo	82
Figura 40: Fragmentos comunes para los primers seleccionados. Imagen tomada del artículo Matsunaga, 1999	82

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición química de carne de bovino magra	8
Cuadro 2: Composición química de carne de cerdo magra	9
Cuadro 3: Composición química de la carne de ciervo.....	12
Cuadro 4: Cortes provenientes del venado	18
Cuadro 5: Muestras de productos a base de carne de venado utilizados en la experimentación.....	41
Cuadro 6: Unidades experimentales utilizadas para cada muestra.	42
Cuadro 7: Componentes para la reacción de PCR.....	45
Cuadro 8: Características de los primer seleccionados para cada especie.	51
Cuadro 9: Cuantificación de las extracciones para especificidad de los primers. .	54
Cuadro 10: Cuantificación de las extracciones de los controles positivos para las especies de interés	55
Cuadro 11: Cuantificación de extracción de las muestras de carne de venado	60

RESUMEN

La adulteración con productos de menor precio o con sustancias no reportadas en el etiquetado de un alimento representa no solo una violación a la normativa mexicana para alimentos sino también un riesgo para los consumidores. Si bien los productos a base de carnes exóticas tales como la de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) no se considera un producto altamente consumido en México, este tipo de carne presenta en su composición un gran beneficio por su alto contenido proteico y bajo en grasa y debido a su alta concentración en la zona centro del país podría estar al alcance de la población, sin embargo su precio es una limitante para su consumo y su venta. Las adulteraciones en productos de carne de venado donde la materia prima principal implica un gran costo, suelen ser blancos de sustituciones completas o parciales por carnes menos costosas, como son el cerdo y bovino o pueden ser adicionadas con proteína vegetal como la soya, para aumentar su aporte proteico actuando como extensores de la carne. Informar al consumidor sobre las adulteraciones en los productos así como informar a las autoridades la falta de legislación tanto para los productos como para aquellos que los venden es de suma importancia. La técnica que presenta mayores ventajas para la identificación de adulteraciones es la técnica de PCR. En el trabajo dicha técnica se aplicó en muestras de productos de carne de venado obtenidas en el área metropolitana logrando así detectar adulteraciones con carne de cerdo y bovino en muchas de las muestras, las cuales no presentaban un etiquetado correcto según la norma, por el contrario en ninguna de las muestras se identificó la presencia de soya.

Palabras clave: PCR, adulteraciones en productos cárnicos, carne de venado.

INTRODUCCIÓN

Las adulteraciones en la industria alimentaria son hoy en día una situación que muchas personas pasan por alto, el cambio de un ingrediente por otro de menor calidad o precio en un producto, puede representar un riesgo para la salud de los consumidores, así como una violación en la normativa que aplique para dicho producto (Johnson, 2014). En el caso de los productos cárnicos, las adulteraciones se dan con el objetivo de disminuir el costo de producción cuando uno de los ingredientes tiene un alto precio (Everstine, 2012).

Existen otro tipo de adulteraciones como es el caso de la adición de proteínas de origen vegetal obtenida principalmente de leguminosas, una de las especies más utilizadas para estos casos es la soya, la cual es comúnmente adicionada a embutidos o productos elaborados con recortes de carne y que requieren de una mayor estabilidad y aporte proteico, la adición de proteína de soya está permitido, siempre y cuando se encuentre dentro de los límites permitidos e indicado en la etiqueta como lo marcan las normas NOM-051-SCFI y NOM-213SSA1 respectivamente.

A las proteínas de origen ya sea animal o vegetal usadas para sustituir la carne original de un producto, se les denomina extensores (Andújar G. G., 2000) debido a que permiten que la producción de carne que suele ser de mayor precio, comparada con partes del animal tales como las vísceras las cuales suelen ser de menor precio, funcione para realizar una mayor cantidad de productos y le da un mayor aporte nutrimental, este es el caso de las especies estudiadas en este proyecto.

Una de las técnicas utilizadas que representa una mayor ventaja para la detección de este tipo de adulteraciones, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) debido al uso de ADN el cual no se ve afectado durante procesos a alta o baja temperatura a la cual se someten los alimentos, así como su alta sensibilidad y selectividad lo cual permite la identificación de las especies de interés (Druml, 2014). La técnica de PCR consiste en la multiplicación de un fragmento de ADN de alguna

especie (Pérez, 2018), utilizando cebadores específicos para así poder identificar la presencia de dicha especie en un producto.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA CARNE

Según la NOM-009-ZOO-1994 la carne es la estructura compuesta por fibra muscular estriada acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibra nerviosa, vasos linfáticos y sanguíneos de aquellas especies autorizadas para el consumo humano. Para que el músculo pueda ser consumido debe pasar por una serie de transformaciones irreversibles tanto físicas, químicas y bioquímicas a las cuales se les conoce como *rigor mortis*.

El *rigor mortis* inicia en la cabeza, cuello, miembros anteriores y posteriores y la región dorsal, los músculos de estas partes se tornan inextensibles, los ejes óseos son difíciles de mover y la grasa se solidifica lo cual va a contribuir a la firmeza de la carne, por otro lado el pH de la carne desciende notoriamente y todo esto sucede debido a la falta de circulación de sangre y oxígeno en los músculos provocando la glucólisis anaerobia (Ramírez, 2009).

La glucólisis anaerobia permite descomponer las moléculas de glucosa en ácido láctico sin la presencia del oxígeno, la acumulación del ácido láctico producido durante esta vía metabólica se encarga del descenso de pH a valores cercanos a 5.4, esto provoca una inhibición de las enzimas glucolíticas o del agotamiento de las reservas de glucógeno (Ramírez, 2009).

Según Ramírez, 2009 debido a la disminución del pH, la capacidad de retención de agua será menor en cuanto el músculo comience a presentar un pH cercano a 5.4, por otra parte el color será de un rojo más intenso y habrá menor contaminación microbiana. El pH ácido activará las enzimas del lisosoma lo cual causará un aumento de pH nuevamente a los valores iniciales, cercanos a 7, esto ayudará a un aumento de la capacidad de retención de agua haciendo la carne más blanda y jugosa. La figura 1 muestra los cambios físicos que presenta la carne durante el *rigor mortis*.

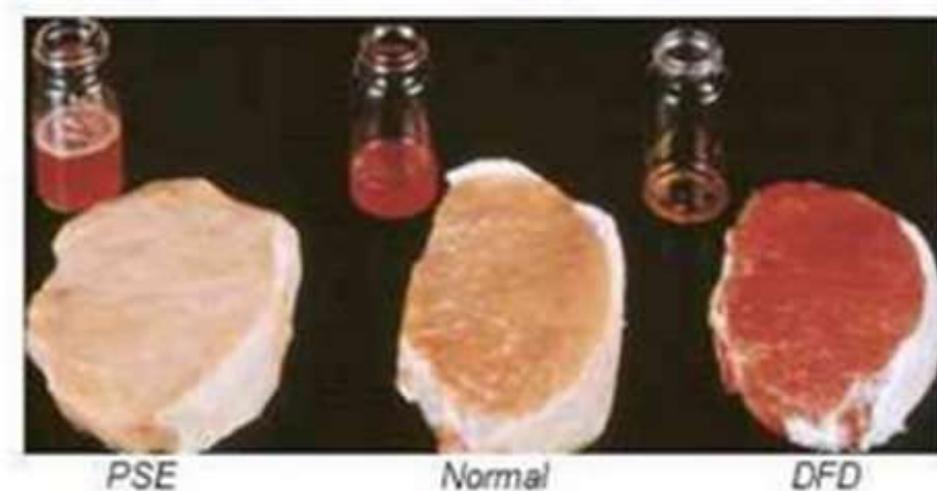


Figura 1: Carne en las diferentes etapas del rigor mortis

Si se somete a la canal a temperaturas muy bajas antes del *rigor mortis* puede provocar rigor de la descongelación la cual se desarrolla al descongelar el musculo provocando un acortamiento de hasta el 80% de la longitud original, también puede presentarse el acortamiento por frío provocando endurecimiento después de la cocción de la carne (Torrescano. G., 2008).

Todos los animales considerados aptos para el consumo humano pasan por las transformaciones antes mencionadas para obtener carne apta para la alimentación.

1.1.2 Importancia económica de la carne en México

La carne ha sido desde hace muchos años la principal fuente de proteína para la alimentación humana alrededor del mundo, existen diversos animales de corral y silvestres los cuales son utilizados para consumo humano, sin embargo la zona y cultura de cada país repercute en las especies consumidas con sus habitantes.

Debido a la situación económica que existe actualmente en México los animales de corral como pollos, cerdos y bovinos son los que presentan una mayor producción de carne para consumo debido a su precio y fácil adquisición.

Según el atlas agroalimentario en el 2017 se obtuvo la siguiente producción de carne mostrada en la figura 2.

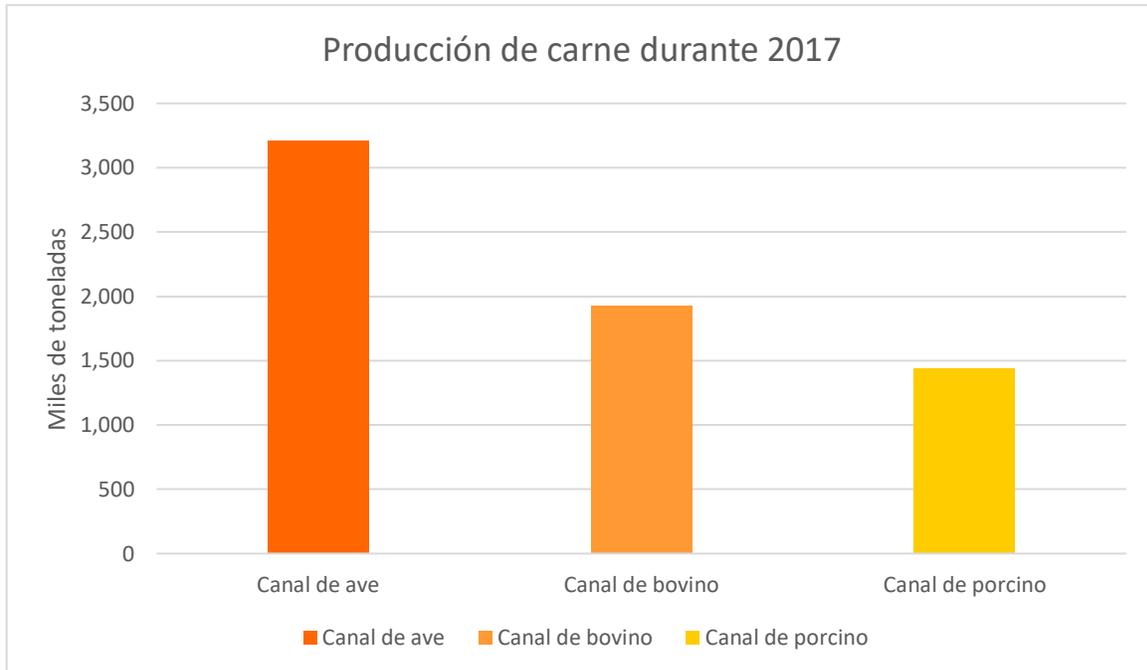


Figura 2: Gráfico de la producción de las carnes más consumidas en México en 2017

A pesar de que las cifras presentadas anteriormente muestran una producción alta de carne dentro del país, situándolo dentro de los primeros diez países con mayor producción de carne de ave y bovino y en el dieciseisavo de carne de cerdo, esta producción no es suficiente para abastecer el consumo del país, por esta razón se importa carne de diferentes países tales como Japón y Estados Unidos.

1.2 CARNES CONVENCIONALES

Se considera como carne convencional a toda aquella proveniente de animales con mayor consumo y por lo tanto mayor tendencia de producción por lo menos en México, siendo estas la carne de pollo, bovino y cerdo (Tercero, 2011). Siendo la carne de bovino y cerdo aquellas de interés para el presente estudio debido a su relación con las adulteraciones en productos de carnes de venado.

A pesar de que las tres carnes mencionadas anteriormente son de gran importancia para la economía de México como para la alimentación de la población, a continuación se describirá más a detalle la carne de bovino y cerdo por su importancia para el desarrollo de este proyecto.

La carne de bovino debe presentar un color rojo debido a la presencia de mioglobina, pero puede variar según la raza, la alimentación, el ejercicio o el ambiente donde se encuentra el animal, esto se puede observar en la figura 3 (IPCVA, 2018)

Según las estadísticas reportadas en el 2015 la carne de bovino es una de las tres carnes más consumidas en México con un consumo nacional de 1,858 toneladas en ese año de las cuales el 48.23% es de producción nacional y el 51.77% es importada principalmente de Estados Unidos (Merlo, 2016).



Figura 3: Corte de carne de bovino

En el cuadro 1 se puede observar la composición de la carne magra de bovino por cada 100 g la cual presenta una cantidad baja en grasas y alta en proteínas lo que la hace un alimento importante dentro de la dieta humana.

Cuadro 1: Composición química de carne de bovino magra

Carne	Agua	Proteínas	Grasas	Cenizas	Calorías (kJ)
Bovino magra	75	22.3	1.8	1.2	485

(FAO, 2007)

Otra de las características que hacen a la carne de bovino un alimento altamente consumido en el país, aparte de su aporte nutricional, es el precio en que se encuentra en el mercado para los consumidores, según el análisis hecho por el gobierno de la Ciudad de México en promedio la carne de bovino tiene un precio de \$70.00, pero este puede llegar a variar según la zona del país.

La carne de cerdo es otra de las especies de interés para el presente proyecto, dentro de esta categoría entra toda la carne obtenida de animales porcinos las cuales tienen diferente contenido de macronutrientes según la edad de su sacrificio así como su alimentación (Valero, 2010).

De acuerdo a las estadísticas la carne de cerdo es la segunda más consumida en todo el país, esto en el 2015, con un consumo nacional total de 2,344 toneladas en ese año del cual el 38.61% es de producción nacional y el resto es proveniente de países como Japón principalmente (Merlo, 2016).



Figura 4: Corte de carne de cerdo

En cuanto a composición las carnes de cualquier animal de abasto suele tener porcentajes muy similares, dependiendo del corte que se consuma la carne de cerdo suele considerarse con mayor aporte de grasas lo cual puede observarse en la figura 4 donde se muestra claramente una mayor cantidad de grasa que en la carne de bovino, es por ello que muchas veces se utiliza para ciertos productos que

requieres del aporte graso, en el cuadro 2 se muestra la composición de la carne de cerdo por cada 100g.

Cuadro 2: Composición química de carne de cerdo magra

Carne	Agua	Proteínas	Grasas	Cenizas	Calorías (kJ)
Cerdo magra	75.1	22.8	1.2	1.0	469

(FAO, 2007)

Al igual que la carne de bovino, el precio de la carne de cerdo es relativamente bajo y se encuentra al alcance de la mayoría de la población, este dependerá igualmente del corte que se consuma pero en promedio se encuentra en \$65.00.

1.3 CARNES EXÓTICAS

Una de las categorías en las cuales se pueden clasificar las carnes es en carnes exóticas o no convencionales, las cuales se definen según la FAO como aquella carne o subproducto de animales salvajes, fresca, refrigerada o congelada, algunas de las especies que se consideran salvajes y las cuales se utilizan para consumo son avestruces, caracoles, conejos, emúes, faisanes, jabalíes, leones, venados, etc. (Navarro, 2010).

Es posible definir también a las exóticas como aquellas procedentes de animales de caza, sin embargo pueden entrar dentro de esta categoría animales que no son silvestres pero por no ser tradicionales son consideradas carnes exóticas (Skewes, 2001).

Una de las carnes exóticas más comunes es la de ciervo tanto en otras partes del mundo como en México por su alta distribución, a continuación se desarrollara más el tema.

1.3.1 Carne de venado

El venado es un mamífero rumiante salvaje y herbívoro; los machos se caracterizan por tener un par de cuernos estriados y es considerado de la fauna silvestre mexicana más apreciada por su valor estético, cultura, cinegético y económico (Asiccaza, 2018).

El peso corporal de los venados varía según la subespecie, teniendo un peso aproximado para los machos adultos de 80kg y para las hembras de 65kg (Schilling, 2003) dependiendo de la subespecie, esa característica dictara el uso que se la da a cada una de ellas.

Su principal importancia es el uso de la especie como trofeo cinegético, es fuente de cacería de subsistencia además de la producción en cautiverio para la obtención

de carne para consumo humano, así como el uso de la piel para la industria peletera (Gallina S. M., 2015).

Los venados se encuentran presentes desde hace miles de años, sin embargo el número de especies ha disminuido debido a los cambios climáticos y en el ecosistema, no obstante sigue siendo un animal muy importante tanto para consumo alimenticio, cultural y de caza (Retana, 2015).

En América se encuentran el 13.2% de los venados en el mundo (Gallina S. y., 2009). En México existen catorce subespecies de venado de las cuales las más importantes por su gran presencia son las siguientes: cola blanca (*Odocoileus virginianus*), buro (*O. hemionus*), ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y temazate rojo (*M. pantora*), en la antigüedad las cuatro especies de venado se encontraban distribuidas en todo el territorio mexicano, sin embargo en la actualidad debido a los cambios del medio, ha disminuido notoriamente tanto el número de animales por especie, como las áreas donde se encuentra, siendo la zona centro del país donde más se concentra la subespecie de ciervo rojo (Instituto de Ecología, 2004), y la que se utiliza para consumo humano por la cantidad de carne obtenida de este.



Figura 5: Ciervo rojo macho, adulto

Una de las actividades con mayor importancia del aprovechamiento de los venados es el consumo de su carne para la alimentación humana, esto debido a su bajo contenido de grasa intramuscular y por ello de bajo colesterol, la carne de venado suele ser producida en criaderos o granjas especializadas destinadas a la cría de la especie para el consumo de su carne esto con el fin de obtener una carne con mayor calidad debido a la alimentación que se le da al animal (Asiccaza, 2018).

La carne de venado principalmente de ciervo rojo el cual puede observarse en la figura 5, por ser aquella especie con mayor presencia en nuestro país y por la cantidad de carne obtenida a partir de esta subespecie, es en la que se basa este proyecto; la carne de ciervo posee un contenido bajo de colesterol y suele ser magra sin importar el corte que se consuma, en el cuadro 3 se puede observar el contenido nutricional de dicha carne tanto cocida como cruda.

Cuadro 3: Composición química de la carne de ciervo

	Agua (%)	Energía (Kcal)	Proteínas g	Grasa total g	Cenizas g	Colesterol mg
Venado (carne cruda)	73.57	120	22.96	2.42	1.16	85
Venado (carne asada)	65.23	158	30.21	3.19	1.52	112

(Menchú, 2007)

Como se puede observar en el cuadro anterior la carne de venado cuenta con una alta cantidad de proteínas lo cual representa un beneficio para aquellos que la consuman, así como un bajo contenido de grasa y muestra un contenido de colesterol parecido al de carnes provenientes de otros animales, estas pueden ser características que llamen la atención del consumidor al buscar alimentos que sean ricos en los nutrientes necesarios para el cuerpo y que tengan la menor cantidad de

aquellos se cree que son dañinos. Su pH es de 5.67 siendo un alimento básico como otros productos cárnicos (González, 2010).

La carne de ciervo es de un color rojo oscuro, esto debido a la alta concentración de mioglobina, hierro y cobre que posee, lo cual puede verse claramente en la figura 6. Cuando el ciervo del cual proviene la carne es de criadero su sabor es más suave y presenta mayor ternura. Se considera un ciervo apto para el consumo de su carne cuando este alcanza los dos años de edad ya que la calidad de la carne suele ser mayor (Secretaría de Agroindustria, 2016).



Figura 6: Corte de carne de ciervo

1.3.2 Distribución e importancia económica del venado

Los venados pueden habitar diversos ecosistemas del planeta con distintas vegetaciones tales como bosques templados y tropicales, pastizales templados, chaparrales, desiertos, bosque tropical caducifolio y matorrales; el hábitat del ciervo rojo está dado por la disponibilidad de alimento, agua, cobertura vegetal y espacio así como del tamaño de la población y la carga del ecosistema donde se encuentren (SEMARNAT, 2007).

Uno de los países que se distingue por su producción y comercialización de venado es Nueva Zelanda, donde se aproxima cuentan con 30000 cabezas de venado en 300 haciendas, este país también es reconocido por la exportación de la carne de venado cazado en estado salvaje y doméstico (Krostitz, 2009).

En muchas partes de Europa se acostumbra desde hace muchos siglos a contar con venados en cautiverio para abastecerse de la carne fácilmente, ejemplo de ello

es Suecia que cuenta con 1000 ciervos y la República Federal de Alemania la cual fomenta la cría de venados para su comercialización, debido a la gran demanda no solo de la carne de venado sino también de las cornamentas, pieles, etc. el precio de los animales en estas regiones ha aumentado, costando un aproximado de 6.5-8 dólares el kilo de carne fresca, aumentando también su exportación a países de Europa (Krostitz, 2009).

El venado es considerado importante recurso tanto natural como económico en México y el mundo, en los ecosistemas los venados influyen en el establecimiento, reproducción, composición y estructuras de comunidades vegetales así como en el flujo de nutrientes, forman parte de la cadena alimenticia para muchos animales carnívoros de talla grande (Lara, 2011).

Debido a la fácil adaptación a todos los ecosistemas del venado, este se encuentra distribuido a lo largo de toda la república mexicana, en específico el ciervo rojo la especie de interés para este estudio, se encuentra principalmente en la zona centro y oeste del país, siendo Michoacán y el estado de México los estados con un mayor número de UMA intensivas (Gallina S. y., 2009).

Las Unidad de Medida y Actualización (UMA) se definen como los predios o instalaciones registradas que operan conforme a un plan de manejo aprobado y que cuenta con un seguimiento permanente del estado de hábitat y de los ejemplares ahí distribuidos (SEMARNAT, 2005).

En la figura 7 se puede observar cómo era la distribución del ciervo rojo, siendo esta la especie de interés para consumo humano debido a la cantidad de carne obtenida, en México y se demuestra cómo existen cantidades variables según la región:

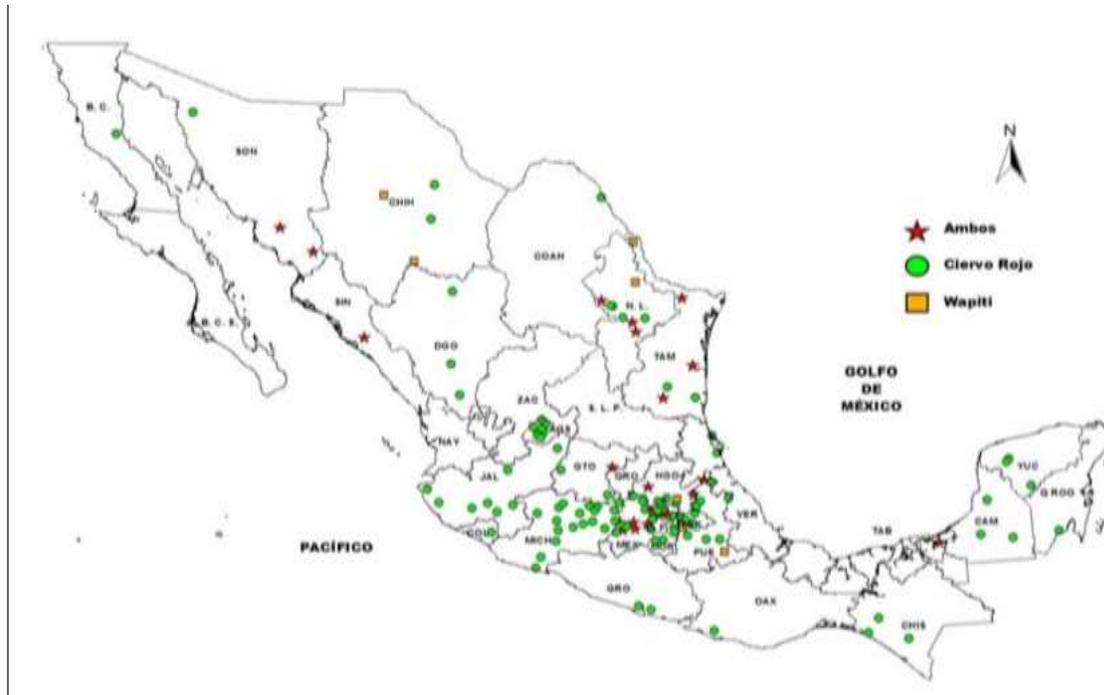


Figura 7: Mapa de distribución del ciervo rojo en México (Gallina, 2009)

Existen diversos estudios realizados por las diferentes instituciones de gobierno dedicadas a la protección y aprovechamiento de las especies que nos indican cuál es la cantidad de venados presentes en cada uno de los estados, esto se muestra en la figura 8, en la cual se puede ver nuevamente que la parte centro del país es aquella donde mayor número de esta especie hay.

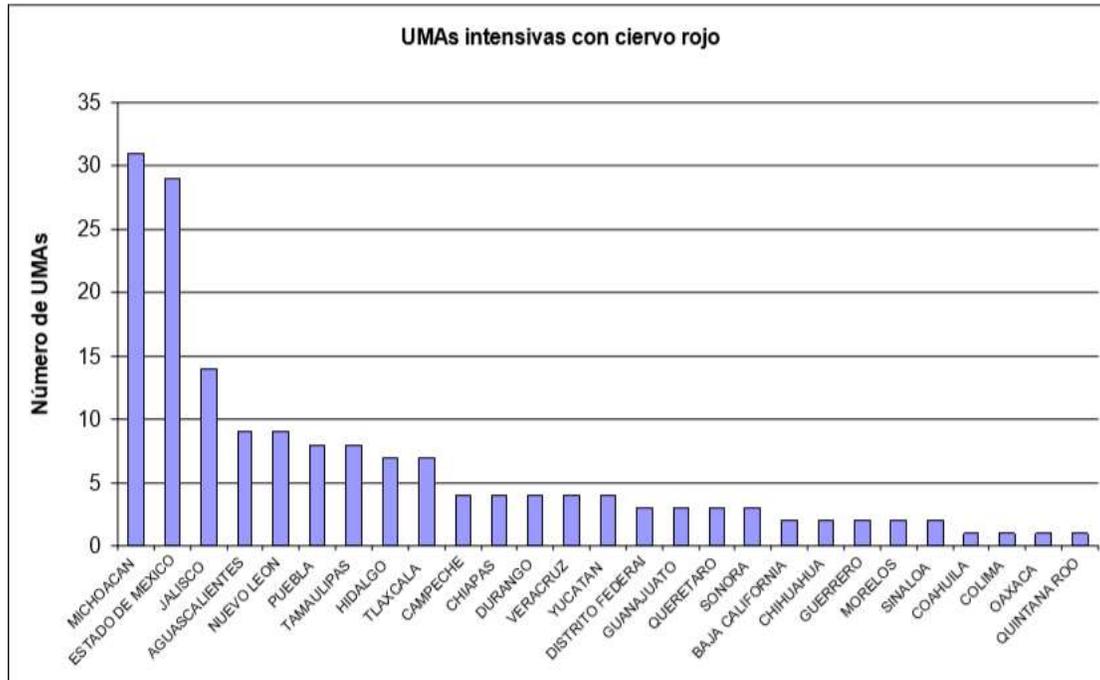


Figura 8: Gráfica del número de UMA en cada estado de la República Mexicana (Gallina, 2009)

Los datos presentados en las figuras anteriores representan la cantidad de UMA intensivas del ciervo rojo el cual es la especie de interés, esto se refiere a los lugares registrados en los cuales habitan dichos ejemplares y que se encuentran en cautiverio (SEMARNAT, 2010)

Si se observan las figuras antes presentadas sobre la presencia y distribución del ciervo rojo en nuestro país se puede determinar que podría ser una especie de suma importancia económica si se explotara adecuadamente. México podría aprovechar las características del territorio para la producción de la carne de venado (Martínez, 2015) y que en otros países suele ser más frecuente su consumo por motivos de cultura o economía.

1.4 PRODUCTOS CÁRNICOS

Según la NOM-123- SSA1-2018 se considera a un producto cárnico procesado a aquellos elaborados con carne, vísceras, grasa y partes comestibles provenientes de mamíferos o aves, con adición o no de otros ingredientes o aditivos y que pueden someterse a procesos de cocción, curación, desecación,



Figura 9: Productos cárnicos a base de diversas carnes

maduración, salado, marinado, etc. La figura 9 muestra algunos ejemplos de productos cárnicos, como embutido, carne molida, etc.

De acuerdo a esta definición existe una clasificación para estos productos.

- a) **Productos cárnicos cocidos:** son aquellos productos los cuales están procesados sometidos a procesos térmicos.
- b) **Productos cárnicos cocidos listos para consumo:** son sometidos a tratamientos térmicos que alcanzan los 70°C o a temperatura que garantice la destrucción de microorganismos patógenos y no requiera de tratamiento térmico por parte del consumidor. Ejemplo: jamón, salchicha, mortadelas y pates.
- c) **Productos cárnicos crudos:** productos procesados pero que no fueron sometidos a un tratamiento térmico.
- d) **Productos cárnicos crudos listos para consumo:** aquellos procesados crudos pero que fueron sometidos a maduración o secado que garantice la inocuidad del producto. Ejemplo: jamón serrano, carne seca, pepperoni.
- e) **Productos cárnicos crudos no listos para consumo:** son productos procesados pero que requieren de un tratamiento térmico previo a su consumo. Ejemplo: hamburguesas, chorizos, arracheras marinadas, longanizas.

Según la definición y clasificación de los productos cárnicos, en el mercado se encuentra una gran variedad de estos principalmente hecho a base de carnes convencionales, sin embargo es importante mencionar que dentro de estas categorías también entran los productos hecho a base de carnes exóticas en los cuales se centra este proyecto, principalmente los elaborados con carne de venado.

1.4.1 Productos a base de carne de venado

El ciervo rojo puede ser utilizado para diversas actividades, dentro de estas se encuentra la comercialización de piel y de su cornamenta con fines cinegéticos, pero una de las actividades más importantes y de interés es la venta y uso de su carne para consumo humano, ya sea la carne fresca o en la elaboración de productos.

La carne de venado puede ser comercializada en diferentes presentaciones y tanto su costo como sus propiedades organolépticas variaran según la parte del animal que se use como materia prima, como en otros animales de consumo humano existen diferentes cortes igualmente dependiendo de la parte donde se extraiga, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Cuadro 4: Cortes provenientes del venado

PRODUCTO	PARTE DEL VENADO DE DONDE POVIENE
Cuello	Cuello, cerca de la cabeza
Lomo	Lomo terminar el cuello
Cinta de lomo	Lomo
Paleta	Inicio de patas delanteras
Solomillo	Final del lomo, cerca de la cola
Pierna	Pierna trasera
Oso-bucco	Pata

(Catedral de la caza, 2018)

Con los cortes de carne que se pueden obtener del venado mostrados en el cuadro 4 es posible la obtención de productos cárnicos, sin embargo no es frecuente la comercialización de estos debido al bajo consumo de esta carne y de su alto precio.

Existe una gran variedad de productos ya procesados a base de carne de venado de sus diferentes partes, estos pueden ser embutidos como la cecina, salchichón, chorizo, morcillo, paté; o de forma más común en el país es consumido en hamburguesas o en platillos tradicionales como mixiote. Algunos ejemplos se de productos de carne de venado se muestran en la figura 10 y 11.



Figura 10: Salchicha de carne de venado



Figura 11: Cecina de venado

Como se puede observar existe una gran variedad de productos tanto frescos como procesados, donde se utiliza como materia prima la carne de venado; estos productos suelen comercializarse en tiendas especializadas o por internet debido a esto y a su precio el cual suele ser elevado, su consumo en la dieta diaria no es común. El venado ha sido un elemento vital en la alimentaciones de muchas comunidades indígenas de América desde hace muchos años he aquí la importancia de estos productos (Molina, 2002).

1.5 ADULTERACIONES EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Según el artículo 206 (LGS) se considera adulterado un producto cuando su naturaleza o composición no corresponden con aquellas con que se etiquete, anuncie, expendan, suministre o si no corresponde a las especificaciones de su autorización (Cofepris, 2018).

El Codex Alimentarius marca la existencia de un término para describir a las adulteraciones en alimentos que son realizadas de manera intencional, con el fin de obtener una ventaja económica y son las AEM, adulteraciones económicamente motivadas o fraude alimentario; esta consiste en la sustitución, dilución, simulación, alteración o falsificación deliberada sobre un producto con el propósito de obtener una ganancia económica, todo esto sin presentar una declaración adecuada de los ingredientes en la etiqueta del producto.

Si bien este tipo de adulteraciones en los alimentos puede representar un riesgo para la salud de aquellos consumidores que presenten alergias a ciertos ingredientes, habitualmente no es esta la intención de los productores o de las personas que llevan a cabo el fraude. Algunos ejemplos de este tipo de adulteraciones es la sustitución de aceite de oliva con alguno menos costoso o la venta de carne de caballo como carne de bovino (Codex Alimentarius Commission, 2017).

Todos los alimentos son susceptibles a presentar adulteraciones, aquellos con ingredientes de alto valor económico o de difícil adquisición suelen presentar fraudes más comúnmente, así como aquellos productos compuestos por diversos ingredientes y donde puede ocultarse fácilmente aquellos que no son deseados, este es el caso de las adulteraciones en productos cárnicos las cuales pueden ser las siguientes (Espinoza, 2015):

- a) **Sustitución de ingredientes:** cuando la materia prima de un producto es remplazada por otra de diferente naturaleza y es una de las adulteraciones más comunes en productos cárnicos.

- b) **Adición de sustancias no permitidas:** eso basado en la legislación de cada país y de aquellos ingredientes que están permitidos y las cantidades respectivamente.
- c) **Fraudes relacionados con aspectos sanitarios:** la producción de alimentos ante una seguridad sanitaria depende de las autoridades, es por ello que se establece una legislación para la producción de alimentos seguros para su consumo.
- d) **Fraudes relacionados con aspectos legales y religiosos:** uso de ingredientes para la elaboración de productos que no se permite su consumo en ciertas regiones de los países debido a su religión.

A continuación se describirán los dos tipos de adulteraciones en productos cárnicos que pueden estar presentes en los productos de carne de venado y que son de interés para este proyecto.

1.5.1 Sustitución de ingredientes

La sustitución de un ingrediente en los productos suele ocurrir cuando uno de los componentes tiene un precio elevado o es de difícil adquisición, es por ello que los productores deciden utilizar en su lugar ingredientes con características similares o que puedan conferirle al producto ciertas características por un menor precio.

Si bien la sustitución de ingrediente por otro de menor valor no representa un riesgo directo para la salud del consumidor, si dicha sustitución no se da a conocer en el etiquetado del producto, esto se refiere a un fraude alimentario.

La carne de venado puede variar de precio según la región, la subespecie, la calidad de la carne o el corte, según (Martínez, 2014) el precio por kilo de la canal de venado se encuentra entre los \$130.00 y los \$180.00 y tomando como referencia los precios durante la obtención de las muestras para este proyecto, si se compara con carnes convencionales como el bovino y el cerdo que se encuentran en un precio aproximado entre \$50.00- \$70.00 según estudios del Gobierno de la Cd. de México la diferencia suele ser muy amplia.

Por esta razón es común encontrarse con estudios referentes a la presencia de carnes de menor valor económico en productos realizados con carnes exóticas, como lo es la de venado, con el fin de obtener una ganancia económica para el productor.

Según el estudio realizado por Druml en el 2014 donde se encontró adulteraciones en productos de carne de venado en la zona de Austria, es común la sustitución de esta carne por carne de cerdo y bovino no solo por su evidente diferencia de precio si no por sus características organolépticas y composición química.

En los cuadros 1, 2 y 3 presentados anteriormente se puede observar la composición química de la carne de bovino, cerdo y venado respectivamente, donde las cantidades de proteína son muy similares entre ellas al ser de origen animal, sin embargo la cantidad de grasa es mayor en la carne de bovino y cerdo que en la de venado, muchas veces esta característica se busca para la mejora de los productos.

Por otro lado la similitud de las características organolépticas de la carne de bovino y venado, como su color rojizo y sabor intenso pueden ser causas para pensar en una adulteración con esta carne.

La omisión de los ingredientes presentes en un producto en el etiquetado puede provocar consecuencias en personas alérgicas a ciertos ingredientes o que su religión no les permita su consumo.

1.5.2 Adición de sustancias no permitidas

Existe una gran variedad de diferentes orígenes, de sustancias las cuales se adicionan a un producto para conferirle las características deseables, sea en su color, sabor, texturas, estabilidad, etc. Muchos de ellos está prohibidos utilizarlos en alimentos y otros cuentan con cantidades permisibles, esto según la legislación en cada país.

La soya en su estado original es un frijol de la familia de las leguminosas sin embargo, este no se utiliza como extensor, existen derivados de la soya como el

aislado, concentrado o la harina de soya los cuales suelen adicionarse para brindarle ciertas características a los productos.

Existe una diferencia entre los concentrados y los aislados de soya la cual se basa en su contenido de proteínas, los concentrados proteicos de soya suelen contener entre 52 a 65% de proteína, por otro lado los aislados suelen tener entre 85 y 90% de proteína; pero en ambos casos para su obtención es necesario reducir los factores antinutritivos de la soya, lo cual puede realizarse por dos métodos: extracción o fermentación (FEDNA, 2018).

Cualquiera de los dos tipos de productos de soya antes mencionados son utilizados en productos cárnicos como extensores, por sus características las cuales brindan grandes beneficios, así como su fácil adquisición, precio y su perfil de aminoácidos

Los extensores son materiales ricos en proteína a los cuales se les puede atribuir propiedades funcionales como el aumento de la capacidad de retención de agua, emulsificación de grasas y la formación de geles, pero su uso no es siempre con el fin de un beneficio económico sino también para obtener una mayor estabilidad o efecto tecnológico en los productos (Andújar G. G., 2000).

La adulteración de productos cárnicos con proteína de soya no representa un daño aparente para la salud del consumidor, sin embargo, existe normativa alrededor de las cantidades permitidas de esta proteína y superar estas cantidades o no hacerle saber al consumidor por medio del etiquetado que la contiene representa un fraude y para aquellas personas alérgicas a esta leguminosa su consumo puede traer consecuencias para la salud.

Los productos de carne de venado debido a las características de la materia prima con la cual se realizan pueden ser adicionados con productos de soya como concentrados y aislados para obtener productos con una mayor estabilidad y como consecuencia secundaria, pero benéfica para los productores, un aumento en la producción con la misma cantidad de materia prima.

1.6 ADULTERACIONES EN EL ETIQUETADO

Según la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 se define a una etiqueta como cualquier rótulo, marbete, inscripción, imagen u otro material descriptivo o gráfico, escrita, impresa, estarcida, adherida o sobrepuesta en el envase del producto preenvasado o en el embalaje del mismo. El etiquetado de un producto debe llevar ciertas características e información del producto con el fin de dar a conocer al consumidor sobre aquello que está consumiendo.

Una de las características de mayor importancia en el etiquetado de un producto son los ingredientes con los cuales fue realizado, según la misma norma los ingredientes son cualquier sustancia o producto, incluyendo aditivos, que se utiliza en la preparación o tratamiento de un alimento o bebida y esté presente en el producto final ya sea transformado o no.

Es importante mencionar que es obligación del productor poner una etiqueta con contenido útil y vocabulario entendible para todos los consumidores, así como declarar todos los ingredientes utilizados que constituyan más del 5% del producto final en orden decreciente incluidos los aditivos.

Como se mencionó anteriormente la omisión de un ingrediente en el etiquetado puede representar un riesgo para aquellos consumidores con alergias a ciertos alimentos, la NOM-051 indica ciertos alimentos y aditivos como la soya, que deben especificarse ya que son alérgenos comunes, ya sea que estén dentro de la composición del alimento o que dentro de la planta se trabaje con dichos ingredientes.

Si bien no existe una norma específica para productos elaborados con carnes exóticas, todos los productores tienen la responsabilidad de cumplir con la normativa ya existente para los alimentos, la ausencia del etiquetado o la omisión de ingredientes utilizados en un producto representa un fraude alimentario, que no permite a los consumidores seleccionar sus productos de manera adecuada.

1.5 TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ADULTERACIONES

A lo largo de los años debido a la presencia en los diferentes países de estas adulteraciones en los productos cárnicos así como en carne fresca, se han utilizado diferentes metodologías para identificarlas y así hacer del conocimiento de los consumidores este tipo de fraudes. Algunas de estas técnicas son las siguientes.

➤ **Electroforesis capilar**

Técnica que combina aspectos de la electroforesis convencional y el HPLC, la separación está basada en la migración diferencial en un campo eléctrico sin la presencia de un gel, la detección ocurre conforme se separa generando señales detectadas por absorbancia UV, fluorescencia o espectrometría de masas, las ventajas de esta técnica durante la autenticación de productos cárnicos radica en las bajas cantidades de muestra necesaria, con este se pueden analizar proteínas, DNA, RNA (Hernández J. G., 2007).

➤ **Espectroscopía infrarroja media por transformada de Fourier**

Técnica ampliamente usada para el control de calidad, es un método rápido usando poca cantidad de la muestra y sin dejar residuos. Se crean modelos quimiométricos basados en la señal infrarroja por transformada de Fourier de cada adulterante con ayuda de su composición química para determinarlas en una muestra simultáneamente (Hernández M. M., 2008).

➤ **Cromatografía de gases**

Esta técnica se lleva a cabo en una columna donde la fase móvil es un gas inerte y la fase estacionaria es un sólido, estas columnas tienen una mayor capacidad de separación y puede ser usado para saber la composición de un producto así como a presencia de ciertos componentes en este (UNAM, 2017).

➤ **Identificación de proteínas**

En esta técnica se elige una proteína que sea específica en el alimento y con la cual se puede identificar la presencia de la especie de cual proviene dicha proteína, en el ámbito de la identificación de adulteraciones en lácteos es ampliamente usada dicha técnica (Chávez, 2018). Una de las desventajas del uso de proteínas como una molécula a estudiar es que éstas son susceptibles a la desnaturalización durante procesos a altas temperaturas

➤ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en una reacción bioquímica, catalizada por enzimas que imita al proceso de replicación de las celular eucariotas, en la cual a partir de un pequeño fragmento de ADN se obtienen múltiples copias las cuales pueden analizarse posteriormente (Garza, 2018), la ventaja de este método es el uso de la molécula de ADN que no se ve afectada en productos sometidos a altas o bajas temperaturas, es por ello que se seleccionó esta técnica para la identificación de adulteraciones en este proyecto, por lo que se describirá más a detalle a continuación.

1.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En 1981 el investigador Kary Mullis propuso un método que lograba multiplicar un fragmento definido de ADN de forma in vitro sin la necesidad del uso de vectores y su replicación en bacterias, siendo este el método que revolucionó las técnicas dentro de la biología molecular, en poco tiempo esta técnica se utilizaba no solo para investigación sino también para diagnóstico clínico. Este fue llamado Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (Costazar, 2004).

La reacción en cadena de la polimerasa permite generar múltiples copias de un fragmento de DNA de alguna especie en específico, siendo los fragmentos de DNA complementarios y de cadena sencilla uno de los requisitos fundamentales para llevar a cabo la reacción, estos serán utilizados como cebadores (Pérez, 2018).

Acorde a Cortazar, 2004 esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de ADN millones de veces y el tramo a reproducir puede tener una longitud de cincuenta a dos mil pares de bases. Al descubrirse esta técnica era un proceso manual lento el cual requería de trabajos complicados, pero científicos como Cetus comenzaron a buscar maneras de automatizar el proceso hasta llegar a lo que hoy conocemos.

La técnica de PCR se caracteriza por su alta sensibilidad, por lo que para su aplicación se requieren de muestras de ADN con pureza y concentración muy específicas, en el caso de la concentración se recomiendan 60 ng/ μ L ya que con esta concentración se logra un número adecuada de copias de ADN que permita su análisis o su posterior uso; en el caso de la concentración de bases nitrogenadas se debe obtener 1.7 a partir de la relación 260/280, este dato da una idea de la ausencia de contaminantes como lípidos o proteínas.

1.8.1 Fundamento

Según Mas, 2001 la PCR es una técnica in vitro que permite multiplicar secuencias específicas de ADN presente en diferentes muestras biológicas de una forma simple y rápida, obteniendo millones de copias. Este método se basa en la replicación de DNA de las células eucariotas realizada por la DNA polimerasa mediante la repetición sucesiva de un ciclo de tres pasos (Díaz, 2013).

La DNA polimerasa se encarga de realizar una síntesis de una cadena complementaria de DNA en sentido 5' a 3' usando un molde de cadena sencilla llamado primer, este fue tomado de la misma secuencia de DNA que se quiere multiplicar siendo esta complementaria al amplificado (Mas, 2001).

1.8.2 Etapas de la PCR

Frecuentemente la técnica de PCR se describe en tres pasos característicos que describen las etapas por las que pasa el DNA para multiplicarse, teniendo cada una de estas un número de ciclos y condiciones acorde con las actividades que se realizan en cada etapa, las cuales son las siguientes (Greif, 2018):

1. Desnaturalización: durante esta etapa la cadena del DNA diana se desnaturaliza, separando sus dos hebras, esto se logra aumentando la temperatura hasta 94°C lo cual asegura que todas las moléculas se separen en una sola hebra para permitir los siguientes pasos.
2. Hibridación: en esta etapa la temperatura disminuye hasta una temperatura de hibridación T_m la cual dependerá de los primers seleccionados para realizar la reacción, esta disminución permitirá que los primers se unan al DNA diana en una región específica. Una vez unido el primer a la cadena comienza la etapa cíclica donde se duplican los fragmentos producidos usando como base los del ciclo anterior y siguiendo los pasos ya mencionados.

3. Extensión: en esta última etapa la temperatura de reacción aumenta a 74°C, la cual es considerada como la temperatura óptima para que la TAG polimerasa actué.

A continuación se muestra en la figura 12 como sucede a nivel molecular el proceso durante la PCR en una cadena de ADN.

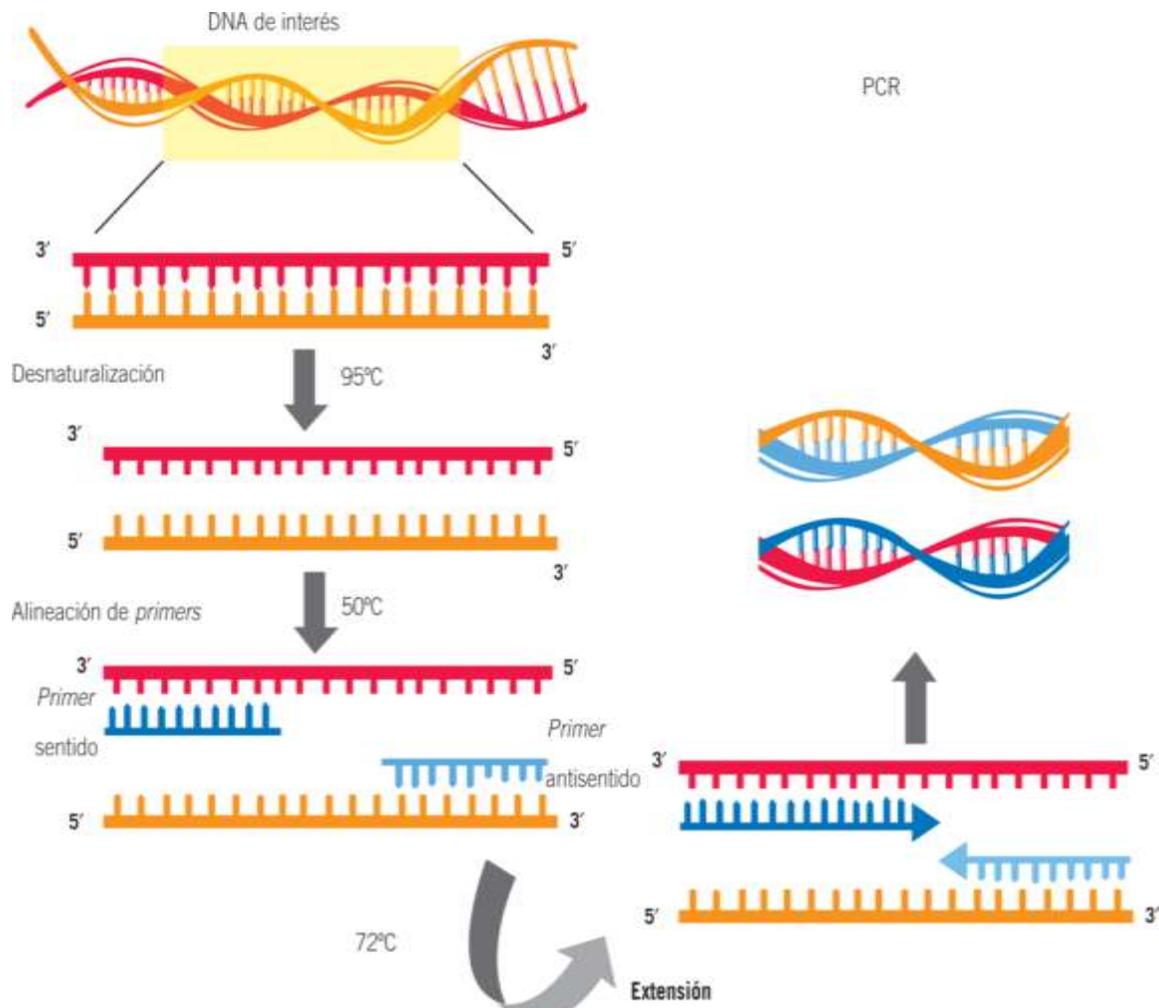


Figura 12: Etapas de la técnica de PCR

1.8.3 Componentes de la reacción

Para llevar a cabo la técnica de PCR se necesitan ciertos reactivos así como muestras biológicas que darán lugar a la reacción y permitirán el multiplicado de la cadena de DNA, estas son:

- DNA molde: este se extrae por medio de una técnica de algún organismo y es el cual se quiere copiar, este puede ser nuclear, mitocondrial o de cloroplasto según sea animal o vegetal el organismo y debe contenerse en la cantidad suficiente para poder ser usado para la técnica, la cual es 60ng/ μ L.
- Primers o cebadores: son oligonucleótidos cortos, de entre 18 y 30 pares de bases, estos son complementarios a la cadena de ADN molde que se desea amplificar. Para la PCR se utilizan dos primers cada uno complementario a las dos hebras de ADN delimitando la región a amplificar. Estos deben ser específicos para la especie de interés (Greif, 2018). Los primers son uno de los componentes que le dan la especificidad y sensibilidad a la técnica de PCR, por ello es necesario considerar a la temperatura de hibridación (T_m) una característica importante, la T_m indica la temperatura adecuada a la cual los primers logran unirse de forma complementaria al ADN molde.
- TAG polimerasa: enzima que interviene en la replicación del DNA, estas son capaces de adicionar los dNTP's a partir del extremo 3' del primer y copiar una secuencia molde. Las TAG polimerasa sintetizan el DNA en dirección 5' a 3' (Greif, 2018).
- dNTP: estos son los nucleótidos libres en el medio, son tomados por la TAG polimerasa para unirlos a las copias de la cadena complementariamente.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$): este se encuentra normalmente con la enzima TAG polimerasa comercial a una concentración estándar y este actúa como GraRcatalizador y para darle a la enzima su completa actividad (Greif, 2018).

1.8.4 Ventajas y desventajas de la PCR

Como todas las técnicas usadas en la biología molecular y como tal para la identificación de adulteraciones que es el objetivo de este proyecto, la PCR cuenta con ventajas y desventajas inherentes en su proceso, si bien es necesario seguir las recomendaciones cuando se realiza, esta puede llegar a presentar fallas, pero también puede representar una técnica muy favorable para ciertos estudios.

Algunas de sus ventajas son (UNED, 2000):

- Gran sensibilidad y especificidad, permitiendo la detección de ADN en muestras de productos procesados a altas temperaturas.
- Rapidez, copiado de segmentos de ADN en pocas horas con ayuda de equipos relativamente poco sofisticados.
- Robustez, la técnica de PCR permite amplificar secuencias específicas de material que contiene DNA degradado o que se encuentre en medios que disminuyen su purificación.

Por otro lado algunas de sus desventajas pueden llegar a ser las siguientes (UNED, 2000):

- Disponibilidad de información sobre la secuencia de DNA molde, para poder seleccionar los primers se requiere de la secuencia de DNA, lo cual requiere que haya sido previamente caracterizada.
- Tamaño corto de los amplificados, una desventaja que muchos que han aplicado esta técnica ven es que no permite que las copias de ADN sean muy grandes, a comparación de las que se logran por medio de la clonación de células.
- Infidelidad en la replicación, al ser una técnica in vitro la tasa de errores durante el copiado (replicación) es mayor, ya que la TAG polimerasa no tiene actividad exonucleasa.
- Peligro de contaminación, esto debido que al hacer la técnica puede estar expuesto a diversos ADN que se encuentran en el ambiente.

1.8.5 Aplicaciones de la PCR

Las aplicaciones de la técnica de PCR es muy variada, está a logrado ubicarse en diferentes ámbitos de las ciencias que trabajan con el DNA de los microorganismos y con ellos realizan diversos estudios, esto debido a todas sus ventajas y lo que dicha técnica ofrece.

Es por ello que unas de las aplicaciones que se pueden mencionar son en la medicina forense y clínica permitiendo el diagnóstico de enfermedades infecciosas así como de enfermedades asociadas al ADN, así como la detección de células asociadas al cáncer (Fariña, 2018). En cuanto a la ciencia forense se usan las huellas dactilares y los fragmentos de DNA aisladas de escenas de crimen pueden identificarse a los culpables por medio de una base de datos (Cheriyedath, 2018).

En microbiología permite la identificación y tratamiento temprano de organismos infecciosos lo cual tiene una implicación muy grande en la salud pública, por otra parte en la virología ayuda a descubrir y para caracterizar los ácidos nucleicos de diversos virus lo cual permite una mayor comprensión del comportamiento del virus durante la infección (Cheriyedath, 2018). Esta técnica también permite detectar ADN proviral de virus como parte de su ciclo replicativo, se encuentra integrado en el genoma de células infectadas (Bucafusco, 2012).

Una de las aplicaciones más usada en los alimentos es la identificación no solo de otras especies en un producto usadas como adulterantes que es el objetivo de este proyecto, sino que también pueden identificarse polimorfismos en plantas y animales que se encuentran en cierta sección del ADN que con ayuda de otra técnica llamada RFLP pueden cortar la cadena e identificarse, así como la detección de transgénicos tanto en productos naturales como procesados (UAM, 2018).

1.9 JUSTIFICACIÓN

El venado (*Cervus elaphus*) es un mamífero que en la parte centro de México tiene un gran desarrollo sin embargo este no es considerado comúnmente para consumo alimenticio. Existen estados tales como el estado de México y Michoacán los cuales presentan un gran número de especímenes que pueden representar un riesgo para el medio ambiente al estar agotando los recursos para mantener a la especie (Martínez, 2015). Una de las soluciones propuestas es el consumo de cierta cantidad de venados, a su vez esta especie aporta una gran cantidad de proteínas con un menor contenido de grasa en comparación a la carne de cerdo o bovino lo cual puede llegar a ser atractivo para el consumidor.

Al no ser, la carne de venado, un producto muy demandado por los consumidores este no está al alcance fácil de los consumidores tanto en el espacio geográfico como económicamente, su precio es elevado por la escases de animales de esta especie para el consumo humano, esto puede llevar a los productores de carne de venado a sustituirla por carne de cerdo o bovino para así obtener un ventaja económica (FAO, 2017), el problema radica cuando esta información se mantiene oculta al consumidor.

El desarrollo de técnicas de manejo de venados crea una alternativa viable de producción en criaderos permitiendo la comercialización de productos de alta calidad y el control del precio de estos (Cruz, 2001).

Ocultar los ingredientes de un producto al consumidor representa no solo una violación a la normatividad si no un riesgo para los consumidores, ya que estos pueden presentar alergias a ciertos ingredientes del producto o no ser permitido su consumo por cuestiones religiosas, así como afectar la calidad de la nutrición de los consumidores (FAO, 2017).

Identificar los productos que fueron adicionados con carne que no es de venado sino que pertenece a otro tipo de mamíferos tales como el cerdo o bovino así como la identificación de sustancias que no se encuentran señaladas en la etiqueta del producto tales como la soya, representa una gran importancia tanto para aquellos

que ya son consumidores regulares de productos a base de esta carne como para aquellos que en un futuro encuentren atrayente su consumo.

La razón de este estudio es verificar si los productos que se venden tanto en supermercados como en mercados de la ciudad de México tienen adulteraciones de carne de otras especies diferente a la de venado o la adición de sustancias no reportadas en su etiqueta, verificando su correcto etiquetado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual consiste en amplificar millones de veces un segmento de ADN a lo largo de varios ciclos con la ayuda de la enzima polimerasa obteniendo así la comparación de las cadenas de ADN presentes en el producto y verificar si existe la presencia de soya (*Glycine max*) o carne cerdo (*Sus scrofa domesticus*) o bovino (*Bos taurus*).

1.10 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

- **Objetivo general**

Identificar adulteraciones en productos de carne de venado con soya (*Glycine max*) así como carne de bovino (*Bos taurus*) y cerdo (*Sus scrofa domesticus*) mediante la técnica de PCR.

- **Objetivo particular 1**

Diseñar primers que amplifiquen para las especies de venado (*Cervus elaphus*), bovino (*Bos taurus*), cerdo (*Sus scrofa domesticus*) y soya (*Glycine max*) respectivamente, mediante programas bioinformaticos para así identificar la secuencia de ADN de estudio.

- **Objetivo particular 2**

Comprobar los primers diseñados para cada especie: venado (*Cervus elaphus*), cerdo (*Sus scrofa domesticus*), bovino (*Bos taurus*) y soya (*Glycine max*), aplicando la técnica de PCR, para confirmar su especificidad.

- **Objetivo particular 3**

Aplicar la técnica de PCR a diferentes productos de carne de venado (*Cervus elaphus*), con ayuda de los primer específicos, para la identificación de posibles adulteraciones con soya (*Glycine max*) y carnes de bovino (*Bos taurus*) y cerdo (*Sus scrofa domesticus*).

- Hipótesis

Si al aplicar la técnica de PCR a los productos de carne de venado, se obtienen amplificadas de 398, 331 y/ o 305 pb, se puede establecer que existe una posible adulteración con carne de cerdo, bovino o soya respectivamente en los productos analizados.

2.1 ESQUEMA EXPERIMENTAL

“Identificación de la presencia de soya, carne de cerdo y bovino como adulterantes en productos de carne de venado mediante la técnica de PCR”

Si al aplicar la técnica de PCR a los productos de carne de venado, se obtienen amplificados de 398, 331 y/o 305 pb, se puede establecer que existe una posible adulteración con carne de cerdo, bovino o soya respectivamente en los productos analizados

Objetivo General: Identificar posibles adulteraciones en productos de carne de venado con soya (*Glycine max*) así como carne de bovino (*Bos taurus*) y cerdo (*Sus scrofa domesticus*) mediante la técnica de PCR.

Objetivo Particular 1

Diseñar primers que amplifiquen para las especies de venado (*Cervus elaphus*), bovino (*Bos Taurus*), cerdo (*Sus scrofa domesticus*) y soya (*Glycine max*) respectivamente, mediante programas bioinformaticos para así identificar la secuencia de ADN de estudio.

Actividad 1.1: Investigación bibliográfica de la cadena de ADN para cada especie a estudiar.

Actividad 1.2: Diseño de primers para cada especie con ayuda de programas Bioinformaticos.

Objetivo Particular 2

Comprobar los primers diseñados para cada especie: venado (*Cervus elaphus*), cerdo (*Sus scrofa domesticus*), bovino (*Bos taurus*) y soya (*Glycine max*), aplicando la técnica de PCR, para confirmar su especificidad.

Actividad 2.1: Extracción de DNA de diferentes especies, cerdo (*Sus scrofa domesticus*), bovino (*Bos taurus*), venado (*Cervus elaphus*), pollo (*Gallus domesticus*), conejo (*Oryxtolagus cuniculus*), pescado (*Oreochromis sp*), avena (*Avena sativa*), maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*) y trigo (*Triticum*).

Actividad 2.2: Cuantificar el DNA extraído de cada especie.

Actividad 2.3: Ver la integridad de DNA de cada muestra por medio de una electroforesis

Actividad 2.4: Desarrollar la técnica de PCR para cada especie y llevarlo a un gel de electroforesis para comprobar la especificidad

Objetivo Particular 3

Aplicar la técnica de PCR a las extracciones de ADN de productos de carne de venado (*Cervus elaphus*), haciendo uso de los primer específicos, para la identificación de posibles adulteraciones con soya (*Glycine max*) y carnes de bovino (*Bos taurus*) y cerdo (*Sus scrofa domesticus*).

Actividad 3.1: Extracción de DNA de los productos a base de carne de venado.

Actividad 3.2: Cuantificar y ver la pureza de las muestras de DNA extraído.

Actividad 3.3: Ver la integridad del DNA de cada muestra por medio de una electroforesis.

Actividad 3.4: Aplicar la técnica de PCR para las muestras de carne de venado usando los primers de cada especie y realizar un gel de electroforesis para su análisis

Análisis de resultados

Conclusiones

Figura 13: Esquema experimental.

2.1.1 Descripción de actividades del esquema experimental

La figura numero 13 corresponde al esquema experimental donde se plasmaron las actividades para la realización del proyecto y para el cumplimiento de los objetivos, a continuación se presentan las actividades ejecutadas para el cumplimiento de los objetivos anteriormente presentados.

- Actividades del objetivo particular 1

Actividad 1.1: Investigación bibliográfica de la secuencia de ADN para cada especie a estudiar.

Actividad 1.2: Diseño de primers para cada especie con ayuda de programas bioinformaticos, tomando en cuenta las características necesarias, tales como el número de pares de base, la temperatura de hibridación, etc.

- Actividades del objetivo particular 2

Actividad 2.1: Extracción de DNA de diferentes especies, cerdo (*Sus scrofa domestica*), bovino (*Bos taurus*), venado (*Cervus elaphus*), pollo (*Gallus domesticus*), conejo (*Oryxtolagus cuniculus*), pescado (*Oreochromis sp*), avena (*Avena sativa*), maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*) y trigo (*Triticum*), las cuales se van a utilizar para comprobar la especificidad de los primers.

Actividad 2.2: Cuantificar y ver la pureza del DNA extraído de cada especie por medio de una espectrofotometría.

Actividad 2.3: Ver la integridad de DNA de cada muestra por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Actividad 2.4: Desarrollar la técnica de PCR para cada especie y llevarlo a un gel de electroforesis para comprobar la especificidad.

- Actividades del objetivo particular 3

Actividad 3.1: Extracción de DNA de los productos a base de carne de venado.

Actividad 3.2: Cuantificar y ver la pureza de las muestras de DNA extraído por medio de espectrofotometría.

Actividad 3.3: Ver la integridad del DNA de cada muestra por medio de una electroforesis en gel de agarosa.

Actividad 3.4: Aplicar la técnica de PCR para las muestras de carne de venado usando los primers de cada especie y realizar un gel de electroforesis para su análisis.

2.2 MATERIALES

Para poder llevar a cabo la experimentación en este proyecto fueron necesarios una serie de materiales, reactivos y equipos que se encuentran enlistados en los anexos, por otro lado se utilizaron muestra de material biológico las cuales se mencionan a continuación:

- Carne de bovino (*Bos taurus*)
- Carne de cerdo (*Sus scrofa domesticus*)
- Carne de venado (*Cervus elaphus*)
- Frijol de soya (*Glycine max*)
- Productos a base de carne de venado

En el cuadro 6 se pueden observar las muestras utilizadas durante la experimentación de productos y carne de venado:

Cuadro 5: Muestras de productos a base de carne de venado utilizados en la experimentación

MUESTRA	DENOMINACIÓN	PROCEDENCIA	PRECIO (\$/pieza)
Hamburguesa	MV1	Mercado de San Juan	130
Hamburguesa	MV2	Mercado de San Juan	150
Tinga	MV3	Mercado de San Juan	90
Adobo	MV4	Mercado de San Juan	110
Mixiote	MV5	Mercado de San Juan	150
Corte (falda pza.80g)	MV6	Mercado de San Juan	80
Corte (pierna pza.100g)	MV7	Mercado de San Juan	40
Corte (falda pza.50g)	MV8	Veracruz	40
Arrachera	MV9	Carnuz	-----
Carne molida	MV10	Carnuz	-----

Los productos utilizados para la experimentación fueron adquiridos principalmente en el Mercado de San Juan ubicado en la zona centro de la Ciudad de México ya que este es el lugar donde más comúnmente se pueden conseguir estos productos dentro del área metropolitana; dos de las muestras se compraron en una carnicería

dedicada a la venta de carnes exóticas ubicada en la delegación Azcapotzalco y solo una de las muestras fue traída del estado Veracruz esto debido a la falta de lugares donde conseguir muestras.

Acorde con las especificaciones en la metodología para la extracción de ADN de cada uno de los productos se requiere de 0.125g de cada muestra, con el fin de obtener suficiente ADN con concentración e integridad adecuada para su uso en la PCR. En el cuadro 7 se presentan las unidades experimentales utilizadas para cada muestra durante la extracción:

Cuadro 6: Unidades experimentales utilizadas para cada muestra.

Muestra	Denominación	Unidad experimental (g)
Hamburguesa	MV1	0.125
Hamburguesa	MV2	0.127
Tinga	MV3	0.123
Adobo	MV4	0.129
Mixiote	MV5	0.125
Corte (falda)	MV6	0.125
Corte (pierna)	MV7	0.124
Corte (falda)	MV8	0.128
Arrachera	MV9	0.131
Carne molida	MV10	0.140

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Extracción de ADN

Consiste en el aislamiento y purificación de la molécula de DNA, basándose en las características fisicoquímica de la molécula para su posterior uso en otras técnicas (Alejos, 2018).

- Disgregación del tejido

Para lograr la completa extracción de los componentes de un alimento y con ello lograr extraer el ADN se requirió la ruptura de la muestra, esto se realizó con ayuda de una navaja y mortero, posteriormente se pesó 0.125 g de cada muestra y se adiciono 1250µL de solución de lisis, la cual logra la desestabilización de la membrana celular permitiendo la salida de su contenido, al igual que 7µL de enzima proteinasa K (Bioline); una vez adicionados todos los elementos en un tubo Eppendorff se llevó a incubación a 50°C por dos horas y una vez transcurrido este tiempo se elevó la temperatura a 60°C por una hora más para detener la actividad de la enzima.

- Extracción de proteínas y polisacáridos del ADN

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se adiciono al tubo 250µL de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (Invitrogen), el fenol se encarga de disociar las proteínas que conforman el ADN, por su parte el cloroforma desnaturaliza las proteínas y lípidos presentes y el alcohol isoamilico funge como antiespumante; una vez adicionado se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm, al finalizar el tiempo con ayuda de una micropipeta se recuperó la fase acuosa superior y se dispuso en un tubo nuevo.

- Precipitación de ADN

Al tubo con muestra nueva se añadió 1500µL de etanol frío y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 10 minutos, esto con el fin de precipitar el ADN extraído durante el proceso el cual puede observarse como pequeñas manchas

blancas en las paredes del tubo. Una vez obtenida la muestra de ADN se decantó el líquido presente en el tubo y se llevó a incubar a 37°C por aproximadamente una hora para lograr la evaporación completa del etanol adicionado.

Para finalizar se agregaron 50µL de agua desionizada y se puso en el vortex para resuspender el ADN.

2.3.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación e integridad de las extracciones de ADN se realizó por medio de una espectrofotometría de UV visible, el equipo se basa en el empleo de un sistema que retiene la muestra por medio de la tensión superficial para formar un puente de líquido entre el pedestal inferior y superior, estos definen un paso óptico cuya longitud va a variar según la concentración de bases nitrogenadas de la muestra, el equipo estará conectado a un software el cual permitirá la visualización de los resultados (IdiPAZ, 2018). La metodología seguida para realizar la cuantificación fue la siguiente:

Para iniciar, la cuantificación se realizó con ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop el cual se encuentra conectado a una computadora que con ayuda de un software se logró visualizar los resultados, en este se seleccionó la opción de ácidos nucleicos, para comenzar a utilizar el equipo se depositó una muestra de 2µL de agua libre de nucleasas, una vez finalizado se limpió el sensor y se depositó nuevamente 2µL de agua libre de nucleasas para correr el blanco.

Una vez realizado el blanco, se prosiguió a las mediciones de cada extracción de ADN, depositando 2µL de la misma manera y registrando valores de concentración (ng/µL) y la relación 260/280 la cual nos indica la concentración de bases nitrogenadas en la muestra y debe encontrarse en un intervalo de 1.7-1.9 para considerar una concentración adecuada de lo contrario podría haber presencia de proteínas o RNA.

Si la muestra presenta una concentración arriba de 60 ng/ μ L deberá realizarse una dilución con agua libre de nucleasas, ya que dicha concentración es necesaria para realizar correctamente la PCR, de ser así la cuantificación se realiza nuevamente posterior a la dilución.

2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Para la realización de la PCR tanto para comprobar la especificidad de los primers como para la identificación de las adulteraciones en los productos de carne de venado se llevó a cabo de la siguiente manera.

Se programaron las condiciones según cada primer tomando en cuenta tanto las especificaciones del proveedor como los resultados del cálculo de la temperatura (T_m) de hibridación y los procedimientos y condiciones sugeridas por el proveedor.

Posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de componentes necesarios para la reacción, tomando en cuenta un blanco para asegurar la pureza de la reacción y un control positivo para la confiabilidad de resultados; una vez obtenidos los cálculos en un tubo Eppendorf se colocaron las cantidades, las cuales se encuentran descritas en el cuadro 8, de Kit Master mix o Gotaq (Promega), los primer frontal y reverso y el agua libre de nucleasas (Pisa), se le dio vortex para lograr la homogeneidad y se dividió en la cantidad de tubos necesarios para la reacción.

Cuadro 7: Componentes para la reacción de PCR.

Reactivo	Concentraciones para un tubo de PCR (μL)
Kit master mix / Gotaq	6.25
Primer frontal	0.25
Primer reverso	0.25
Agua libre de nucleasas	5.25

En cada uno de los tubos con los componentes ya mencionados se adiciono 0.5 μ L de ADN de cada una de las muestras nuevamente se colocaron en el vortex y en la microcentrifuga durante 5 segundos para retirar el líquido de las paredes; para concluir se colocaron en el termociclador con el programa de PCR previamente seleccionado.

2.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa puede ser utilizada para la visualización de fragmentos obtenidos durante la PCR para lo cual se preparan geles el 1.5% de concentración, de la misma manera para visualizar la integridad del ADN extraído en un producto se utilizan geles con una concentración del 1%

Para la realización de los geles fuera cualesquiera de las antes mencionadas su concentración, se pesó la cantidad de agarosa necesaria según la concentración y el tamaño de la cámara y se colocó en un matraz Erlenmeyer, se disolvió con TAE 1X previamente medido en una probeta, según la cámara podrían ser 30 o 50 mL.

La mezcla se llevó al microondas por lapsos de 20 segundos con el fin de disolver las partículas de agarosa, hasta obtener una solución completamente transparente, la cual se dejó enfriar a temperatura de 25-30°C para posteriormente adicionarle una gota de Bromuro de tidio (BRET) el cual ayudara a la visualización de los fragmentos. La solución se depositó en la cámara de electroforesis previamente armada, se le colocaron los peines para formar los pocillos y se dejó gelificar por aproximadamente 15 minutos. Una vez gelificado se retiró el peine cuidadosamente y se llenó la cámara con TAE 1X.

Una vez preparado el gel se prosiguió a la carga del mismo, para esto se colocó un papel parafilm sobre el cual se situaron 3 μ L de Bromuro de tidio (BRET) y 3 μ L de colorante blue-orange por cada muestra que se puso en la cámara, posteriormente se adiciono 5 μ L de la muestra y con ayuda de la micropipeta se homogeneizaron los tres componentes y se dispusieron dentro de cada pocillo.

Para la electroforesis de resultados de PCR fue necesario colocar en el primer pocillo adicionado a los componentes ya mencionados (BRET y colorante) 1 μ L de marcador de peso molecular el cual ayuda en la visualización del tamaño de los fragmentos obtenidos, en la figura 14 se muestra el marcador de peso molecular utilizado.

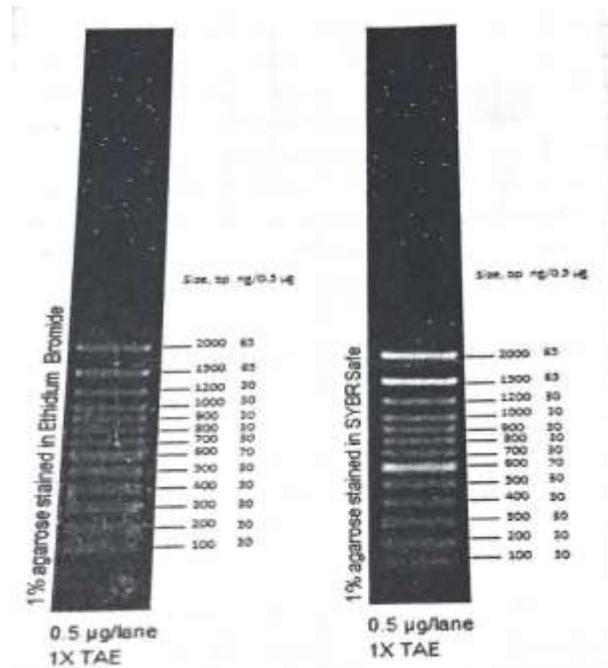


Figura 14: Marcador de peso molecular utilizado.
Marcado de peso Invitrogen de 100pb por banda

Al finalizar con todas las muestras se conectó la cámara a la fuente de poder a 60V para resultados de PCR y a 80-90 V si son de integridad. La corrida se finalizó una vez que el colorante se visualizó en el extremo opuesto del gel.

Para la visualización de los resultados en el gel de agarosa, se colocó el gel en el transluminador con ayuda de una palas comprobando que se situara en el centro para lograr una correcta visualización, se cerró la compuerta, se encendió la luz ultravioleta y se tomó la fotografía.

2.3.5 Diseño de primers de ciervo rojo

Para comenzar con el diseño de primers para ciervo rojo se necesitó de una región de su DNA del cual se obtuvo la secuencia de bases que sirvió como cebador, para ello se utilizó la base de datos de National Center of Biotechnology Information (NCBI), en el buscador se eligió la opción de “Nucleotide” y se colocó la especie de la cual se necesitaban los fragmentos de DNA en este caso se buscó *Cervus elaphus* ya que era la especie de interés.

Una vez obtenidos los fragmentos de la secuencias de DNA de la especie se seleccionaron aquellas que tuvieran par de bases suficientes para diseñar los primers en un programa bioinformático. Con ayuda del programa bioinformático Primerquest tool se seleccionaron los primers, subiendo al programa la secuencia de DNA de cada especie, este dio como resultado diferentes pares de primers los cuales se analizaron en base a las características necesarias para poder utilizarlos durante la PCR, estas son: número de pares de bases, T_m , porcentaje de G-C así como el amplificado que estos arrojaran durante la reacción.

Una de las características más importantes durante el diseño de los primers es la especificidad de estos para cada especie, debido a que se están identificando adulteraciones se requirió que cada primer solo amplificara para la especie correspondiente, ya que si este amplificaba para otras especies podría obtenerse un falso positivo.

Para comprobar dicha especificidad, una vez elegido el primer con las características ya mencionadas, con ayuda de la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en la base de datos NCBI el cual permite localizar similitudes entre secuencias biológicas, en este caso entre los primers seleccionado y las secuencia de ADN de diversas especies, una vez comprobada su especificidad se dio por concluida la selección de los primers.

Tomando en cuenta todas las características se realizó un programa de PCR el cual nos indica las condiciones de tiempo, temperatura y número de ciclos que los primers requieren para obtener resultados adecuados; una de las condiciones más

importantes es la temperatura de hibridación la cual se calculó para los primers de ciervo rojo seleccionados con la siguiente ecuación:

$$Tm = [(G + C)4 + (A + T)2] - 5$$

Donde:

G: número de Guaninas en el primer

C: número de Citosinas en el primer

A: número de Adeninas en el primer

T: número de Timinas en el primer

Y de la cual se obtuvo un resultado de 61°C para el prime frontal y 59°C para el primer reverso, se calculó un promedio y se obtuvieron 62°C de temperatura de hibridación.

El cálculo para el resto de los primers seleccionados a partir de artículos científicos se encuentra en los anexos.

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 RESULTADOS DEL OBJETIVO 1

En el objetivo uno se buscaba el diseño adecuado y específico para los primers de cada especie, para ello se utilizaron programas bioinformáticos así como bases de datos para seleccionar y conocer las secuencias de DNA de cada especie. Para la selección de los primers debieron tomarse en cuenta diferentes puntos para lograr la especificidad los cuales son los siguientes:

- Longitud de entre 18-25 pares de bases.
- Temperatura de hibridación T_m de entre 55 y 62°C y que no haya una diferencia de 2°C entre ambos primers.
- El porcentaje de G-C debe estar entre 40-60%.
- Obtener primers específicos comprobándolo mediante un BLAST.

En el cuadro 9 se muestran los primers seleccionados para la experimentación para cada especie de interés, así como las características que se tomaron en cuenta para su selección.

Cuadro 8: Características de los primer seleccionados para cada especie.

Especie	Primer	Tm (°C)	Tamaño del amplificado (pb)
Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)	PF: 5' GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCA TCTTGATGAAA 3' PR: 5' GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA 3'	60	398
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	PF: 5 GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCA TCTTGATGAAA3' PR: 5' CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAA G3'	60	331
Venado (<i>Cervus elaphus</i>)	PF: 5' GAGACGTGAAACATCGGAGTAG 3' PR: 5 CAAGTAGGTCTGGTGCGAATAA 3'	62	421
Soya (<i>Glycine max</i>)	PF:5' AGCGGGGTAGAGTAATTG 3' PR:5' CAAGGAGCAATCGTGAGGAATAG 3'	64	305

Programas de PCR

Para cada par de primers se realizó su programa de PCR el cual indica los ciclos y las temperaturas que se utilizaron en el termociclador al momento de realizar la técnica de PCR. Las temperaturas de hibridación (T_m) dependerán de cada par de primer seleccionado el cual se obtuvo de los programas bioinformáticos, por otra parte el número de ciclos depende de la muestra en este caso al ser productos cárnicos se seleccionaron 35 ciclos.

➤ Cerdo (*Sus scrofa domesticus*) y Bovino (*Bos taurus*)

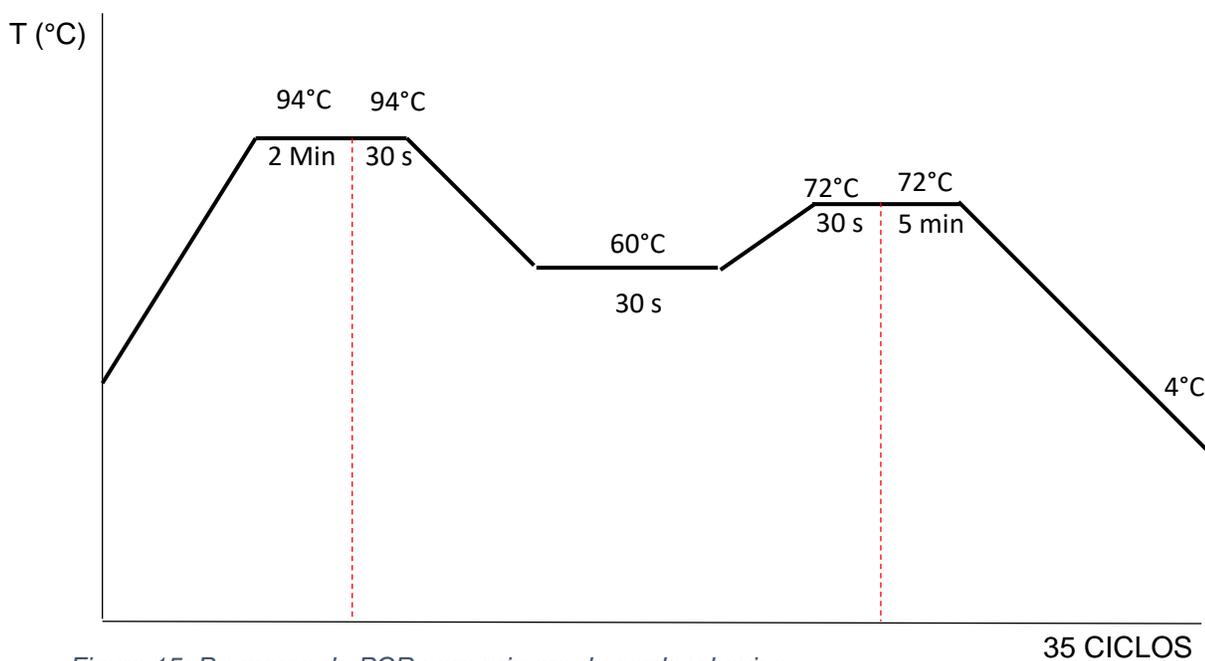


Figura 15: Programa de PCR para primers de cerdo y bovino

➤ **Soya (*Glycine max*)**

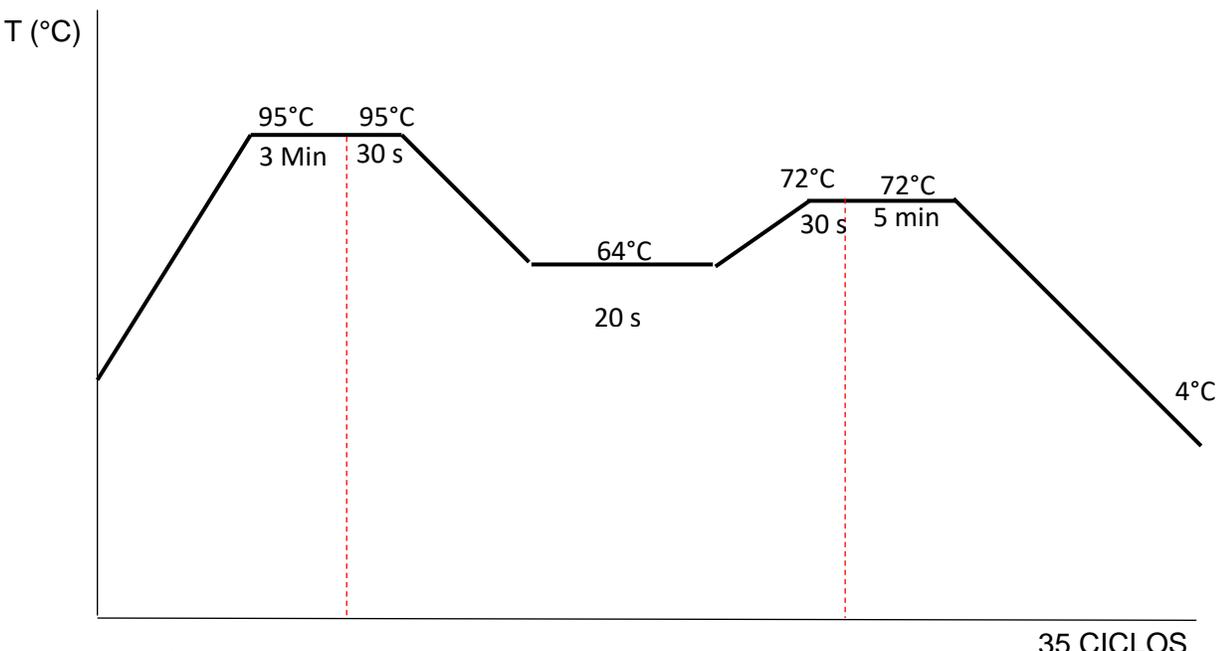


Figura 16: Programa de PCR para primers de soya

➤ **Venado (*Odocoileus virginianus*)**

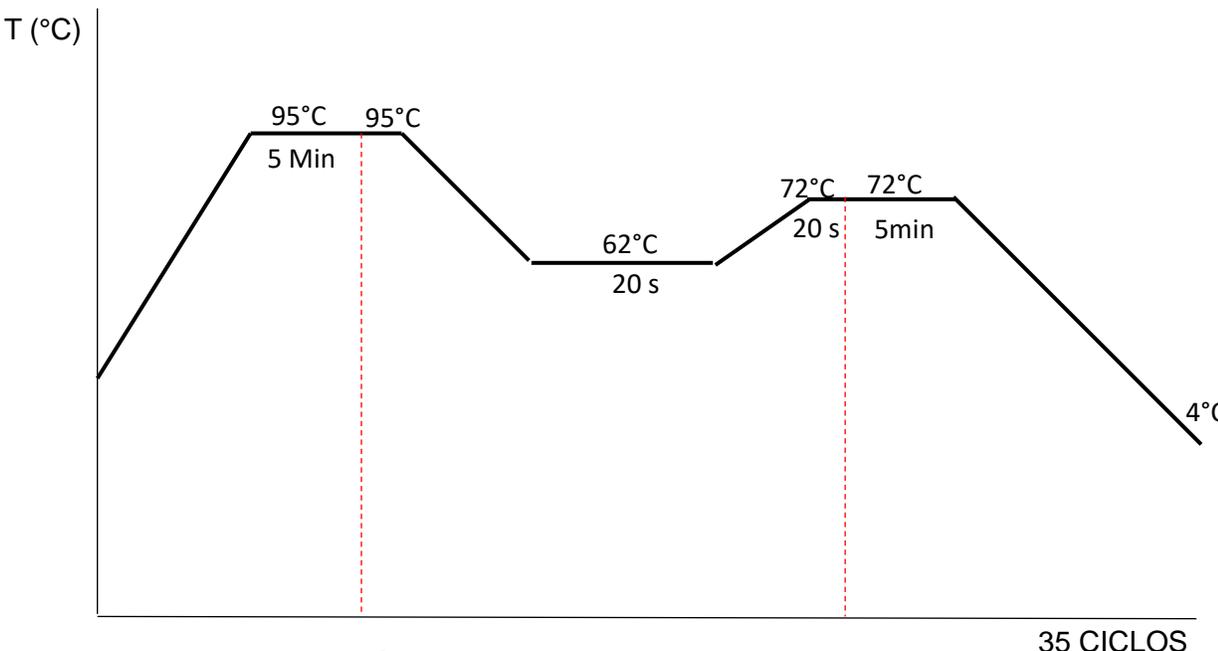


Figura 17: Programa de PCR para primers de ciervo rojo

3.2 RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

En el objetivo particular número dos se realizaron las actividades necesarias para obtener ADN tanto de las especies de interés, cerdo, bovino, venado y soya, como de especies filogenéticamente cercanas y lejanas a estas que nos permitieran verificar si los primers seleccionados amplificaban para la especie correspondiente así como su especificidad. El cuadro 10 muestra las especies utilizadas así como la pureza y concentración obtenidas durante la extracción, medidas con el fin de obtener extractos adecuados para la PCR.

Cuadro 9: Cuantificación de las extracciones para especificidad de los primers.

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280
Cerdo	70	1.99
Bovino	79.6	1.83
Conejo	71.4	1.53
Pescado	71.6	1.45
Avena	75.7	1.46
Trigo	76.8	1.5
Maíz	---	---
Soya	70	1.8

De la misma forma se realizaron extracciones de las especies de interés con el fin de obtener el control positivo y comprobar que los primers seleccionados amplificaran para dichas especies, para ello se obtuvieron muestras las cuales estuviéramos seguros su procedencia, en el caso de bovino, cerdo y venado que utilizaron partes del músculo del animal, para soya se utilizó el frijol de soya, en el cuadro número 11 se muestran los resultados de la cuantificación de dichas extracciones.

Cuadro 10: Cuantificación de las extracciones de los controles positivos para las especies de interés

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280
Venado (<i>Cervus elaphus</i>)	79.9	1.69
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	79.6	1.83
Cerdo (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	70	1.99
Soya (<i>Glycine max</i>)	70.8	1.8

Una vez obtenidas los extractos de las especies de interés se realizó una PCR para comprobar que los primers amplificaran para dicha especie así como la temperatura de hibridación adecuada para cada uno de ellos, los resultados fueron visualizados por medio de un gel de electroforesis y posteriormente con ayuda de un transluminador.

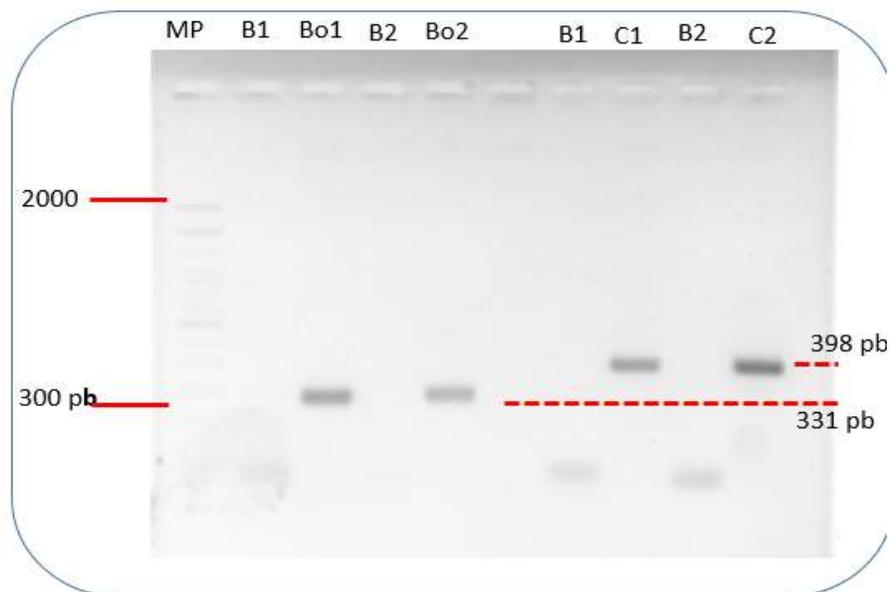


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para identificación de cerdo y bovino. MP: marcador de peso (Invitrogen), B: blanco, Bo1: bovino con sim 1, Bo2: bovino con sim 2, C1: cerdo con sim 1, C2: cerdo con sim 2

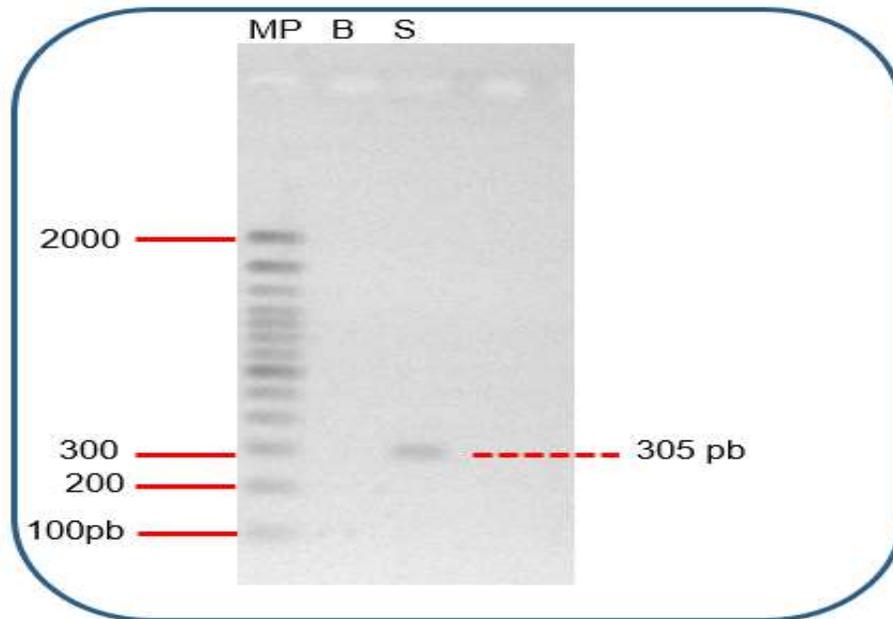


Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de soya. S: soya, MP: marcador de peso (Invitrogen), B: blanco

Como se puede observar en las imágenes anteriores los primers seleccionados para las especies de cerdo, bovino, venado y soya amplifican para cada una de las especies respectivamente; en el caso de cerdo y bovino se probaron dos primers frontales diferentes los cuales son comunes para diversas especies pero con un primer reverso distinto para cada especie se logra la especificidad.

Por otra parte se puede observar que en los tres primers utilizados se obtuvieron tamaños de amplificadas correspondientes a los indicados para cada par de primers y que la PCR es confiable ya que solo amplificaron los controles positivos y no los blancos.

Una vez verificando que los primers amplificaban para la especie correspondiente se realizó la PCR para comprobar su especificidad utilizando especies filogenéticamente cercanas y lejanas a cada una de las especies, con lo cual se esperaba solo amplificara para las especies de interés, de la electroforesis se obtuvieron los siguientes resultados.

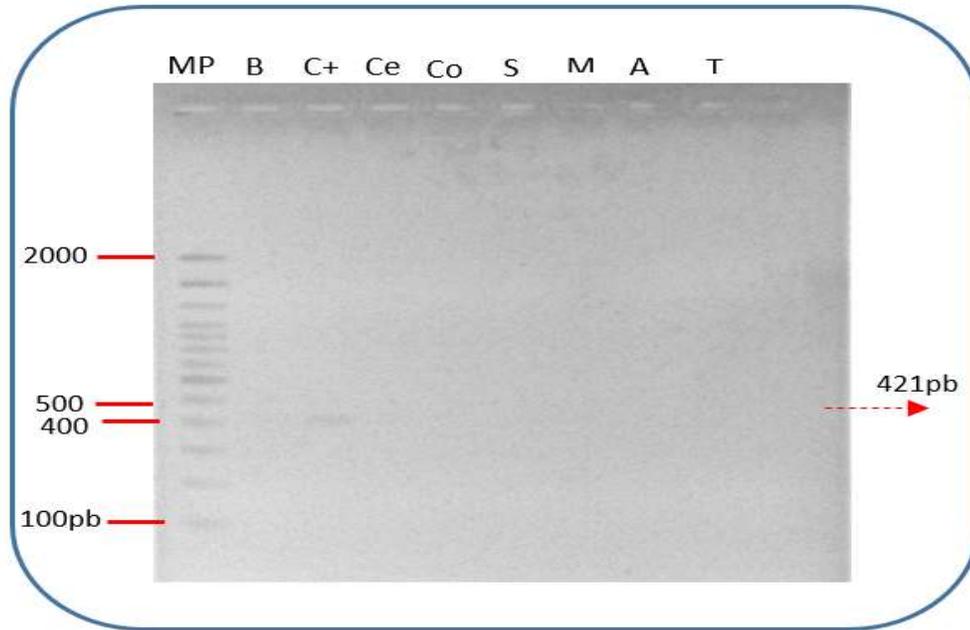


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para especificidad de primers de venado. MP: marcador de peso (Invitrogen), C+: venado, Ce: cerdo, Co: conejo, S: soya, M: maíz, A: avena, T: trigo

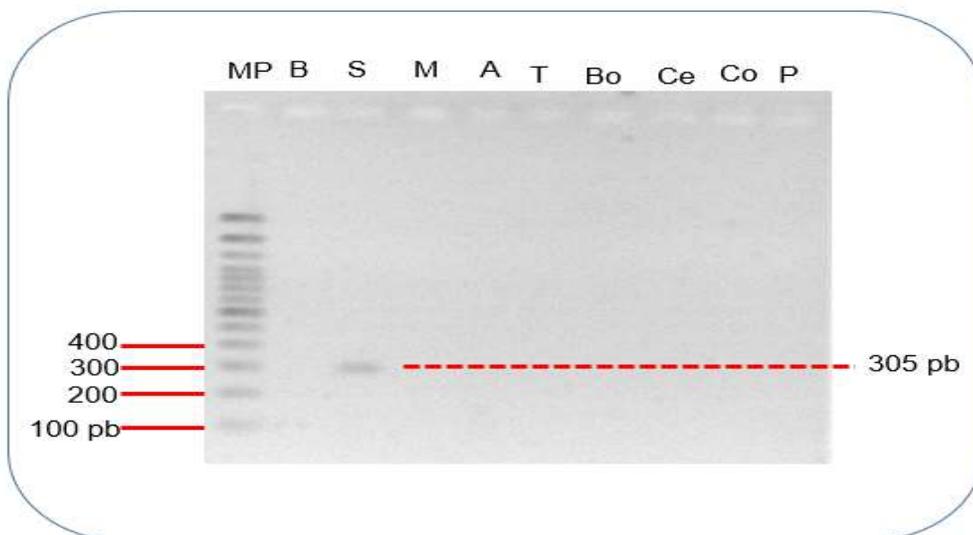


Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para especificidad de primers de soya. MP: marcador de peso (Invitrogen), S: soya, M: maíz, A: avena, T: trigo, Bo: bovino, Ce: cerdo, Co: conejo y P: pescado

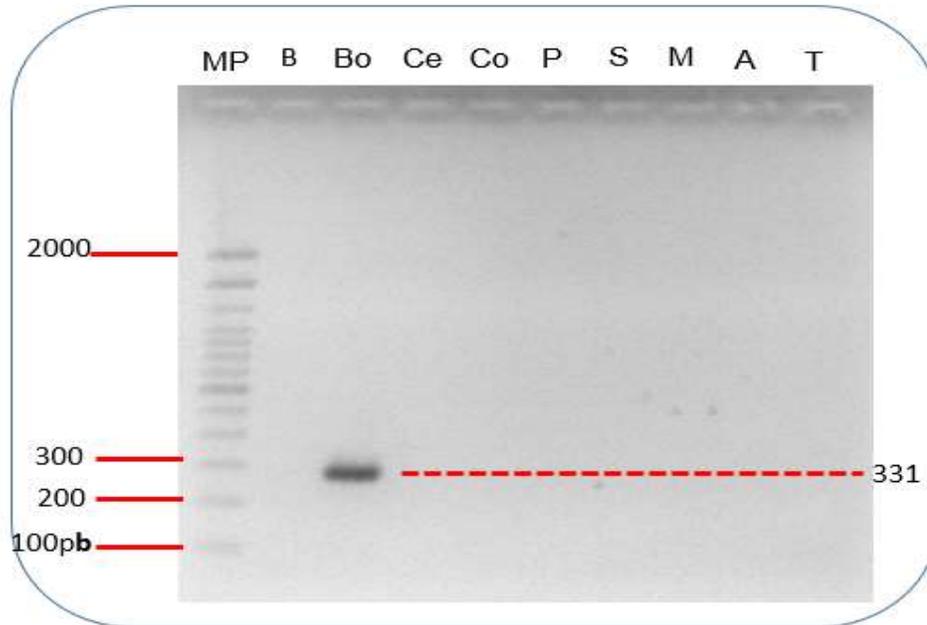


Figura 22: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para especificidad de primers de bovino. MP: marcador de peso (Invitrogen), Bo: bovino, Ce: cerdo, Co: conejo, P: pescado, S: soya. M: maíz, A: avena y T: trigo

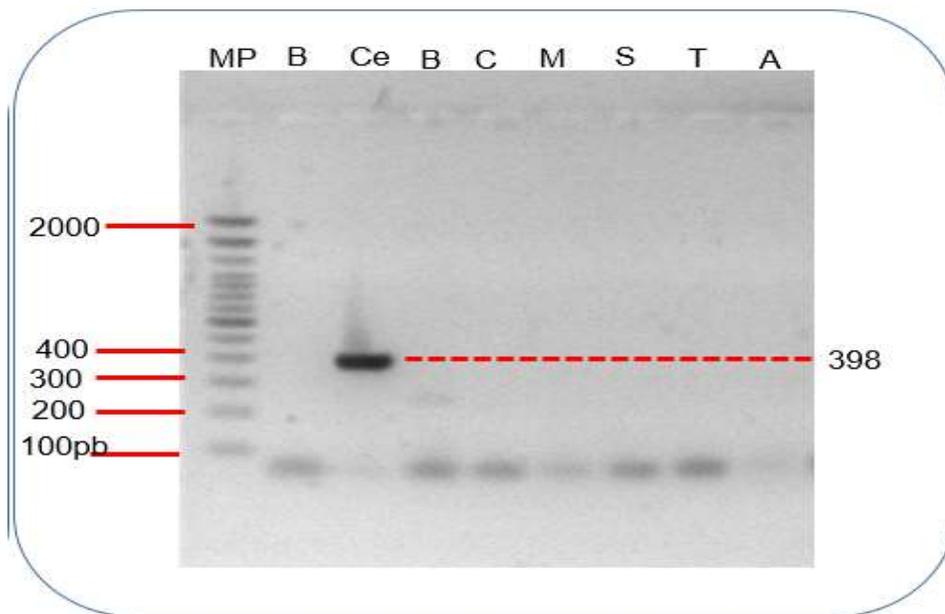


Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para especificidad de primers de cerdo. MP: marcador de peso (Invitrogen), Ce: cerdo, B: bovino, C: conejo, M: maíz, S: soya, T: trigo y A: avena

Las cuatro figuras anteriores muestran la especificidad de los primers seleccionados, ya que solo se puede observar un amplificado en la especie correspondiente a los primers y para ninguna otra de las especies ni cercana ni lejanas filogenéticamente amplificaron, esto nos garantiza falsos positivos al momento de buscar adulteraciones, ya que pueden presentarse otras especies aparte de las de interés.

3.3 RESULTADOS DEL OBJETIVO 3

Para el objetivo particular número tres se realizaron actividades con el fin de empezar a identificar adulteraciones con las diferentes especies de interés, que son bovino, cerdo y soya. Una vez comprobado la especificidad de cada uno de los primers y su funcionalidad se prosiguió a realizar la PCR con las muestras de carne de venado seleccionadas, para ellos se realizó la extracción de ADN en cada una de las muestras, algunas de ellas fueron preparadas con salsas que dificultaban la extracción del ADN de venado, por ello se realizaron lavados con agua libre de nucleasas para retirar estos aditivos y lograr una mejor extracción, se realizó una cuantificación para obtener la pureza y concentración adecuada para utilizar el ADN en la PCR y los resultados se presentan en el cuadro 12.

Cuadro 11: Cuantificación de extracción de las muestras de carne de venado

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280
Hamburguesa (MV1)	68.1	1.8
Hamburguesa (MV2)	91	1.7
Tinga (MV3)	93.7	1.68
Adobo (MV4)	80.4	1.79
Mixiote (MV5)	65.6	1.84
Corte (MV6)	58.3	1.78
Corte (MV7)	59.8	1.76
Corte (MV8)	84.4	1.82
Arrachera (MV9)	65	1.75
Carne molida (MV10)	71.2	1.79

Una vez obtenida las extracciones de ADN de cada muestra con las características de concentración y pureza adecuadas para someterlas a la técnica de PCR, cada una de las muestras fueron sometidas a la técnica de PCR con los cuatro primers de las especies de interés, primero para verificar la presencia de carne de venado (*Cervus elaphus*) y posteriormente para la identificación de adulteraciones con carne de cerdo y bovino así como la adición de soya.

➤ Identificación de venado (*Cervus elaphus*)

Con cada muestra se realizó una PCR utilizando los primers para ciervo rojo esto con el fin de comprobar que las muestras que se estaban trabajando y se adquirieron como productos a base de carne de venado fuera cierta, para ello se utilizó el kit Gotaq ya que al tener una mayor eficiencia para lograr un amplificado nos permitía una mejor visualización, esto debido a los aditivos como salsas y grasa que podrían llegar a presentar los productos y que no se lograron remover por completo con los lavados previos a la extracción.

Las siguientes figuras muestran los resultados obtenidos en cada una de las muestras para la identificación de carne de venado.

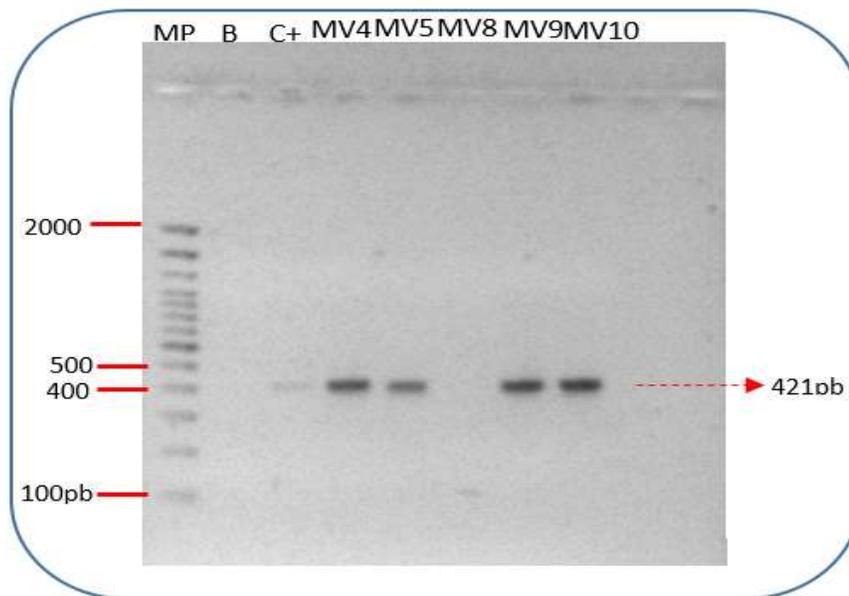


Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de carne de venado en productos, continuación de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen)

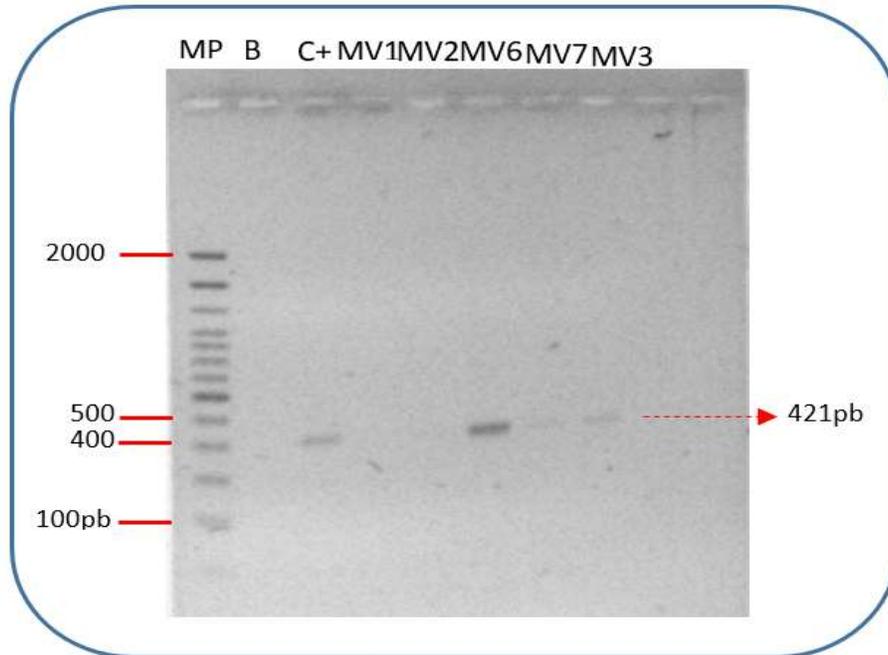


Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de carne de venado en productos. MP: marcador de peso (Invitrogen)

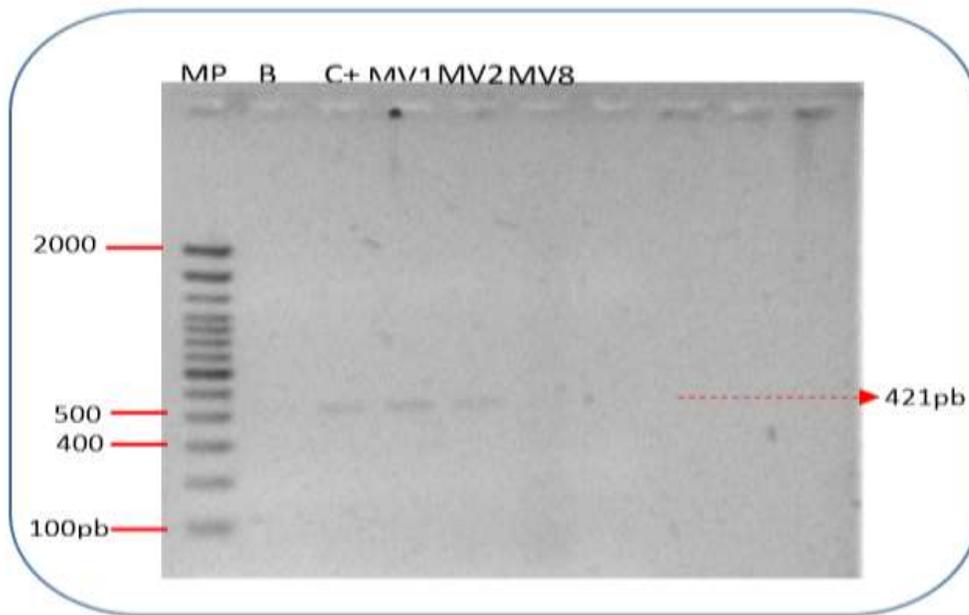


Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de carne de venado, repetición de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen)

Como se puede observar en la figura número 25 las muestras MV3, 6 y 7 hay un amplificado lo cual nos indica que todas estas muestras presentan carne de venado en específico de ciervo rojo, la diferencia de tonalidad en el amplificado puede deberse a la cantidad de ADN de ciervo rojo presente en el producto y en la extracción, en esta misma imagen se puede observar que las muestras MV1 y 2 no amplificaron, la PCR se repitió utilizando una nueva dilución del ADN extraído lo cual se visualiza en la figura 25 donde ambas muestras amplificaron esta vez, lo cual nos indica la presencia de ciervo rojo en los productos.

En la figura número 24 todas las muestras presentaron un amplificado muy marcado lo cual nos indica una existencia de ADN de ciervo rojo, esto con excepción de la muestra MV8 la cual se repitió con una nueva dilución del ADN pero como se puede ver la figura 26 esta no amplifico lo cual nos confirmó una ausencia de ciervo rojo en este producto.

La ausencia del amplificado en la muestra MV8 no se puede adjudicar a la calidad del ADN debido a que esta no presentaba ningún aditivo como salsas y de todas formas se llevó a cabo un lavado, sometiéndola dos veces a la técnica de PCR evitamos un falso positivo.

➤ Adulteraciones con soya

Las siguientes ilustraciones indican los resultados de las PCR realizadas para cada una de las muestras con los primers de soya, de la misma forma que la identificación de venado se utilizó el kit Gotaq con el fin de obtener mejores amplificados debido a la naturaleza de las muestras.

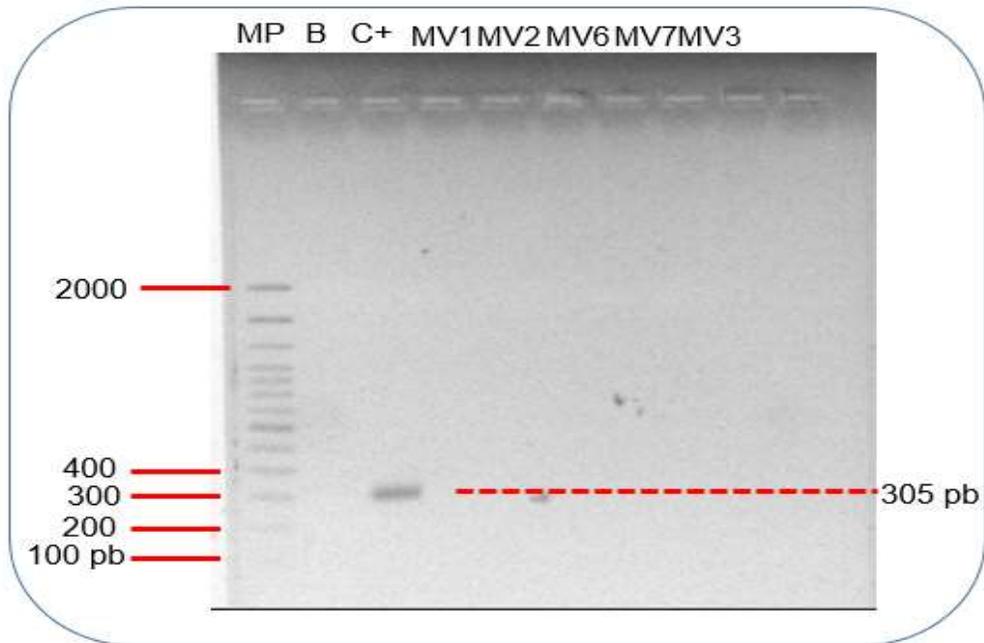


Figura 27: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones con soya e productos de carne de venado. MP: marcador de peso (Invitrogen)

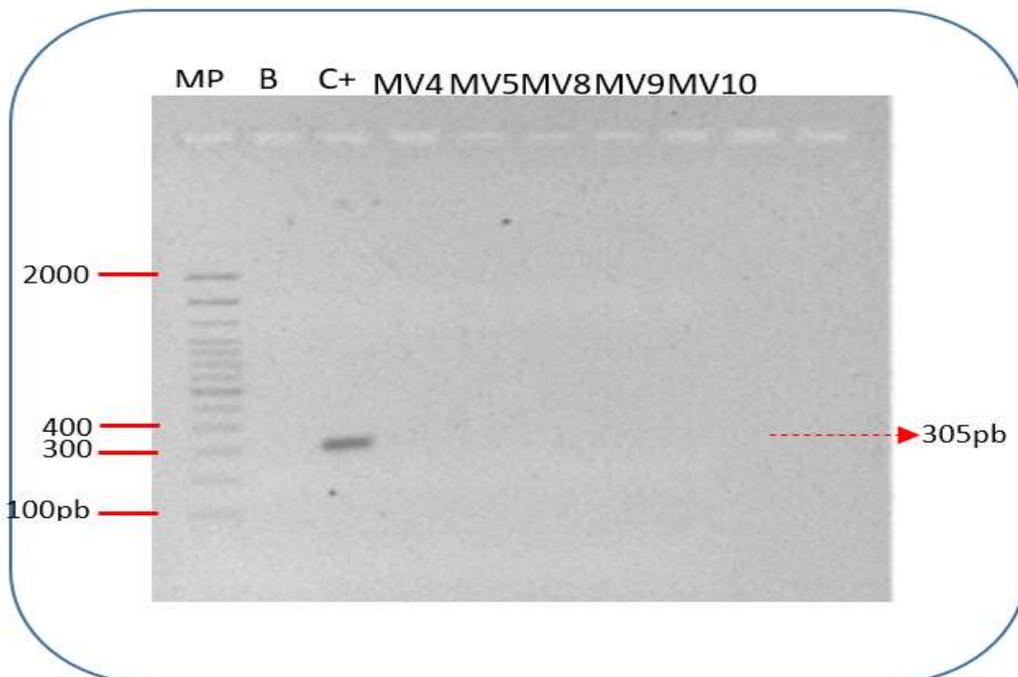


Figura 28: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones con soya en productos de carne de venado. , continuación de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen)

Al realizar los geles de electroforesis para la visualización de los fragmentos amplificados, se obtuvieron los resultados anteriores, observando tanto en la figura 27 como 28 que el único amplificado presente fue el del control positivo, por lo que se puede decir que ninguna de las diez muestras de producto o carne de venado esta adicionada con soya, esto puede ser debido a que la procedencia de la carne que se utilizó como materia prima no tenía un bajo aporte de proteínas o que los productores no consideraban esto como una característica importante para su vender el producto.

Utilizando un blanco y un control positivo (soya) se confirman que los datos obtenidos son confiables, ya que la reacción no presento contaminación al no obtener amplificados en el blanco y los primers amplificaban únicamente para soya lo que se comprueba con el control positivo.

➤ Adulteraciones con cerdo (*Sus scrofa domesticus*)

Las siguientes ilustraciones muestran las PCR realizadas con los primers de cerdo para los productos y carne de venado, las cuales de igual forma se realizaron con kit Gotaq para obtener mejores resultados en los amplificados.

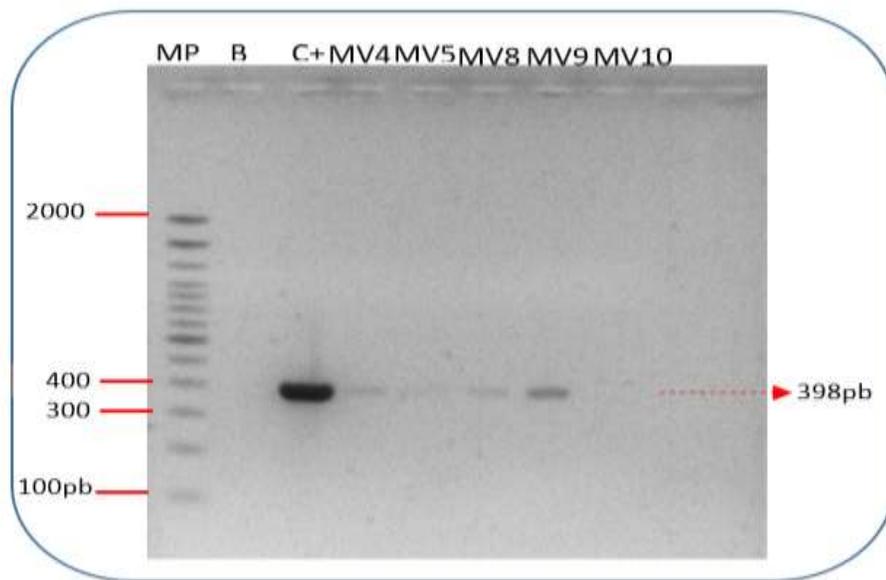


Figura 29: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones con cerdo en productos de carne de venado. MP: marcador de peso (Invitrogen)

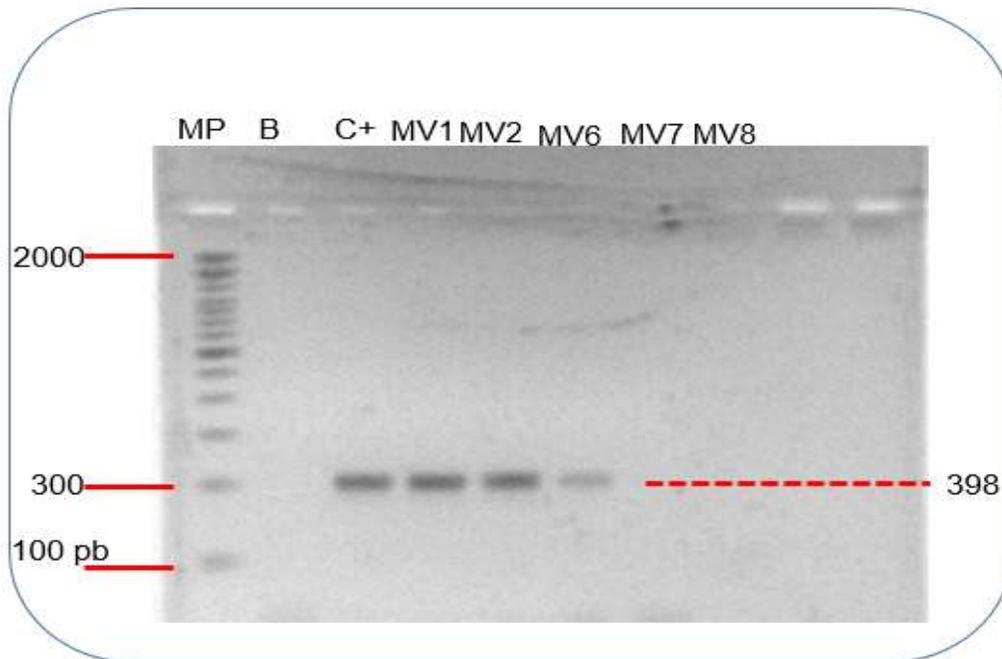


Figura 30: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones con cerdo en productos de carne de venado, continuación de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen)

Como se puede observar en las figuras 29 y 30 los resultados a las adulteraciones con carne de cerdo son positivos para casi todas las muestras utilizadas, excepto para la MV3, 7 y 10. En los geles se pueden ver amplificadas de tonos más brillantes que otros, lo cual puede indicar la concentración de ADN en este caso de cerdo presente en la muestra o la extracción de esta.

Puede decirse que el 70% de las muestras utilizadas se encuentran adulteradas con carne de cerdo ya sea por sustituir la carne de venado por una de menor valor o por el uso de las características del cerdo para darle un mayor sabor o ciertas propiedades a los productos.

➤ Adulteraciones con bovino (*Bos taurus*)

Por último se sometieron las muestras a la PCR con primers de bovino en el cual se esperaban encontrar un mayor número de muestras con la presencia de esta carne debido a la similitud que tienen tanto organolépticamente como en sus

componentes químicos. Estas reacciones se realizaron con el kit Gotaq para obtener mejores resultados.

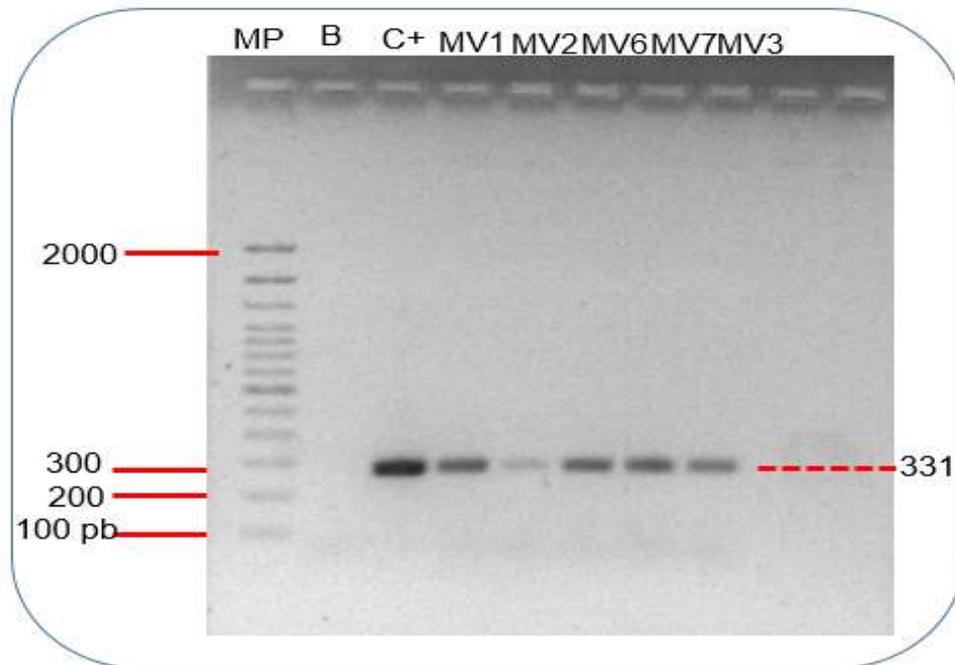


Figura 31: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones de bovino en productos de carne de venado. MP: marcador de peso (Invitrogen)

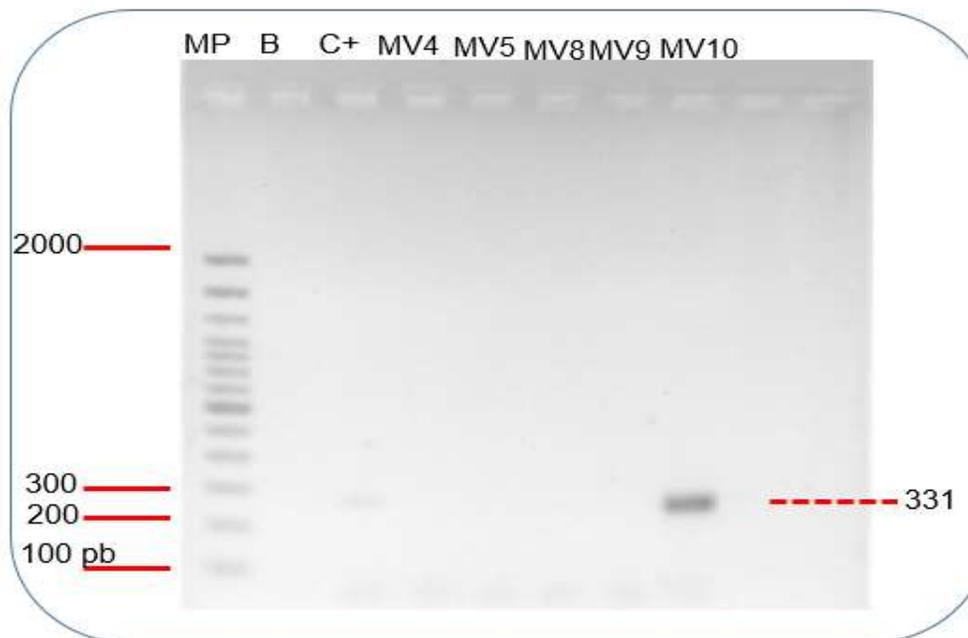


Figura 32: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la identificación de adulteraciones de bovino en productos de carne de venado, continuación de muestras. MP: marcador de peso (Invitrogen)

Las imágenes anteriores nos muestran los resultados obtenidos de las reacciones para cada una de las muestras utilizadas, en la figura 31 las cinco muestras presentan un amplificado lo que nos indica la presencia de carne de bovino en las cinco muestras, por otro lado en la ilustración 32 solo una de las muestras la MV10 presenta amplificado. Por lo tanto las muestras MV4, 5, 8 y 9 son las aquellas que no amplificaron por lo tanto se puede decir que no tienen carne de bovino.

El 60% de las muestras amplificó para los primers de bovino lo que nos indica la presencia de esta carne en los productos o cortes, igualmente los amplificados tienen una diferencia en la intensidad de color lo que nos indica una mayor o menor presencia del ADN de bovino en cada una de las muestras, se puede observar que solo la muestra MV2 es aquella que presenta un color más tenue, al contrario de las otras muestras con un color más intenso en su amplificado con lo que se puede decir que hay una mayor cantidad de ADN de bovino.

3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Durante la experimentación se obtuvieron resultados importantes ya que después de someter a PCR cada una de las muestras con cada pareja de primers de las especies de interés, se encontró que el 100% de los productos o carne de venado utilizados se encuentran adulterados con al menos una de las carnes adulterantes, cerdo o bovino.

En el caso de la soya como adulterante, no se encontró dentro de las diez muestras seleccionadas alguna que se adicionada con esta leguminosa, esto se le atribuye a la materia prima utilizada para realizar el producto, ninguno de ellos era un producto embutido, al encontrar ADN de ciervo rojo por lo tanto se garantiza la presencia de carne de esta especie la cual cuenta con un alto porcentaje de proteínas dentro de sus componentes (Menchú, 2007) y por las características de los productos, no requieren de una extensión con proteínas de otra fuente como lo es la de la soya.

Por otra parte es común la adición de proteína de soya en productos como embutidos, los cuales suelen ser elaborados con partes de la carne de baja calidad y con un bajo aporte proteico como son las vísceras, ninguno de los productos seleccionado para la experimentación entraban dentro de la categoría de embutido la cual nos dice que se considera un producto embutido aquel que puede estar crudo o listo para comer, elaborado con carne roja, aves o combinados (USDA, 2011), sin embargo se decidió hacer la búsqueda de la soya como adulterante para una posible reducción de precio comparado con la carne de venado y que diera el mismo aporte de proteínas y por el uso de la soya en productos procesados de carne molida como las hamburguesas (Andújar G. A., 2000).

Actualmente no existe una norma vigente la cual permita o no la adición de proteínas en productos cárnicos, la única norma existente es la NOM-122-SCFI la cual regulaba la adición de proteína o concentrado de soya en productos cárnicos pero que actualmente se encuentra derrocada.

Los resultados para el caso de la carne de cerdo y bovino fue distinto ya que en todas las muestras utilizadas se encontró al menos una de las dos especies de

interés como posibles adulterantes esto está relacionado a las similitudes entre la carne de los tres animales de interés y la búsqueda de una ventaja económica la cual puede ser más sencilla de obtener utilizando productos similares al original, siendo estos los de origen animal, que usar un adulterante de origen vegetal.

Para la carne de cerdo como adulterante el 70% de las muestras presentaron un amplificado para esta especie, la mayor parte de estos positivos fue en productos ya procesados, algunos de ellos con carne troceada lo cual le da al productor facilidad para adicionar carne distinta a la de venado y con ello poder disminuir el costo de producción; dos de las muestras que amplificaron para cerdo fueron cortes en los cuales suele ser más complicada su adulteración.

La carne de cerdo es actualmente vista como una de las que aporta una mayor cantidad de nutrientes, presentando grasas insaturadas y un alto porcentaje en proteínas (Gimferrer, 2012), esto aunado a su precio accesible puede ser utilizado no solo por el consumidor sino por los productores también. Existen estudios realizados en Austria donde se encontró en productos de carne de venado adulteraciones con carne de cerdo lo cual con este estudio se confirma su presencia en productos mexicanos también.

Algunos de los productos utilizados para la experimentación muchas veces requieren de un mayor porcentaje de grasa para su preparación, como se puede observar en tablas anteriores la carne de venado no presenta un alto porcentaje de estos valores, sin embargo la carne de cerdo si, por ello puede existir una adición de esta a los productos, por otro lado es bien conocido el uso de la carne de cerdo como un mejorador de sabor en productos cárnicos; sin embargo los productos adquiridos no especificaban la presencia de esta carne por lo cual se está incurriendo a un fraude.

Otra de las causas por las cuales se utiliza carne de cerdo es debido a su bajo precio comparado con la carne de venado, su representación disminuiría la cantidad de venado que se está utilizando lo cual representaría una baja en los costos de producción, sin embargo no en los de venta, donde los productos siguen promocionándose como elaborados únicamente de carne de venado. Este es el mismo caso para la

carne de bovino la cual presenta características tanto organolépticas como de componentes químicos muy similares a las la de la carne de venado.

La PCR realizada para la identificación de carne de bovino en cada uno de los productos seleccionados demostró que en el 60% de las muestras se encontraba ADN de bovino (*Bos taurus*) y por lo tanto de carne de esta misma especie, más de la mitad de los productos que presentaron un amplificado para bovino es elaborado con carne molida o troceada lo cual como se mencionó anteriormente representa una facilidad para la adición de carne distinta a la de venado.

La similitud presentada entre la carne de venado y de bovino representa una ventaja para los productores, ya que mucha gente no podría distinguir las dos carnes por el bajo consumo y poco conocimiento de la carne de venado, ellos toman ventaja para sustituir una parte de la materia prima, siendo esta la carne de venado, por un ingrediente similar pero de menor precio, características distintas y sin ser el producto que se le está vendiendo al consumidor.

Observando los datos obtenidos las únicas muestras adulteradas con ambas carnes (cerdo y bovino) son la MV1 y MV2 las cuales son hamburguesas provenientes del mercado de San Juan, este tipo de productos se ha visto en diferentes estudios que puede ser adulterado con distintos alimentos ya sea de origen animal o vegetal, sin importar el precio de la carne de la cual proceda. Estos productos al ser de un animal que representa un mayor costo de producción sería de esperarse una adulteración con otros ingredientes de menor valor económico, de la misma forma la mezcla con otros ingredientes y la molienda de la carne facilita la introducción de distintos adulterantes.

Una vez identificadas las adulteraciones es necesario mencionar los resultados de la PCR realizada con primers para ciervo rojo, en estos resultados se pudo observar que el 90% de los productos o carne de venado seleccionados para la investigación contenían ADN de ciervo rojo por lo tanto cierta cantidad de carne de venado. Si bien no es posible por medio de la técnica utilizada saber el porcentaje presente de cada una de las especies encontradas, si se determina su presencia.

El caso de la muestra MV8, la cual fue la única que no amplificó para los primers de ciervo rojo, adquirida como un corte de venado, puede observarse que la única PCR donde presenta un amplificado es con el uso de primers para cerdo (figura 29), mostrando que no se encontró ADN de venado que lograra amplificar al momento de utilizar los primers para esta especie, esto nos lleva a concluir que el corte obtenido pertenecía a la especie de cerdo o que debido a que la especie más abundante en el estado de Veracruz, de donde se obtuvo esta muestra es el temazate rojo (Mandujano, 2010) y el ciervo rojo una es una especie abundante en la región, esta muestra pertenezca a otra especie de venado.

Pese a que en todas las muestras se encontró al menos una carne distinta a la de venado que era la que se estaba vendiendo, en la mayoría se identificó la presencia de carne de venado, que es el producto que se está vendiendo al consumidor, por lo que este aspecto no se está cayendo en un fraude.

De acuerdo a las normas oficiales 213-SSA1-2002 y 051-SCFI/SSA1-2010 todos los productos de origen cárnico deberán presentar dentro de su etiquetado la lista de ingrediente contenidos en el producto con nombres específicos incluyendo la o las especies de carne utilizadas para su elaboración así como también mencionar los aditivos empleados si fue el caso. Analizando las muestras utilizadas solo dos se ellas contaban con etiquetado (MV9 Y MV10) las cuales solo mencionaban los ingredientes usados para la realización del producto, el resto de las muestras no contaba con un etiquetado.



Figura 33: Etiqueta de uno de los productos utilizados para la experimentación.

El poco consumo de la carne de venado atrae otras consecuencias como lo es la adulteración de los productos con carnes de menor precio con el fin de obtener un beneficio económico para los consumidores, el uso de carnes de menor precio y diferente composición como lo son la de cerdo y bovino da este beneficio, una de

las ventajas para realizar este tipo de actos sin hacérselo saber al consumidor es la falta de etiquetado en los productos que se están vendiendo, así como el poco interés por parte del consumidor para la lectura de etiquetado, la mayoría de los productos utilizados para este proyecto fueron obtenidos en los diferentes locales del mercado de San Juan y ninguno de ellos contaba con una etiqueta adecuada para su venta.

Si bien la carne de cerdo o bovino encontrada dentro de los productos utilizados no fue necesariamente utilizada para sustituir la carne de venado, es necesario hacer saber de su uso a los consumidores, así será decisión de ellos su consumo o no y se evitara el riesgo de que lo consuma alguien con problemas de alergia a alguno de los ingredientes o que por cuestiones religiosas decida no consumirlos.

México es un país con una gran abundancia de recursos, en el caso del ciervo rojo tiene una gran cantidad de ellos distribuidos en el centro del país y de otras especies en el norte la cual podría aprovecharse para su consumo y aumento de la economía siempre y cuando se tome en cuenta el ambiente y su afectación, por otro lado podría darse la crianza de estos animales para uso específico de su carne lo cual disminuiría su costo y muy probablemente la necesidad de los productos de una ganancia sustituyendo la carne por una de menor calidad; al disminuir el precio y realizar una mejor distribución de los productos el consumo de la carne de venado podría tener un alza y dar beneficios a muchas personas.

La identificación de adulteraciones en productos cárnicos cada vez tiene más interés por parte de los consumidores que desean saber cuáles son los verdaderos ingredientes puestos en un producto, la realización de estudios de investigación como el presente llevan información a aquellas personas interesadas y esto podría obligar a los productores a vender productos de calidad y con etiquetados claros para todos. Realizar este estudio en un producto poco común puede llevar al interés de hacerlo en muchos otros productos exóticos tanto de cárnicos como de otra índole para brindar información y con ello dar soluciones.

CONCLUSIONES

- El uso de programas bioinformáticos así como de bases de datos para el diseño de primers durante este proyecto permitió no solo una selección y diseño accesible tomando en cuenta todas las características necesarias para el diseño de primers sino también proporciono pares de primers específicos para la especie de interés, que en este caso fue el venado.
- En el caso de las especies adulterantes (cerdo, bovino y soya) el uso de artículos científicos donde se probaban y utilizaban primers para estas especies proporcionaron pares de cebadores adecuado para la experimentación, siendo igualmente específicos.
- El uso de la herramienta BLAST para comprobar de manera teórica la especificidad de los primers fue de mucha utilidad, obtener los fragmentos de ADN los cuales coincidían con los pares de primers seleccionados facilito la determinación de la especificad.
- El uso de la PCR no solo para la identificación de adulteraciones sino también para determinar la especificidad de los primers para cada especie comprueban las múltiples aplicaciones de esta técnica; obteniendo solo amplificados en las especies de interés para cada primer respectivamente, con dichos resultados se puede concluir que se utilizaron primers específicos.
- La técnica de PCR para identificar adulteraciones en alimentos representa muchas ventajas debido al uso de las moléculas de ADN las cuales no se ven afectadas al adicionar otros ingredientes o someterlos a proceso a altas o bajas temperaturas, sin embargo esta técnica solo nos permite saber la presencia o ausencia de una especie en un producto, por lo cual sería adecuada utilizar técnicas más avanzadas igualmente basadas en el uso de ADN para saber el porcentaje en el que estas especies se encuentra.

- La falta de normatividad para la venta de productos y carne de animales exóticos como lo es la de venado permite fraudes alimentarios, si la legislación mexicana tomara en cuenta las características necesarias para que un producto de esta índole saliera a la venta y lo plasmara en las normas para así proporcionar a los consumidores los ingredientes y aditivos que utilizan para la preparación

REFERENCIAS

- Alejos, P. A. (2018). *Extracción y purificación del ADN*. INECC.
- American soybean association. (2009). *La soya, sus productos y aplicaciones*. Guadalajara: International marketing.
- Andújar, G. A. (2000). *La utilización de extensores cárnicos*. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria.
- Andújar, G. G. (Junio de 2000). *FAO*. Obtenido de http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/pdf/extensor.pdf
- Arreola, C. (04 de Junio de 2012). *Investigacion de análisis a cárnicos*. Obtenido de <http://carnestercerparcial.blogspot.com/2012/06/adulteracion-de-la-carne-con-soja.html>
- Asiccaza. (2018). *Asiccaza.org*. Obtenido de <http://www.asiccaza.org/documentos/fichasnutricionales/ciervo.pdf>
- Bucafusco, D. G. (2012). *Evaluacion de la utilidad de la técnica de PCR para diagnostico de rutina de cirus de inmunodeficiencia felina y leucemia felina*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Chávez, N. J. (2018). *Detección de adulteraciones de leche con suero de quereria por medio de un sistema tipo ELISA*. Aguascalientes: Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Cheriyedath, S. (23 de Agosto de 2018). *News medical life sciences*. Obtenido de [https://www.news-medical.net/life-sciences/Polymerase-Chain-Reaction-Applications-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Polymerase-Chain-Reaction-Applications-(Spanish).aspx)
- Codex Alimentarius Commission. (2017). *Documento de debate sobre la integridad y la autenticidad de los alimentos*. Roma, Italia: FAO, OMS.
- Cofepris. (2018). *Fraude alimentario: acciones globales*. Cd. de México: Secretaria de salud.
- Costazar, A. y. (Junio de 2004). Obtenido de Instuto de Biotecnologia: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Cruz, F. C. (2001). *El Ciervo*. Obtenido de http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/02_12_11_Trabajo_ciervo.pdf

- De luna, A. (2007). Composición y procesamiento de la soya para consumo humano. *Investigación y ciencia*.
- Díaz, C. G. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Scielo*.
- Druml, B. S.-M. (2014). Authenticity control of game meat products- A single method to detect and quantify adulteration of follow deer (Dama dama), red deer (Cervus elaphus) and sika deer(Cervus nippon) by real-time PCR. *Elsevier*.
- Espinoza, T. M. (2015). Tipos de fraudes en carnes y productos cárnicos: una revisión. *Scientia Agropecuaria*.
- Everstine, K. S. (2012). Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *Journal of food protection* , 723-735.
- Excelsios. (02 de Enero de 2017). ¿Gustas cocodrilo, león, angula española? Los consigues en \$20 mil el kilo. *Excelsior*.
- FAO. (2007). *Produccion y sanidad animal*. Obtenido de http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html
- FAO. (2017). Documento de debate sobre la integridad y autenticidad de los alimentos. *comite del codex sobre sistemas de inspeccion y certificacion de importaciones y exportaciones de alimentos*.
- Fariña, J. y. (2018). *II congreso virtual hispanoamericano de anatomía y patología*. Obtenido de <http://www.conganat.org/iicongreso/conf/019/aplicac.htm>
- FEDNA. (2018). *FEDNA*. Obtenido de http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/aislado-de-proteina-de-soja
- Gallina, S. M. (2015). *Monitoreo y manejo del venado cola blanca "Conceptos y metodos"*. INECOL.
- Gallina, S. y. (2009). Análisis sobre las Unidades de Manejo (UMAs) de ciervo rojo (Cervus elaphus Linnaeus, 1758) y wapiti (Cervus canadensis (Erxleben, 1777) en México: problemática para la conservación de los ungulados nativos. . *Mongabay*, 251-265.
- Gallina, S. y. (2009). Investigación sobre ecología, conservación y manejo de ungulados silvestres en México. *Open Access Journal*.
- Garza, R. L. (2018). La reacción en cadena de la polimerasa y su aplicación al diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas. *Departamento de Biología* .

- Gimferrer, N. (24 de Julio de 2012). *Consumer*. Obtenido de <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/guia-alimentos/carnes-huevos-y-derivados/2012/07/18/211485.php>
- González, G. (2010). *Producción de carnes exóticas*. Chile: Gobierno de Chile.
- Greif, G. (2018). *Institut Pasteur Montevideo*. Obtenido de http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/reaccion_en_cadena_polimerasa.pdf
- Hernández, J. G. (2007). Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados térmicamente. *MACAMEH*, 97-109.
- Hernández, M. M. (2008). Detección y cuantificación de adulteraciones de carne molida de res por medio de un modelo SIMCA y análisis multivalente.
- Instituto de Ecología. (2004). Análisis bibliográfico de los estudios de menado en México. *Scielo*.
- IPCVA. (Diciembre de 2018). *IPCVA*. Obtenido de <http://www.ipcva.com.ar/vertext.php?id=100>
- Johnson, R. (2014). Food fraud and "Economically Motivated Adulteration" of food and food ingredients. *Congressional research service*.
- Kanazawa, A. T. (1998). Small interspersed sequences that serve as recombination sites at the *cox2* and *atp6* loci in the mitochondrial genome of soybean are widely distributed. *Springer- Verlag*, 188-198.
- Lara, N. C. (2011). Abundancia y densidad del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus couesi*) en Sierra de San Luis, Sonora, México. *Scielo*.
- IdiPAZ. (2018). *Nanodrop ND1000*. IdiPAZ.
- Mandujano, S. y. (2010). *Venados: animales de los dioses*. Xapala, Veracruz: SEV.
- Martínez, A. G. (2015). La carne de venado en la dieta humana. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León*.
- Martínez, A. V. (2014). *Importancia y Potencial de Producción de cárnicos de venado del noreste de México*. SAGARPA.
- Mas, E. P. (2001). Fundamento de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Aquatic*.
- Matsunaga, T. C. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *ELSEVIER*, 143-148.

- Menchú, M. y. (2007). *Tabla de composición de alimentos de Centroamérica y Panama*. Panama: INCAP.
- Merlo, N. y. (2016). *Atlas de la carne*. Adendum México 2016.
- Molina, M. (2002). Conocimiento de la biología del venado de páramo (Mammalia, Cervidae, *Odocoileus*) por los campesinos de Los Andes de Mérida, Venezuela. *Redalyc*, 269-285.
- Morales, R. (06 de Noviembre de 2018). México da un respiro a productores de soya de Estados Unidos. *El economista*.
- Navarro, R. A. (2010). *Resultados y lecciones en producción y procesamiento de carnes exóticas*. Chile : Fundación para la innovación agraria .
- Peña, C. D. (2018). *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*. Córdoba : Departamento de Bioquímica y biología molecular.
- Pérez, A. (2018). *ETSIAMN*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
- Ramírez, G. (2009). *Estudio de la carne*. Universidad de Antioquia.
- Retana, O. M. (2015). Patrones y tendencias de uso del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en comunidades mayas, Campeche, México. *SciELO*.
- Schilling, A. (2003). *Caracterización de cornamentas del ciervo rojo (Cervus elaphus) en 4 predios de la Décima Región*. Valdivia Chile.
- Secretaría de Agroindustria. (Noviembre de 2016). *Incluí, carne de ciervo en tu alimentación* . Ministerio de agroindustria presidencia de la nacion. Obtenido de http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_57_Carne_de_ciervo.pdf
- SEMARNAT. (03 de Julio de 2005). *SNIARN*. Obtenido de http://aplicaciones.semarnat.gob.mx/estadisticas/compendio2010/10.100.13.5_8080/ibi_apps/WFServletca40.html
- SEMARNAT. (2007). *Plan de Manejo tipo para la conservación y aprovechamiento sustentable del venado cola blanca (Odocoileus virginianus) en climas templados y tropicales en México extensivo y cría en cautiverio*. Cd. de México: SEMARNAT.
- SEMARNAT. (2010). *Compendio de estadísticas ambientales 2010, SEMARNAT*. Obtenido de

http://aplicaciones.semarnat.gob.mx/estadisticas/compendio2010/10.100.13.5_8080/ibi_apps/WFServletca40.html

Skewes, O. (2001). *Adaptación y optimización del sistema de producción porcina al aire libre (out door), para la obtención d e*. Chile: Universidad de Concepción.

Tamay de Dios, L. I. (2013). Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 70-78.

Tercero, A. (Septiembre de 2011). Evaluación de la calidad de la carne de cocodrilo (*Crocodylus moreletti*) y sus cambios fisicoquímicos y microbiológicos durante el almacenamiento en refrigeración. Xalapa, Veracruz, México.

Torrescano. G., S. A. (2008). Tecnología e ingeniería del sacrificio y su repercusión en la calidad de la canal de animales de abasto. *NACAMEH*, 78-94.

UAM. (2018). *UAM*. Obtenido de http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/pacopp/8-APLICACIONES_PCR.pdf

UNAM. (2017). *Técnicas cromatográficas*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf

UNED. (2000). *Programa de formación del profesorado*. Obtenido de <http://cosmolinux.no-ip.org/uned/pcr.pdf>

USDA. (2011). *Información sobre inocuidad de alimentos*. Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos.

USDA. (2011). *Información sobre inocuidad de alimentos. Carne de Res...de la granja a la mesa*. USDA.

Valero, T. D. (2010). *Guía nutricional de la carne*. España: FEN.

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://www.idtdna.com/site/account/login?returnurl=%2Fprimerquest>

NOM-213-SSA1-2002. Diario Oficial de la Federación, México, D.F., 25 de Abril de 2005

NOM-051-SCF1/SSA1-2010. Diario Oficial de la Federación, México, D.F., 5 de abril de 2010

NOM-009-ZOO-1994. Diario Oficial de la Federación, México, D.F., 31 de julio de 2007.

ANEXOS

➤ Anexo 1: Diseño de primers para ciervo rojo

En las siguientes figuras se muestran los pasos seguidos para la selección de primers, así como los programas bioinformáticos y bases de datos utilizados.

En la figura 34 se puede observar la secuencia de ADN de ciervo rojo utilizada, la cual se buscó por medio de la base de datos de NCBI y corresponde al ADN mitocondrial de la especie, en el caso de productos cárnicos es conveniente utilizar esta sección de ADN.

The screenshot shows the NCBI GenBank entry for the complete mitochondrial genome of Cervus elaphus. The entry includes the following information:

- GenBank:** AB245427.2
- FASTA:** [FASTA](#) [Graphics](#)
- Go to:** [Go to](#)
- LOCUS:** AB245427 16357 bp DNA circular NOV 24-JUL-2016
- DEFINITION:** Cervus elaphus mitochondrial DNA, complete genome.
- ACCESSION:** AB245427
- VERSION:** AB245427.2
- KEYWORDS:** -
- SOURCE:** mitochondrion Cervus elaphus (red deer)
- ORGANISM:** [Cervus elaphus](#)
- REFERENCE 1:**
 - AUTHORS:** Wada, K., Nakamura, H., Nishizori, H. and Yokohama, H.
 - TITLE:** The complete nucleotide sequence of mitochondrial genome in the reindeer (*Rangifer tarandus*) and red deer (*Cervus elaphus*)
 - JOURNAL:** Unpublished
- REFERENCE 2:** (bases 1 to 16357)
 - AUTHORS:** Wada, K.
 - TITLE:** Direct Submission

On the right side of the page, there are several interactive options:

- Send to:** Change region shown
- Customize view:** Customize view
- Analyze this sequence:** Run BLAST, Pick Primers, Highlight Sequence Features, Find in this Sequence
- Related information:** Protein, Taxonomy, Full text in PMC, Gene, Genome

Figura 34: Secuencia de ADN de ciervo rojo utilizada para el diseño de primers

```

/ gene="D-loop"
ORIGIN
1  gttgtagtg cttaatagg aaagcaagg cttgaaatg cctagatgag tatattaact
61  ccataaacat atagggttgg tcccagcctt cctattaacc cttataaac ttacacatgc
121  aagctatcag acccgggtg aaatgcctt caagttaat agctaaagc gagctggth
181  caagcacaca tccgtagctc agcacacct gcacagccc acccccagg gagcagcag
241  tgataaaat taagrcatac agaaagttt gactaaagg tattaattg ggttggtaa
301  tttctgcca gccaccggg tcatacgatt aacccaagt aataggcata cggcgtaaa
361  tgggttaag cactatact aataaagta attccaatt aagctgtaa agccataat
421  tgtacaaca atataaacg aaatgaact tacaccgct gaacacgat agctaggacc
481  caaactggg ttagtatcc cactatgct agccttaac caaatagtt atgcaaaac
541  aactattgc cagatatac ccgaaatag cttaaaact aaagacttg gccgtgctt
601  atccccttt agagagcct gttctataat cgtaaacc cgtaaacc cccattctt
661  tctaatata gttatatac agccatctt agcgaacct aaaaagta aaagtaagc
721  caactatac tacataaag cgttaagta aggttaac ttggaacc aagaaatgg
781  gctacattt ctacttaag aaaaacca acgaagta ttatgaatt aatacaaa
841  agagattta cagtaaac agaatagag tctttagtg actagcca tgagcagc
901  acaacagcc cgtaccctc ctcaagtag cacagtac tcaattat ttgcahtat
961  taactatg agggagca agtctaac agttagcat actgaaag gtgttggt
1021  aaaaataag atatagtta acaaaagca ctagttaa cctagaag ttatataat
1081  atgactctt gaactaatt ctagccgcc agcccttcc cctcaetta tcaatgac
1141  ataaaataa acatttatt acaaaaaa gtagaggag tagaaattt aatacgggc
1201  tatagaaag gtaccgtag gnatatga aagaaaaa ttaagtaa aabagcaaa
1261  gattactct tgaactttt gataatag ttaactaga aaactaac aaatgaat
1321  ctagctaag acccgaac cagacagct acttatgac aatttatca gcccaactc
1381  atctatgag caaatagtg agagattg taagttagg tgaacgcc aagagcctg
1441  gtgatagct gttgcccag aatgaetat tagttcagc ttaaaatc caaanatg
1501  acaaaattat aatgtattt taaaagttg ttaaaaaa tacagcttt tagaaatgg
1561  tacaactta actagagat aaacctaac attaacct agtggccta aagcagcca
1621  caactaag agcgttaa gttcaaac aaataaac taattcaat aataacagt
1681  caactcctg tctaactag gactaacta ttaaaatg aagcaaat gttaacatg
1741  gtaacagag ahaacttct cccgataa gtttaagta gtaactga atactctgc
1801  tattaacag aataaagaa taactaact aataaact tattaact actgtaact
1861  cgcacagag atgacttag gaaagatta aagaaatg aaggaactg gaaacata
1921  aaccccgct gtttaccaa aacatacct ccagattaa ctagtattg aggaactgc
1981  tcccagtag ctgacctta aacggcggc gatactgac cgtgaaag tagcatactc
2041  actgtcttc taatagga ctgtatgaa tggcaccag aggtttta tgcctctac
2101  ttcaatrag tgaattgac ctccctgta agagcggg atattaat agcagaaa
2161  gaccctagg agcttaact acttagcca aagaataaa ttctactac aagaaaca
    
```

Figura 35: Selección de la secuencia de ADN mitocondrial de ciervo rojo utilizada

Una vez seleccionada la secuencia de ADN con ayuda del programa PrimerQuest Tool se diseñaron los posibles primers los cuales se muestran en la figura 36.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

Assay Set Locations for Sequence 1

1 1000 2000 3000 4000 5000 6000 7000 8000 9000 10000 11000 12000 13000 14000 15000 16357

ADD TO ORDER DOWNLOAD ASSAYS CUSTOMIZE ASSAY DESIGN SHOW CUSTOM TARGET REGIONS

Set 1 Sequence 1

	Start	Stop	Length	Tm	GC%	
Amplicon Length: 421						
View Assay Details	Forward	14492	14514	22	62	50
	Reverse	14891	14913	22	62	45.5

Set 2 Sequence 1						
Amplicon Length: 663						
View Assay Details						
	Start	Stop	Length	Tm	GC%	
Forward	10824	10845	21	62	47.6	
Reverse	11465	11487	22	62	50	

Set 3 Sequence 1						
Amplicon Length: 205						
View Assay Details						
	Start	Stop	Length	Tm	GC%	
Forward	14346	14369	23	62	47.8	
Reverse	14529	14551	22	62	45.5	

Set 4 Sequence 1						
Amplicon Length: 829						
View Assay Details						
	Start	Stop	Length	Tm	GC%	
Forward	11403	13425	22	62	50	
Reverse	14212	14232	20	62	50	

Set 5 Sequence 1						
------------------	--	--	--	--	--	--

Figura 36: Opciones de pares de primers arrojadas por el programa

Según las características que se buscan en un primer, la figura 37 muestra los primers seleccionado.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

Sequence 1 Assay Set 1 Details

[BACK TO RESULTS](#)

Parameter Set: General PCR (Primers only)
 Sequence Name: Sequence 1
 Amplicon Length: 421

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	14492	14514	22	62	50
Reverse	14891	14913	22	62	45.5

Base Sequence

```

1  GTTAAATAGCTTAAATGGCAAAAGCAAGGCACTGAAATAGCTAGAGGAGATATTAATCCATAAAGCATAGATTGGGCGCAGCCCTCCCTAAGC
100  CTTAATAAAGCTTACACATGCAAGCCCTCCGACCCCTGTAAGATGCCCCCAAAATTAATAAAGCTAAGAGGAGCTTATCCAGCCGCAATCCCTAGCTC
200  AGAGAGCTCTGCAAGAGCATAAGCCGCGAGAGGAGCAATGATAAAAATTAAGCATAAAGGAGAACTTAACTAGAGGATTAATTAAGTTGATAA
300  TTTCTGTCTAGCCAGCCGCTGATGCAATTAAGCTCAAGCTTAATAGGCATACAGCTAAAGTCTTTAAAGCACTAATCAAAATAAAGTTAAATCCAGCT
400  AAGCTGTAAAGAGCATAGTTTATAGAAAGATATATAGCAAGATTAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCT
500  CTCTAGGCTAGCTTAAACACAAATATTTATGAAACAAACATGTTGCTGAGATTAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCT
600  ATCACTTTTATAAGAGCTTGTATATAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCT
700  AAAAAAGTCAAAATAGAGCAATATATATGCTAAAGGATTTAGAGCTAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAG
800  AAATTCAGCTGAAATATTATTAATTAATAGCTTAAAGGAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCT
    
```

Figura 37: Par de primers seleccionados para ciervo rojo

Para comprobar la especificidad de los primers seleccionados se utilizó la herramienta BLAST, las figuras 38 y 39 muestran el BLAST para cada primer.

- Primer frontal

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
1	Cervus elaphus (NC0168) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	KX468241.1
2	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG300962.1
3	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322043.1
4	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322040.1
5	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322042.1
6	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322041.1
7	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322044.1
8	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322045.1
9	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322046.1
10	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322047.1
11	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322048.1
12	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322049.1
13	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322050.1
14	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322051.1
15	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322052.1
16	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322053.1
17	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322054.1
18	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322055.1
19	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322056.1
20	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322057.1

Figura 38: Blast para primer frontal de ciervo rojo

- Primer reverso

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
1	Cervus elaphus (NC0168) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	KX468241.1
2	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG300962.1
3	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322043.1
4	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322040.1
5	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322042.1
6	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322041.1
7	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322044.1
8	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322045.1
9	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322046.1
10	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322047.1
11	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322048.1
12	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322049.1
13	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322050.1
14	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322051.1
15	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322052.1
16	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322053.1
17	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322054.1
18	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322055.1
19	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322056.1
20	Cervus elaphus (GenBank) mtDNA control region	44.1	44.1	100%	0.023	100.00%	MG322057.1

Figura 39: Blast para primer reverso de ciervo rojo

➤ Anexo 2: Primers para cerdo y bovino

Para la selección de primers de bovino se tomó como referencia los diseñados en el artículo (Matsunaga, 1999) el cual consistía en la identificación de carne en diferentes productos por medio de la técnica de PCR. Para ello diseñaron primers frontales comunes que funcionarían para distintas especies y un primer frontal diferente para cada especie que es el que le daría la especificidad

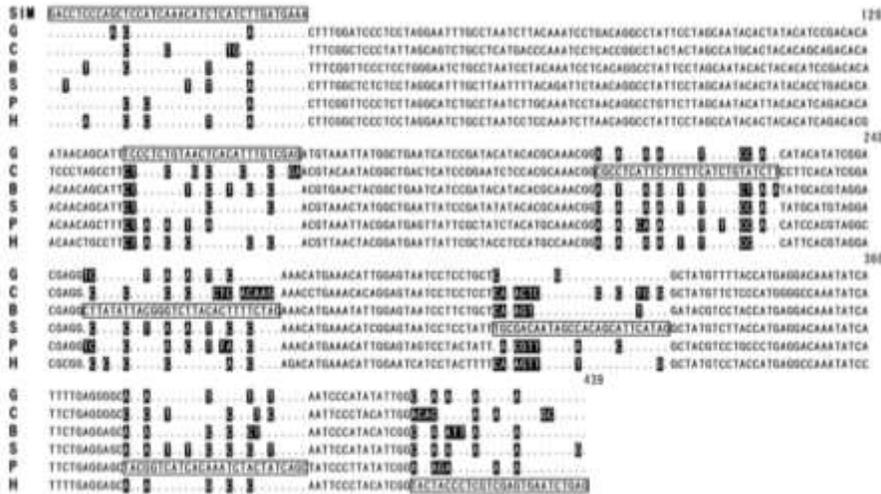


Figura 40: Fragmentos comunes para los primers seleccionados. Imagen tomada del artículo Matsunaga, 1999

➤ Anexo 3: Primers para soya

Para seleccionar los primers de soya utilizados nos basamos en el artículo (Kanazawa, 1998) el buscaba secuencias que funcionaban como sitio de recombinación en el genoma de la soya en diferentes plantas.

➤ Anexo 4: Materiales para la experimentación.

A continuación se muestran los reactivos, equipos y materiales de laboratorio utilizados durante la experimentación con su respectiva marca y modelo.

Reactivos

- Solución de lisis
- Enzima proteinasa K (Bioline)
- Mezcla Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Invitrogen)
- Etanol frío
- Agua libre de nucleasas (Pisa)
- Agarosa (Labcitec)
- TAE 1X (solución buffer) (Apex Chemical and Reagents)
- Colorante blue/orange (Promega)
- Bromuro de tidio (BRET)
- Kit master mix (Promega)
- Kit Gotaq (Promega)
- Marcador de peso molecular (Invitrogen)

Material de laboratorio

- Tubos Eppendorff
- Gradilla
- Mortero
- Navajas
- Matraz Erlenmeyer
- Probeta
- Parafilm

Equipo

- Agitador Vortex (Wisd Laboratory Instruments, Mod. VM-10)
- Balanza analítica electrónica
- Micropipetas
- Espectrofotómetro (Nanodrop, Mod. ND-1000)
- Termociclador (Arktik, Thermalcycler)

- Fuente de poder (Bio-Rad, Mod. PocerPac 200 y 1000)
- Transluminador (Bio-Imaging System, Mod. DI/HD)
- Cámara de electroforesis (Select Bioproducts)
- Cámara fotográfica (Canon, Mod. PC120)
- Termoblock (Eppendorf , Mod. 5350)
- Microcentrifuga (Eppendorf, Mod. 22331 Hamburgo)

➤ Anexo 5: Cálculo de temperatura de hibridación

Cerdo (*Sus scrofa domesticus*) y bovino (*Bos taurus*)

SIM: GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA

$$T_m = [(4 + 13)4 + (9 + 12)2] - 5 = 105$$

PR cerdo: GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA

$$T_m = [(8 + 3)4 + (7 + 9)2] - 5 = 71$$

PR bovino: CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAA

$$T_m = [(5 + 4)4 + (12 + 6)2] - 5 = 67$$

Soya (*Glycine max*)

PF: AGCGGGGTAGAGTAATTG

$$T_m = [(8 + 1)4 + (5 + 4)2] - 5 = 49$$

PR: CAAGGAGCAATCGTGAGGAATAG

$$T_m = [(8 + 3)4 + (9 + 3)2] - 5 = 63$$

Ciervo rojo (*Cervus elaphus*)

PF: GAGACGTGAAACATCGGAGTAG

$$T_m = [(8 + 3)4 + (8 + 3)2] - 5 = 61$$

PR: CAAGTAGGTCTGGTGCGAATAA

$$T_m = [(7 + 3)4 + (7 + 5)2] - 5 = 59$$