

# DETECCIÓN DE ESPECIES ANIMALES, VEGETALES Y TRANSGÉNICOS EN SALCHICHAS, MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Florencia Alfonso

Orientador de Tesis: Dr. QF. Claudio Martínez Debat

Co-tutora: MSc. Mailen Arleo

Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria  
Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular  
y Molecular

Facultad de Ciencias, UdelaR

DICIEMBRE, 2017

# CONTENIDO

---

<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1.1 <i>Etiquetado de alimentos y derechos del consumidor</i>	6
1.2 <i>Trazabilidad Alimentaria</i>	7
1.3 <i>El fraude alimentario</i>	8
1.4 <i>La matriz de estudio: Salchicha tipo Viena o Frankfurter</i>	10
1.5 <i>Nuevas tecnologías en la producción de alimentos</i>	15
1.6 <i>Determinación de los componentes de una matriz alimentaria.</i>	20
<b>2 OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>30</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1 <i>MUESTRAS Y CONTROLES</i>	32
4.2 <i>OBTENCIÓN DE ADN</i>	33
4.3 <i>Cuantificación y estimación de la pureza del ADN obtenido.</i>	34
4.4 <i>Detección de especies y análisis de transgenicidad en Frankfurters.</i>	34
4.5 <i>Cuantificación de especies animales en la matriz de estudio.</i>	39
<b>5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
5.1 <i>Extracción y cuantificación de ADN.</i>	44
5.2 <i>Detección de especies y análisis de transgenicidad en Frankfurters</i>	46
5.3 <i>Cuantificación de especies animales en la matriz de estudio.</i>	56
<b>6 CONCLUSIÓN</b>	<b>69</b>
6.1 <i>Extracción de ADN</i>	69

6.2	<i>Detección de especies animales, vegetales y transgénicos mediante PCR en salchichas</i>	
	69	
6.3	<i>Cuantificación de especies animales en la matriz salchicha</i>	70
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>73</b>
	<b>ANEXO - Abreviaturas</b>	<b>83</b>

## RESUMEN

---

El fraude alimentario y la autenticidad de los alimentos son asuntos que están en discusión a nivel global. Las crisis ocurridas en la industria alimentaria como “la enfermedad de la vaca loca” y la adulteración de productos de vaca con carne de caballo en la Unión Europea, han sido algunas de las situaciones que han generado desconfianza en los consumidores. Como consecuencia, hay una creciente exigencia para que se brinde más información sobre la composición y origen de los alimentos de origen animal. Para cumplir con esta demanda, y para lograr la seguridad alimentaria y evitar la competencia desleal, las autoridades y organismos de contralor deben contar con metodologías sencillas y precisas que permitan realizar los controles necesarios sobre los alimentos y su producción.

En general, la adulteración se lleva a cabo para obtener beneficios económicos, y para abaratar costos. Un modo muy común de hacerlo es sustituir especies costosas por otras más económicas. Esto es más fácil de realizar en matrices alimentarias que no permiten la distinción de sus ingredientes a simple vista, tal como ocurre en los Frankfurters o Salchichas tipo Viena.

El Frankfurter o Salchicha de Viena es un chacinado presente en la dieta de muchas personas por ser de fácil adquisición, además de tener una preparación rápida y sencilla. En este trabajo se buscó emplear técnicas moleculares basadas en ADN para detectar fraudes alimentarios en esta matriz. Como objetivo específico, se buscó determinar la presencia/ausencia de las especies animales vaca, cerdo y pollo, así como las especies vegetales soja y maíz, por tratarse de aditivos alimentarios comunes y evaluar su transgenicidad en muestras de Frankfurter obtenidas en el mercado local.

Para detectar las especies animales se utilizaron metodologías de *barcoding*, buscando secuencias de ADN mitocondrial de la región del citocromo b mediante la técnica de PCR punto final. La misma técnica se empleó para detectar las especies vegetales, y evaluar su transgenicidad.

A su vez, se propuso poner a punto técnicas de cuantificación de especies animales que permitan diferenciar entre una adulteración o una contaminación del alimento. Para esto se utilizaron dos estrategias empleando la técnica de PCR en Tiempo Real. La primera, consistió en el uso de un kit comercial validado para cuantificar vaca y pollo en la matriz Frankfurter. En la segunda, se empleó como guía un método descrito en la bibliografía para detectar y

cuantificar las especies animales vaca, cerdo y pollo.

Los análisis de detección permitieron confirmar la presencia de vaca y cerdo en todas las muestras de salchicha, coincidente con lo declarado en la etiqueta de los productos envasados. Asimismo, una de las muestras evidenció la presunta presencia de pollo. También, se encontró soja en cinco de las siete muestras y demostró ser, en todos los casos, soja *Roundup Ready*. En ninguna se evidenció presencia de maíz. Todas las muestras envasadas que presentaron soja la declaraban en su etiqueta como ingrediente y en ninguna de estas se declaraba maíz, lo que es coherente con los resultados.

A partir de las dos estrategias de PCR en Tiempo Real utilizadas, se logró cuantificar las especies animales vaca y cerdo, y confirmar la presencia de trazas de pollo en una de las muestras.

Este trabajo pretende ser un aporte en la generación de técnicas que permitan corroborar los componentes de alimentos de origen cárnico en cuanto a su identidad y cantidad, y brindar herramientas que sumen en el proceso de trazabilidad alimentaria de nuestro país, utilizando esta matriz como ejemplo.

# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Etiquetado de alimentos y derechos del consumidor

La autenticidad de los alimentos y el fraude alimentario son cuestiones que han cobrado gran interés y relevancia mundial en los últimos años (Zagonet *al.*, 2017). No sólo la industria alimentaria se ha visto envuelta en casos de adulteración de varios productos, sino que el uso de nuevas tecnologías en la producción de alimentos ha generado preocupación en los consumidores, que cada vez exigen conocer con mayor exactitud los componentes de lo que incluyen en su dieta (Lockley & Bardsley, 2000; Aung & Chang, 2014).

El etiquetado es el medio por el cual el productor informa sobre las características del alimento al consumidor final (Codex Alimentarius, 2007). La declaración de los ingredientes cumple un rol fundamental ya que permite que el consumidor pueda escoger los productos de acuerdo con sus preferencias personales y contar con libertad de elección (Premanandh, 2011), respetándose sus derechos (Reglamento UE 1169/2011) además de preservar la economía, evitando la competencia desleal entre empresas (Meyer *et al.*, 1995).

En Uruguay, los derechos básicos del consumidor se encuentran contemplados en la ley N° 17250 de relaciones de consumo. Los derechos básicos del consumidor, establecidos en el artículo 6 de esta ley, entre otros puntos, son: *“la protección de la vida, la salud y la seguridad contra los riesgos causados por las prácticas en el suministro de productos y servicios considerados peligrosos o nocivos”, “la educación y divulgación sobre el consumo adecuado de los productos y servicios, la libertad de elegir”, “la información suficiente, clara, veraz, en idioma español sin perjuicio que puedan emplearse además otros idiomas”* (Ley N° 17.250. Defensa del consumidor, 2000). Esto implica que el Estado debe velar por la salud de la población, así como promover y proteger el derecho de contar con toda la información relevante, expresada de una forma fácil de comprender y, si correspondiese, proceder a la sanción de aquellos proveedores que no cumplan con lo establecido en esta ley (<https://www.mef.gub.uy/>).

Para cumplir con lo dicho, se han establecido normas de etiquetado que las empresas productoras de alimentos deben respetar. En este sentido, el Reglamento Bromatológico Nacional incorpora las exigencias aprobadas en el Mercado Común del Sur (MERCOSUR) y los lineamientos del *Codex Alimentarius* (FAO/OMS, 2007). Dentro de estos, exige que todos los alimentos comercializados en el territorio nacional y envasados en ausencia del cliente deben

ser rotulados de acuerdo con lo que el mismo reglamento establece. Esto es supervisado por las Intendencias Municipales que actúan como organismos oficiales de contralor de la seguridad alimentaria del país (Reglamento Bromatológico Nacional).

Para asegurar el cumplimiento de estas normativas, a nivel nacional, regional e internacional, las autoridades y organismos de contralor deben contar con métodos precisos y sensibles que permitan asegurar la calidad y autenticidad de los alimentos, y/o detectar cualquier adulteración presente si la hubiera. En este sentido, el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de Facultad de Ciencias, donde se llevó a cabo el presente trabajo, pretende aportar y ayudar en la puesta a punto e implementación de técnicas para la tarea de controlar eficazmente los procesos asociados a la producción de alimentos.

## 1.2 Trazabilidad Alimentaria

La implementación de sistemas de trazabilidad ha aumentado como forma de asegurar la salud alimentaria y mejorar la información que se brinda a los consumidores, para hacer frente a la creciente complejidad de una cadena alimentaria basada en la producción en masa, la distribución y el consumo mundial (Coff *et al.*, 2008).

El concepto de trazabilidad se refiere a la capacidad de poder rastrear el alimento en todas las etapas del proceso de producción hasta que llega al consumidor final (Zhang *et al.*, 2011).

El artículo 3 del Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo, lo define como: *“la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un alimento, pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinada a ser incorporada en alimentos o piensos, o con probabilidad de serlo”*.

Esto supone la implementación de un sistema que permita registrar y rastrear la información referente a la producción, transformación y comercialización de los productos alimenticios, de forma de poder rastrearlo en cualquier parte del proceso, desde su fabricación hasta el consumidor final.

Para llevarlo a cabo, se deben considerar diferentes aspectos del proceso que van desde los ingredientes a utilizar y sus proveedores (trazabilidad para atrás). Incluyendo información referente a aquellos productos que haya recibido la empresa, los procesos por los que pasaron, el producto final (trazabilidad interna), hasta el destino final del mismo, y comercialización (trazabilidad hacia adelante).

El desarrollo de estas políticas alimentarias tiene como objetivos preservar la salud alimentaria, brindar información al consumidor y mejorar su confianza respecto a la producción de alimentos. A su vez, en caso de identificar un producto no inocuo, o en casos de otras no conformidades relevantes respecto al cumplimiento de la normativa, poder localizarlo de manera rápida y eficiente para retirarlo del mercado de forma inmediata (Decreto Nº 35.335, Junta Departamental Montevideo).

Las empresas también se pueden beneficiar de su implementación voluntaria, como manera de generar estrategias de negocio o como parte de esquemas de garantía de calidad (Coff *et al.*, 2008).

En definitiva, estas prácticas implican un beneficio para todas las partes implicadas como forma de asegurar la calidad de los productos de una empresa, preservar la seguridad alimentaria y aumentar la confianza en el consumidor final. Para poder llevarlo a cabo se deben tener a disposición metodologías analíticas que permitan hacer seguimiento de los procesos de producción y asegurar el cumplimiento de la reglamentación vigente.

### 1.3 El fraude alimentario

El fraude alimentario no es una problemática reciente, sino que se ha llevado a cabo desde tiempos remotos (Shears, 2008). El término ha sido definido por Spink y Moyer (2011a), como: “la sustitución deliberada e intencional, adición, manipulación o tergiversación de los alimentos, ingredientes alimentarios, o el envasado de alimentos; o declaraciones falsas o engañosas acerca de un producto para obtener beneficios económicos”.

Las consecuencias de estas actividades fraudulentas se pueden manifestar como problemas de salud (Manning & Soon, 2014), competencia desleal entre empresas en el sector productivo

(Meyer *et al.*, 1995), además de provocar indignación en los consumidores al ser engañados económicamente y respecto a la calidad de los productos que adquieren (Spink *et al.*, 2015).

Si bien actualmente la forma básica de fraude es similar que en la antigüedad, la escala en ese entonces era limitada e involucraba una pequeña área geográfica. Hoy en día, las cadenas de suministro de alimentos se han extendido, vuelto más complejas y acelerado, por lo que el riesgo de fraude alimentario se ha ampliado a la población mundial (Spink *et al.*, 2010).

La oportunidad de fraude alimentario puede surgir siempre que se busque obtener algún tipo de beneficio, generalmente económico (Grundy *et al.*, 2012). Este accionar resulta más fácil de llevar a cabo en productos, que por las características del proceso de manufactura, presentan una apariencia final que no permite la distinción evidente de los ingredientes que lo componen. Este es el caso de varias matrices alimentarias que han y continúan siendo blanco de fraude, tales como pescados (Botti & Giuffra, 2010) productos cárnicos (Kocher *et al.*, 1989; Matsunaga *et al.*, 1999), entre otros.

### 1.3.1 El fraude en productos cárnicos

Los casos de fraude en la industria alimentaria han sido numerosos y los relacionados con los productos cárnicos y derivados, no han sido la excepción. Es de conocimiento público que estos alimentos han sufrido adulteración desde que se empezaron a producir y comercializar (Fung *et al.*, 2001). La autenticidad y la calidad de estos productos se ven afectadas principalmente por el reemplazo de carnes de mayor valor comercial por carnes de menor valor (Fajardo *et al.*, 2008), la presencia de especies no declaradas (Aida, Man, Wong, Raha, & Son, 2005) y el uso de proteínas vegetales por poseer un costo considerablemente más bajo que las proteínas musculares (Belloque, García, Torre & Marina, 2002).

La industria alimentaria se vio envuelta en una serie de escándalos en la década de los 80, comenzando por el surgimiento de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE), más conocida como “enfermedad de la vaca loca”. La misma forma parte de un grupo de enfermedades conocidas como Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, que también incluye a la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD) que afecta a humanos. Se cree que una nueva variante de esta última (vCJD), podría ser causada por el consumo de productos vacunos contaminados con tejido nervioso infectado o productos sanitarios fabricados a partir de estos tejidos

(<http://www.oie.int/>). El primer caso de BSE fue notificado por el Reino Unido en el año 1986, a partir de donde se produjo una de las crisis más grandes en dicha industria, no sólo por las pérdidas que se produjeron a nivel económico, sino porque generó gran desconfianza en los consumidores hacia las autoridades relacionadas con la cadena de alimentos, situación que se mantuvo por años (Bánáti, 2011).

De gran resonancia mundial, fue también el caso que tuvo lugar en países de la Unión Europea en el 2013, en que se encontró presencia de ADN de caballo en hamburguesas etiquetadas como carne de vaca (FSAI, 2013). La presencia de esta especie animal no implicaba un riesgo para la salud de la población, sin embargo, la seguridad alimentaria se podía ver comprometida por la presencia de fenilbutazona, una medicina regularmente utilizada en equinos y que no está permitida en la cadena alimenticia. Si bien los análisis para la detección de esta sustancia resultaron negativos (FSAI, 2013), la situación puso en evidencia la falta de control en la producción de estos alimentos, así como la importancia de llevar a cabo una correcta trazabilidad en los productos de origen animal (FSA, 2002). Tras este escándalo, la Unión Europea estableció la recomendación 2013/99/UE, que especifica que los productos cárnicos que contienen un porcentaje mayor al 1% de ingredientes de carne no previstos, deben considerarse adulterados.

Uruguay es uno de los principales productores de carne del mundo, exportando a más de cien países, lo que representa la cuarta parte de las exportaciones de bienes del país (<http://www.inac.gub.uy>). Se hace evidente, entonces, que el control y supervisión de los alimentos cárnicos es de vital importancia, no solo a nivel nacional, para respetar las regulaciones y los derechos de la población, sino a nivel internacional al momento de posicionarse como un país exportador de productos de calidad.

En este contexto y frente a la posibilidad de fraude, es que se plantea en este trabajo la implementación de técnicas que permitan a los organismos de contralor llevar a cabo la regulación, trazabilidad de producción y suministro de este tipo de alimentos.

#### 1.4 La matriz de estudio: Salchicha tipo Viena o Frankfurter

Los embutidos constituyen una de las formas más antiguas de alimentos procesados. Si bien el origen cronológico no está claro, existen documentos que hacen referencia a su uso en el siglo

VIII A.C., cuando los hombres aprovechaban los productos secundarios y partes menos deseadas del carneo para generar mezclas que luego eran introducidas en sacos como intestinos o estómagos de animales (Pearson and Tauber, 1984).

Dentro de esta categoría se tiene al “Frankfurter o Salchicha de Viena”, el cual es un chacinado cocido embutido, generado a partir de las especies animales vaca y cerdo. Por su preparación fácil y rápida, además de ser económico y accesible, constituye un alimento de consumo masivo.

El Reglamento Bromatológico Nacional lo define como *“el embutido preparado con una emulsión fina homogénea de carnes de vacuno o cerdo trituradas y grasa de cerdo, con el agregado de órganos de estas especies ricos en tejidos conjuntivos, agentes ligantes y emulsificantes y aditivos autorizados. Podrá ser adicionado de leche en polvo, sal y condimentos. Se embute en membranas naturales o artificiales de diámetro pequeño y se somete a posterior escaldado y ahumado”*.

A su vez, el mismo Reglamento establece que en los chacinados cocidos, como lo es la matriz de estudio, se pueden agregar ingredientes complementarios como almidones, harina de soja, harina de mandioca, féculas, sémolas, proteínas de soja excepto texturizadas, entre otros, siempre que el producto terminado cumpla con los requisitos de contener un máximo de 3,5% almidón y 2% de proteína agregada.

Los aditivos más comunes a agregar en estas matrices son las especies vegetales maíz (*Zea mays*) y soja (*Glycine max*) generalmente en las formas de almidón de maíz y proteína de soja respectivamente, las cuales brindan propiedades funcionales específicas a los alimentos de tipo procesados (Shewry, Jonea & Halford, 2008).

De acuerdo con lo dispuesto en el Reglamento Bromatológico Nacional, la detección y cuantificación de maíz y soja en estas matrices alimentarias, son necesarias para asegurar el cumplimiento de los requisitos previamente mencionados.

#### 1.4.1 Proceso de fabricación

Las carnes utilizadas para la elaboración de las salchichas estilo Viena son carne de vaca y cerdo, además de grasa y hielo. La carne de cerdo confiere un color entre rosa claro y rojo mate a la masa, en cambio la carne de res presenta un color rojo claro e intenso, que da consistencia a la masa y sabor fuerte (<http://www.fao.org/3/a-au165s.pdf>).

En el proceso de fabricación es indispensable la utilización de un mezclador y el agregado de hielo para formar una emulsión. También es importante que los chacinados cocidos tengan un tratamiento térmico a una temperatura adecuada para lograr la coagulación total o parcial de las proteínas cárnicas, de forma de obtener una estructura firme y elástica. (Reglamento Bromatológico, <http://www.fao.org/3/a-au165s.pdf>). El proceso completo de fabricación según la FAO se describe a continuación y se esquematiza en la Fig. 1:

1) Recibo y Selección: se usa carne de vaca y carne magra de cerdos jóvenes con poco tejido conectivo, las cuales deben estar refrigeradas.

2) Troceado: las piezas de carne seleccionadas se cortan en trozos pequeños de aproximadamente 7 x 7 centímetros se lavan con agua limpia, y seguidamente se congelan por 24 horas para reducir la contaminación y facilitar la operación de molienda.

3) Molienda: las carnes y la grasa se muelen, cada una por separado. Para las carnes se usa un disco de 3 mm y para la grasa el disco de 8 mm.

4) Picado y Mezclado: estas operaciones se realizan en forma simultánea en un aparato llamado *cutter*, el cual está provisto de cuchillas finas que pican finamente la carne y producen una mezcla homogénea. Al picar y mezclar se debe seguir el siguiente orden de agregación de los ingredientes:

a. Carne magra de cerdo y vaca, sal y fosfatos, a velocidad lenta hasta obtener una masa gruesa pero homogénea.

b. Se aumenta la velocidad y se incorpora el hielo; se bate hasta obtener una masa fina y bien ligada.

c. Se incorpora la lonja o la carne de cerdo grasosa.

d. Se agregan los condimentos y el ascorbato. La temperatura de la pasta no debe exceder de 15°C. El proceso se suspende cuando la emulsión se muestre homogénea.

5) Embutido: la masa de carne se traslada a la máquina embutidora y allí se llena en fundas sintéticas de calibre entre 18 y 20 mm. El embutido de las salchichas de Viena debe efectuarse bastante suelto, para que la masa tenga espacio suficiente y no se reviente la tripa.

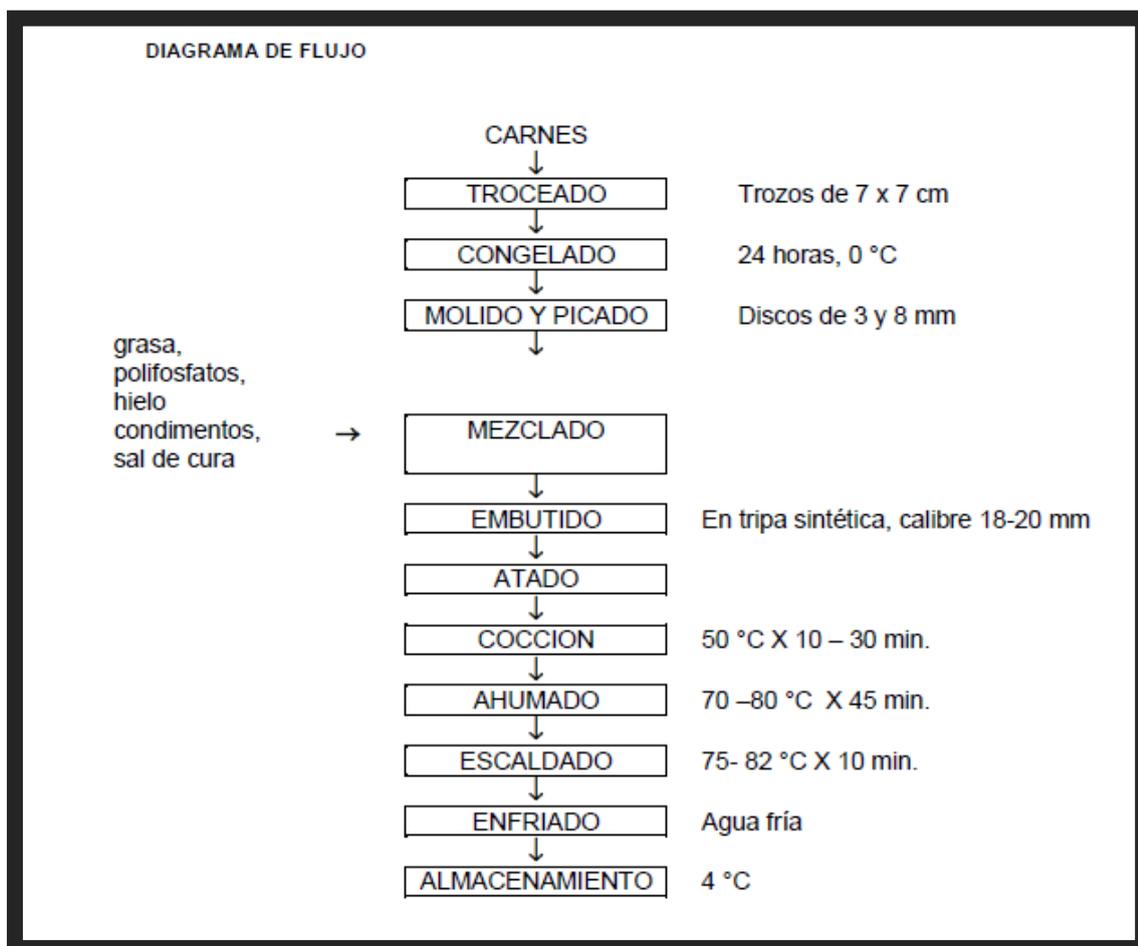
6) Atado: las salchichas se amarran en cadena, aproximadamente cada 10 centímetros, utilizando hilo de algodón.

7) Tratamiento térmico: se realiza en 3 fases:

- Calentamiento a 50°C entre 10 y 30 minutos según el calibre.
- Ahumado a 60-80°C durante 10-30 minutos según el calibre.
- Pasteurización (escaldado) en agua a 75-82°C por 10 minutos para salchichas delgadas.

8) Enfriamiento: después de la cocción la temperatura debe bajarse bruscamente mediante una ducha fría o con hielo picado.

9) Almacenamiento: Las salchichas se cuelgan para que sequen y se almacenan bajo refrigeración.



**Figura 1.** Diagrama de flujo del proceso de fabricación de la salchicha tipo viena o frankfurter. Tomado de “Fichas técnicas. Procesados de carnes” de la FAO.

Tal como se expresa en el proceso de fabricación, las altas temperaturas y los procesos de picado y amasado a los que se somete la muestra, producen como resultado final una pasta homogénea. Se tiene así una matriz alimentaria que no permite la distinción a simple vista de sus componentes (Ren *et al.*, 2017), siendo esta una característica que la hace especialmente susceptible al fraude.

Más aún, estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio en el marco de tesis de grado, indican la existencia de otras especies animales presentes en estas matrices además de las declaradas en la etiqueta (Lic. Patricia Abete, tesis de grado, 2009).

Es importante, por lo tanto, verificar el etiquetado de estos productos, de forma de asegurar que las especies declaradas de alto valor comercial no son sustituidas, total o parcialmente, por especies más económicas para abaratar costos (Danezis *et al.*, 2016). La distinción entre una contaminación y una adulteración del producto se puede llevar a cabo mediante medidas cuantitativas de las especies no declaradas que se encuentren presentes (Sawyer J, *et al.*, 2003).

Este trabajo plantea la determinación de las especies animales y vegetales que se encuentran presentes los Frankfurters y lo declaran en la etiqueta, así como la búsqueda de especies no declaradas que puedan estar presentes en la muestra.

## 1.5 Nuevas tecnologías en la producción de alimentos

La biotecnología se define como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (<https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>). En este sentido, el hombre ha utilizado la biotecnología desde hace miles de años, por ejemplo, para la producción de vino y pan por medio de procesos de fermentación, antes incluso de que las bases moleculares de estos procesos fueran conocidas (<http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/biotecnologia.pdf>; OMS, 2005).

En las últimas décadas, el desarrollo de nuevas metodologías destinadas al mejoramiento genético ha abierto las posibilidades para la generación de nuevas características en distintos organismos. Específicamente, por medio de ingeniería genética y utilización de ADN recombinante se logra la inserción de genes exógenos en el genoma de organismos de interés (Rizzi *et al.*, 2007), logrando características deseadas con las que no contaba inicialmente la especie en cuestión. Algunos de los beneficios del uso de esta tecnología en la industria alimentaria, serían la obtención de productos con mayor valor nutricional, durabilidad, y mayor volumen de producción. (Rizzi *et al.*, 2007).

### 1.5.1 Organismos genéticamente modificados.

Los organismos genéticamente modificados (OGMs) son aquellos a los que se le ha agregado uno o más genes por técnicas de ingeniería genética, con el objetivo de incorporar nuevas características deseadas, como la resistencia a insectos, herbicidas o tolerancia a sequía en el caso de los vegetales (Chile Bio, 2013).

Los principales argumentos que impulsan el uso de los cultivos genéticamente modificados (GM) en la agricultura apuntan a beneficios en la producción agrícola. Estos beneficios se lograrían por medio del aumento de la resistencia a agentes externos y por tanto, disminución de malas

cosechas, así como la capacidad de generar alimentos más nutritivos. En el ámbito ambiental, se reduciría la necesidad de aplicar sustancias químicas que protejan a los cultivos y el uso de tierras para cultivo, permitiendo la rehabilitación de las mismas (<http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e04d.pdf>).

Si bien y de acuerdo a lo expresado, los beneficios de esta tecnología serían evidentes, se ha generado, como contraparte, una creciente preocupación relacionada con los efectos adversos que podrían ocasionar en la seguridad alimentaria, debido a la posibilidad de causar toxicidad y/o alergia. En relación al medio ambiente, se plantea la pérdida de diversidad biológica entre los puntos más relevantes (Yearbook, 2012; [http://www.ei.udelar.edu.uy/renderPage/index/pageId/902#heading\\_6210](http://www.ei.udelar.edu.uy/renderPage/index/pageId/902#heading_6210)).

La controversia existente acentúa las diferentes posturas y la variedad de marcos regulatorios sobre beneficios y riesgos asociados con el uso de los OGM, principalmente, al no haberse logrado aún un consenso en la evidencia científica relacionada con estos temas (Hilbeck *et al.*, 2015; OMS, 2005).

#### 1.5.1.1 Panorama mundial de los cultivos genéticamente modificados

A dos décadas desde que se comenzaron a comercializar los cultivos GM, son más de 40 los países que han aprobado eventos de cultivo GM para alimento y/o forraje, así como para liberación al medio ambiente. En el período que va desde 1996 a 2015, se sembró una superficie total acumulada de 2000 millones de hectáreas a nivel mundial, compuesta por 1000 millones de soja transgénica, 600 millones de maíz transgénico, 300 millones de algodón transgénico y 100 millones de canola transgénica (James, C. 2015).

En el año 2016, la superficie total sembrada a nivel global fue de 185,1 millones de hectáreas con un incremento del 3% (equivalente a 5,4 millones de hectáreas) respecto a 2015. Tal como se esquematiza en la Fig. 2, Estados Unidos continúa liderando el grupo de los 5 principales países productores de cultivos GM con 72,9 millones de hectáreas (39% del total mundial), seguido de Brasil con 49,1 millones (27% de la producción mundial) y Argentina con 23,8 millones de hectáreas, representando el 13% del

total. En cuarto lugar, se encuentra Canadá con 11,6 millones de hectáreas e India en el quinto lugar, con 10,8 millones de hectáreas sembradas.

La amplia adopción de este tipo de cultivos y las diferentes posturas respecto a sus beneficios y riesgos, llevó a los países a tomar decisiones respecto a políticas regulatorias sobre estos temas.

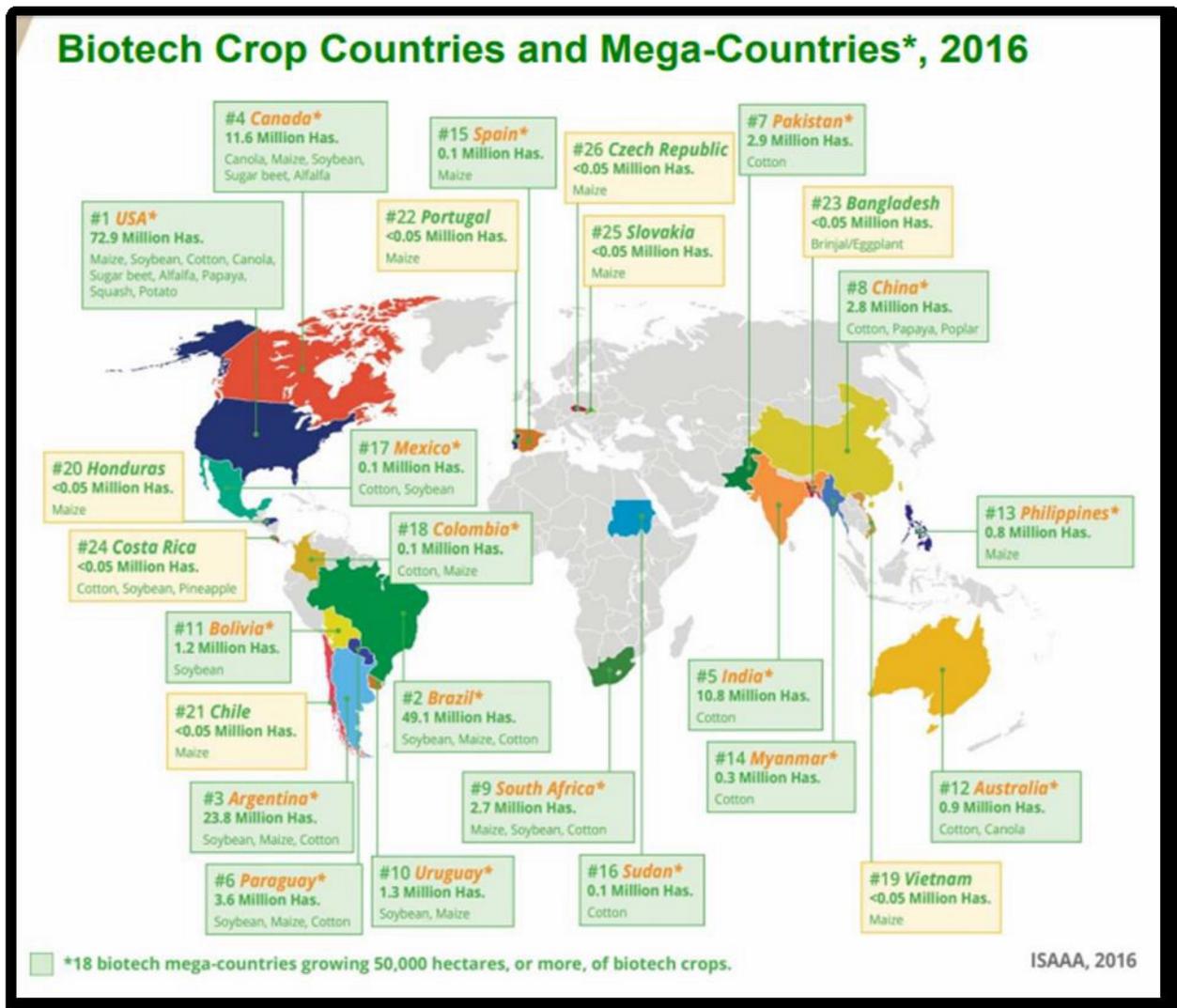


Figura 2. Distribución de los cultivos transgénicos a nivel global. Fuente: ISAAA 2016.

### 1.5.1.2 Uruguay y los Cultivos Genéticamente Modificados

En Uruguay, el primer evento transgénico para siembra fue introducido en el año 1996 correspondiente a la Soja *Roundup Ready* o “Soja RR” (GTS 40-3-2) con tolerancia al herbicida glifosato. En los años 2003 y 2004, le siguieron la aprobación para siembra, consumo y comercialización de dos tipos de maíz genéticamente modificados, Mon810 y Bt11,

respectivamente, ambos con resistencia a insectos lepidópteros (CUS, 2013). Según la ISAAA (2016), Uruguay ha plantado del año 2015 al 2016, 1.23 millones de hectáreas de cultivos transgénicos de soja y 60000 hectáreas de cultivos transgénicos de maíz, con una superficie total de 1.3 millones de hectáreas aproximadamente (ISAAA, 2016).

Actualmente, y con un total de 15 eventos aprobados, diez de maíz y cinco de soja, Uruguay se posiciona como el décimo país a nivel mundial de área cultivada con OGMs, y cuarto en América Latina, por debajo de Brasil, Argentina y Paraguay (ISAAA, 2016). Además, es el segundo país en el mundo con mayor producción de cultivos GM por hectárea, después de Paraguay.

Con la incorporación de Organismos Genéticamente Modificados y sus derivados en la producción de alimentos, vino su inclusión en la dieta alimentaria. Estos alimentos contienen nuevos genes y proteínas que no se encontraban en el suministro de alimentos y como consecuencia, no se tienen antecedentes de su inocuidad. Por este motivo, muchos países han incorporado sistemas para regular el etiquetado de alimentos GM, siendo esto una herramienta que busca brindar información al consumidor para que pueda elegir si adquirir el alimento o no, en base a sus preferencias personales (OMS, 2005).

Los “alimentos modificados genéticamente” son aquellos que contienen, están compuestos o han sido producidos a partir de OGMs (Reglamento 1829/2003 Unión Europea). Más específicamente, son los que integran alguna de las siguientes categorías:

1. Alimentos compuestos por o que contengan organismos vivos/viables, por ejemplo, maíz.
2. Alimentos derivados de o que contengan ingredientes derivados de OGM, por ejemplo, harina, productos que contengan proteínas alimentarias o aceite proveniente de especies vegetales GM.
3. Alimentos que contengan un solo ingrediente o aditivo producido por microorganismos GM (MGM), por ejemplo, colorantes, vitaminas y aminoácidos esenciales.
4. Alimentos que contengan ingredientes procesados por enzimas producidas mediante MGM, por ejemplo, el jarabe de maíz de alta fructosa producido a partir del almidón, usando la enzima glucosa isomerasa (producto de un MGM) (ArgenBio, <http://www.argenbio.org/index.php?action= novedades&note=267>)

Uruguay controla el uso de los OGM a través del Decreto N° 353/008 referente a “Normas relativas a Bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas”, el que expresa

que “el Gabinete Nacional de Bioseguridad promoverá acciones tendientes a la implementación del etiquetado voluntario "GM" o "no GM" de aquellos alimentos en los que se pueda comprobar mediante análisis del producto final la presencia de ADN o proteínas genéticamente modificados”.

Más recientemente, a fines del año 2014, se aprobó en Montevideo el Decreto N° 34.901, que fue modificado en el 2015 por el Decreto N° 35.009, el cual exige que: "*Los alimentos que han sido manipulados genéticamente o que contienen uno o más ingredientes provenientes de éstos que superen el 1% del total de cada ingrediente considerado individualmente, deberán ser etiquetados especialmente*". Esta normativa busca facilitar el comercio internacional con países cuya legislación para el etiquetado de alimentos GM establece un valor umbral de porcentaje de material GM a partir del cual se debe etiquetar, tal es el caso de Brasil y la Unión Europea.

Existe en varios sectores de la población del país, un creciente interés por impulsar la implementación del etiquetado de transgénicos a nivel municipal y nacional. Para poder incorporar estas regulaciones es esencial que todas las intendencias, en cuyos reglamentos se exija este tipo de normativa, cuenten con las metodologías para llevar a cabo el análisis de los alimentos y controlar el cumplimiento de la misma. El Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de Facultad de Ciencias se encuentra abocado a generar este tipo de herramientas dentro del marco de tesis, tesinas, proyectos y asesorías. Este trabajo pretende ser otro aporte del laboratorio proporcionando técnicas de detección de especies transgénicas, en este caso, en la matriz de estudio: Salchichas tipo Viena (Ver objetivos).

Como se mencionó anteriormente, las salchichas pueden contener especies vegetales como aditivos alimentarios, por ejemplo, maíz en la forma de almidón de maíz, y soja como proteína de soja.

En nuestro país la mayoría de los cultivos de maíz y soja, son genéticamente modificados. Si las salchichas presentaran maíz y soja genéticamente modificados, debería etiquetarse de acuerdo con el decreto municipal. Es así como en este trabajo se buscará detectar maíz y soja GM con el objetivo de contribuir al etiquetado de los alimentos generados a partir de biotecnología moderna.

## 1.6 Determinación de los componentes de una matriz alimentaria.

Está claro que para cumplir con las regulaciones establecidas para la producción de alimentos, y para garantizar la autenticidad de la información brindada a los consumidores, es imperativo contar con herramientas analíticas que permitan comprobar el contenido de los productos en cuestión.

En este sentido, existen diversos métodos que permiten la identificación de los componentes presentes en las matrices alimentarias,

Las técnicas más utilizadas para detectar e identificar especies se basan en el análisis de proteínas y ADN (Danezis *et al.*, 2016). Los primeros métodos implican la detección de proteínas especie específicas y son los casos de las técnicas electroforéticas y/o inmunológicas (Lockley & Bardsley, 2000); cromatográficas que combinan cromatografía líquida o gaseosa con espectroscopía de masas (LC-MS y GC-MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) (Grundy *et al.*, 2012). Sin embargo, al compararlas con metodologías basadas en el estudio de ADN, pueden resultar notoriamente menos sensibles al analizar alimentos procesados. Las altas temperaturas a las que estos son sometidos los alimentos en el proceso de fabricación provocan la desnaturalización y/o degradación de las proteínas presentes, alterando los epítopes (Rodríguez *et al.*, 2005), y dando lugar a “falsos positivos” y/o “falsos negativos”.

Las técnicas basadas en la detección de ADN, por otro lado, buscan secuencias específicas de cada especie y presenta varias ventajas. Primero, el ADN se puede extraer de la casi totalidad de los tejidos y permanece prácticamente inalterado durante el proceso de manufacturación de los alimentos. Si bien puede sufrir degradación, es posible obtener fragmentos que permitan la diferenciación de especies cercanas (Ram, Ramand Baidoun, 1996; Ebbehøjand Thomsen, 1991; Chikuni *et al.*, 1990). Además, permite una identificación exacta mediante el secuenciado de los nucleótidos que lo componen (Lockley & Bardsley, 2000).

### 1.6.1 Identificación de especies y organismos genéticamente modificados mediante el análisis del ADN

#### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La mayoría de los métodos para detección de especies basados en el estudio de ADN consisten en la amplificación de fragmentos específicos de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Lockley & Bardsley, 2000; Matsunaga *et al.*, 1999). Esta técnica se basa en la hibridación de oligonucleótidos (cebadores) que guían la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN por medio de una enzima polimerasa termoestable. Luego de repetidos ciclos de reacción en los que se varía la temperatura, se generan un gran número de copias idénticas al fragmento de interés que pueden ser analizadas en el laboratorio (Mafra *et al.*, 2008; Kubista *et al.*, 2006).

La alta sensibilidad y especificidad de la técnica, así como la rapidez con la que se lleva a cabo, hacen que sea apropiada para la determinación tanto de especies animales como vegetales, y para el estudio de OGMs. (Pascoal *et al.*, 2004; Gachet *et al.*, 1999; Lockley & Bardsley, 2000).

Por otro lado, estas ventajas traen consigo ciertas consideraciones que se deben tener en cuenta al emplear esta técnica, para evitar la generación de falsos positivos por contaminación y/o falsos negativos por presencia de inhibidores (muy común en matrices alimentarias) (Lauri *et al.*, 2008). La contaminación ocurre sobre todo por la presencia de secuencias de ADN que fueron amplificadas previamente en el lugar de trabajo. Por este motivo es imprescindible para el ensayo, asignar áreas físicas diferentes para los pasos previos y posteriores a la PCR, así como contar con un flujo de trabajo unidireccional (Rossen *et al.*, 1992). En cuanto a los posibles inhibidores que puedan estar presentes en la muestra, se pueden eliminar realizando una purificación del ADN extraído (Griffiths *et al.*, 2002) o disminuir su efecto mediante la dilución de la muestra (Kubista *et al.*, 2006).

Finalmente, se deben considerar 3 factores respecto a la muestra a utilizar para que la PCR resulte exitosa. Estas son: la cantidad de ADN que se logró extraer, la calidad del mismo (es decir, el grado de degradación que sufrió hasta el momento) y la pureza (se relaciona con la cantidad de contaminantes que fueron purificados junto con el ADN) (Griffiths *et al.*, 2002).

La estrategia mediante la cual se detectan e identifican las especies por PCR implica la detección de marcadores moleculares, que corresponden a secuencias características de especie.

### 1.6.1.1 Detección de especies mediante PCR punto final

La identificación de especies por medio de estudios basados en el ADN (*barcoding*) implica contar con secuencias génicas que permitan no sólo la discriminación entre especies, sino el poder identificar sin ambigüedad la especie de interés. Hoy en día, el *barcoding* es una técnica establecida que implica la secuenciación de segmentos génicos y la comparación de los resultados con secuencias de referencia en bases de datos públicas (Hebert *et al.*, 2003).

La técnica de *barcoding* de animales utiliza los genes del ADN mitocondrial (ADNmt) para distinguir entre especies animales. El genoma mitocondrial carece de intrones, pseudogenes y secuencias repetitivas que facilitan la alineación de las secuencias de los genes amplificados (Lin *et al.*, 2005). Además, se encuentran disponibles públicamente, de forma que los cebadores pueden diseñarse para amplificar y secuenciar cualquier especie que tenga un genoma de ADNmt publicado (Simmon y Weller 2001).

Los genes de ADN mitocondrial poseen varias ventajas respecto al ADN nuclear al momento de realizar estudios filogenéticos y de identificación de especies en productos cárnicos. Entre estas, se tiene que el ADN mitocondrial es más abundante que el ADN nuclear en preparaciones de ácido nucleico total, al poseer mayor número de copias que este último, con cientos o miles de copias en cada célula (Robin & Wong, 1988; Alberts *et al.*, 1994), la tasa de mutación relativamente alta en comparación con los genes nucleares resulta en la acumulación de suficientes mutaciones puntuales para permitir la discriminación de especies incluso estrechamente relacionadas (Lockley & Bardsley, 2000; Pesole *et al.*, 1999). El ADN mitocondrial tiende a ser heredado por la madre de modo que los individuos normalmente poseen sólo un alelo. Por lo tanto, las ambigüedades de la secuencia de genotipos heterocigotos generalmente se evitan, permitiendo la distinción de especies con precisión (Lockley & Bardsley, 2000). Por lo anterior, la detección de especies animales se realizará mediante la amplificación de una secuencia presente en el ADNmt: la secuencia del gen que codifica para el citocromo b (CYTB).

### 1.6.1.2 Detección de eventos transgénicos mediante PCR punto final

Los análisis de detección de eventos transgénicos mediante PCR se pueden categorizar en cuatro niveles de especificidad, mostrados en la Figura 3: los métodos de rastreo, los específicos de gen, los específicos de construcción y los específicos de evento. Estos se diferencian entre sí por las secuencias blanco dentro del transgen a las que se encuentran dirigidos los cebadores (Miraglia, 2004) (Holst- Jensen, 2003).



**Figura 3.** Categorías de ensayos de PCR según el blanco a analizar sobre una construcción de un evento transgénico tipo. De arriba hacia abajo se muestran las estrategias en grado creciente de especificidad. (Tomado de la Tesina de Grado de Martín Fernández, 2010).

Los métodos de rastreo o screening de OGM, son los menos específicos y buscan secuencias comunes presentes en la mayoría de los eventos transgénicos, como las correspondientes a promotores y terminadores. Las más comunes para este fin son el promotor 35S del Virus del Mosaico de Coliflor y el terminador del gen para la enzima nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, t-Nos (Barbau-Piednoir *et al.*, 2010). En un nivel más arriba de especificidad están los métodos específicos de gen, que dirigen la búsqueda a la secuencia del gen con la modificación genética específica que introduce la característica nueva al organismo. Esta estrategia no permite la identificación específica de evento ya que dicho gen puede estar presente en diferentes OGMs (Miraglia, 2004). En el caso de los métodos específicos de construcción, las secuencias a amplificar abarcan una región que corresponde a la unión entre el promotor y el gen que codifica para la nueva característica o de este gen y el terminador. Los métodos de mayor especificidad corresponden a los específicos de evento que logran detectar un único evento transgénico. En este caso, la región que se amplifica es la unión entre el ADN del transgén y el genoma del organismo huésped, siendo esta única para cada evento generado (Miraglia, 2004).

Por otro lado, la generación de eventos apilados mediante cruzamiento entre distintas plantas GM, hace que la identificación por evento específico tenga limitaciones al no poder distinguir entre un evento apilado o la mezcla de los dos eventos (debido a diferentes ingredientes que los contengan) que dieron lugar al apilado en primer lugar (Holst-Jensen *et al.*, 2006).

#### 1.6.1.3 Cuantificación de especies animales en matrices alimentarias: PCR en Tiempo Real

El hecho de contar con métodos cuantitativos aplicables a matrices complejas de origen animal es importante para asegurar las buenas prácticas en el proceso de producción de estos alimentos, así como para evitar el fraude alimentario por presencia de especies no declaradas (Eugster *et al.*, 2008).

Con este fin, la PCR en Tiempo Real ha probado ser una técnica adecuada al permitir la determinación de las cantidades de especies animales presentes en diferentes matrices alimentarias complejas (Lopez-Andreo *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2002; Sawyer J., *et al.*, 2003). Tiene la ventaja de ser más sensible que la PCR convencional y de no requerir ensayos posteriores a la amplificación para detectar los productos generados (Kubista *et al.*, 2006). Se le suma además la ventaja de que al utilizar sondas u agentes intercalantes (como se verá más adelante), permite dirigir la amplificación a productos de PCR cortos, siendo esto crucial al analizar el ADN remanente en alimentos procesados (Wittwer *et al.*, 1997b).

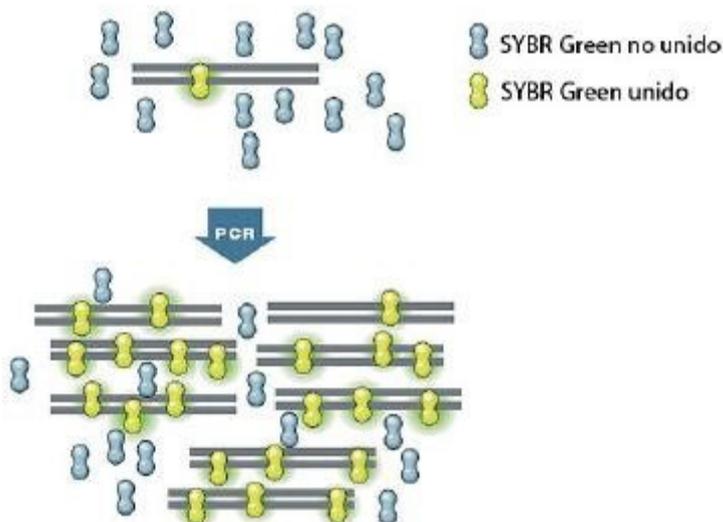
La técnica se basa en la detección de una señal de fluorescencia a lo largo de toda la reacción de amplificación, que se relaciona con la cantidad de producto generado. Esta capacidad de la técnica de seguir la reacción en “tiempo real” es lo que hace posible la detección y cuantificación de secuencias de ADN presentes inicialmente en la muestra (Kubista *et al.*, 2006).

La metodología permite determinar el punto de la reacción en que la amplificación de la muestra alcanza un valor mínimo de fluorescencia por encima de la fluorescencia de fondo. El ciclo de reacción en que esto ocurre se denomina Ciclo umbral o Ct (*Threshold cycle*), se obtiene de la zona exponencial de la curva de amplificación y es directamente proporcional a la cantidad de ADN diana presente inicialmente en la muestra. Cuanto menor sea el Ct, mayor va a ser la cantidad de ADN presente en la muestra y viceversa.

### 1.6.1.3.1 Sistemas de generación de fluorescencia

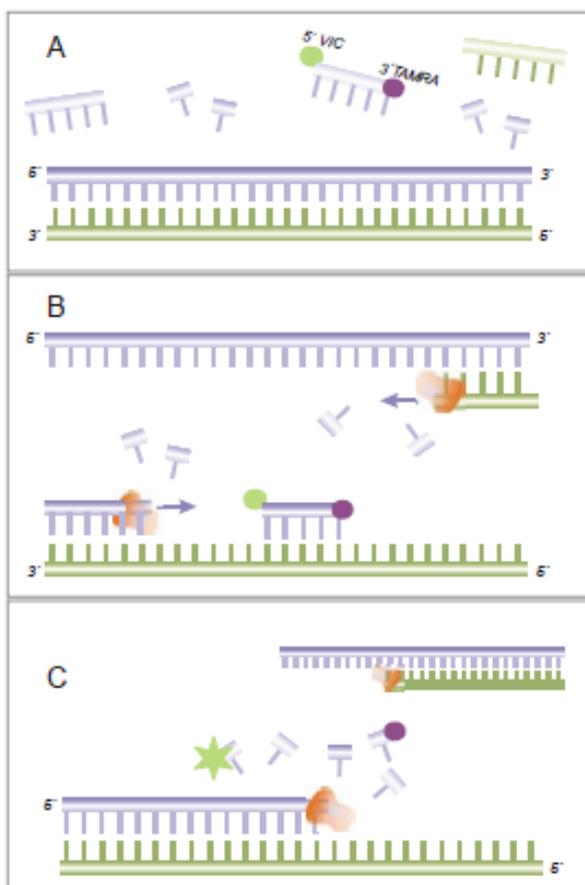
Entre los sistemas basados en fluorescencia utilizados para seguir la amplificación por PCR en Tiempo Real, se puede optar por el uso de agentes intercalantes de ADN o por sondas que se asocian a secuencias específicas de ADN diana.

**Detección por agentes intercalantes.** Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia al unirse al ADN de doble hebra, lo que permite seguir el aumento del ADN blanco durante toda la reacción. El más utilizado en PCR en Tiempo Real es el SYBR Green (Wittwer *et al.*, 1997b). Tiene como ventajas su bajo costo, sencillez y que no es necesario realizar diseño ni optimización como el caso de las sondas. Como se observa en la Figura 4, el SYBR Green se une al surco menor del ADN independientemente de su secuencia, motivo por el cual se debe utilizar algún método adicional para corroborar que el producto amplificado es el de interés y que no corresponde a falsos positivos o dímeros de cebadores. Una de las metodologías utilizadas con este fin es el análisis de la curva de disociación (Lopez-Andreo *et al.*, 2005). Este método consiste en, una vez finalizada la PCR, aumentar la temperatura de manera gradual hasta alcanzar la temperatura de disociación ( $T_m$ ) en que se produce la disociación de los amplicones generados (Ririe *et al.*, 1997). Esta temperatura es característica para cada producto de PCR sintetizado ya que depende de la longitud y secuencia del mismo, de manera que al determinarla se puede comprobar la especificidad de la reacción (Hernández *et al.*, 2003). A su vez, los dímeros de cebadores son distinguibles por presentar temperaturas de disociación más bajas, por ser de menor longitud que los fragmentos de ADN buscados.



**Figura 4.** Detección de amplificación utilizando SYBR Green. El SYBR Green se une al surco menor del ADN doble hebra, lo que provoca un incremento en la señal de fluorescencia. Así, es posible seguir el aumento del ADN blanco durante toda la reacción, teniendo en cuenta que cuanto mayor cantidad de producto amplificado, mayor será la emisión de fluorescencia (Extraído de Lopez-Andreo *et al.*, 2005).

**Detección por sondas.** Se tienen diferentes tipos de sondas, entre estas, las sondas de hidrólisis, de hibridación o sondas con estructura de horquilla (*Molecular Beacons*) (Wittwer *et al.*, 1997a). Las sondas de hidrólisis se conocen popularmente como TaqMan por su nombre comercial y son las más utilizadas en ensayos de PCR en Tiempo Real. Estas sondas se basan en el uso de la tecnología FRET (Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia). Son oligonucleótidos cortos que han sido marcados con un fluoróforo en el extremo 5' y un *quencher* o aceptor de fluorescencia en el extremo 3' (Holland *et al.*, 1991) cuyos espectros de emisión y excitación de fluorescencia se solapan. Lo que ocurre con la molécula es que al ser excitado el fluoróforo, la fluorescencia es captada por el *quencher* que se encuentra cercano al primero por formar ambos parte de la sonda. En el momento en que la polimerasa se encuentra sintetizando el ADN, esta llega a la sonda que se encuentra unida a la secuencia de ADN diana y la escinde por su actividad exonucleasa 5', lo que hace que el fluoróforo se separe del *quencher* y se produzca un aumento en la fluorescencia, tal como se esquematiza en la Figura 5. Así, a medida que se continúan sintetizando fragmentos de ADN, continúa aumentando la emisión de fluorescencia, lo que es registrado y medido por el equipo (Heid, *et al.*, 1996).



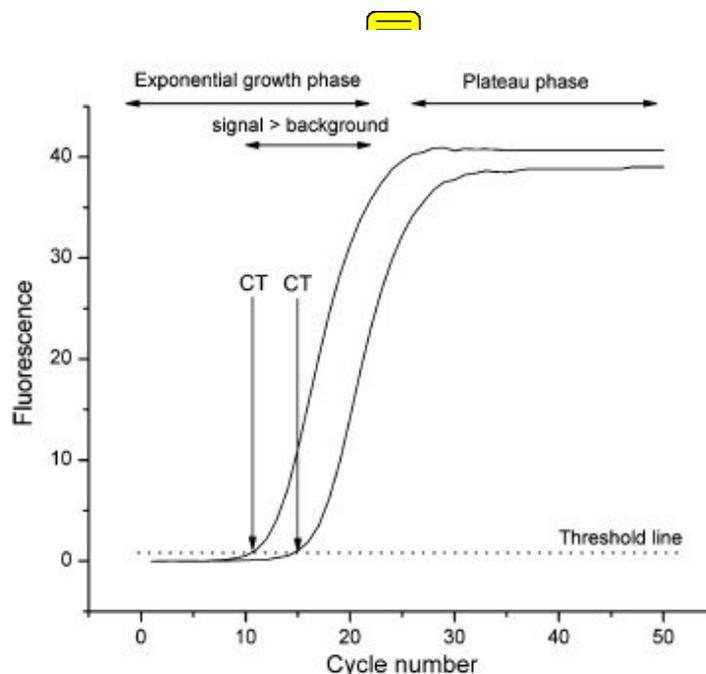
**Figura 5. Mecanismo de detección de amplificación mediante sondas de hidrólisis, Taqman.** **A:** Al inicio de la reacción se tienen la doble hebra de ADN molde, los cebadores, nucleótidos y la sonda compuesta en el ejemplo por el fluoróforo VIC y el *quencher* TAMRA. **B:** Unión de los cebadores y la sonda a la secuencia diana de ADN, comienza la síntesis de la nueva hebra. **C:** La Taq polimerasa continúa la síntesis de la nueva hebra de ADN y escinde la sonda mediante su actividad exonucleasa 5' → 3' lo que produce la separación del fluoróforo y el *quencher*, emitiendo una señal de fluorescencia. Así, se produce un aumento de la señal de fluorescencia a medida que se genera mayor producto de amplificación (Tomado de la Tesis de Maestría en Biotecnología de Mailen Arleo, 2015).

En este trabajo, se optó por la utilización del agente intercalante SYBRGREEN como química de generación de fluorescencia, seguido del análisis de la curva de disociación para asegurar la especificidad de la reacción.

#### 1.6.1.3.2 Cuantificación por PCR en tiempo real

El resultado del ensayo de PCR en tiempo real es una curva de amplificación de aumento de fluorescencia vs N ° de ciclos de reacción, tal como las que se observan en la Figura 6. En cada gráfico se distinguen 3 zonas diferenciales, propias del ensayo: una fase inicial en donde no se detecta amplificación del producto, zona determinada por la línea basal; una segunda fase exponencial donde la eficiencia de la reacción es máxima y se pueden realizar medidas cuantitativas así como cualitativas; y una última fase de meseta o *plateau* que corresponde al agotamiento de los reactivos y donde el nivel de fluorescencia no cambia (Medida cualitativa de PCR punto final).

Para realizar el análisis de datos, se elige en el gráfico y de forma arbitraria, un nivel mínimo de fluorescencia por encima de la fluorescencia de fondo y al comienzo de la fase exponencial de la curva. Esto es lo que se denomina umbral de fluorescencia y va a determinar los Ct de cada muestra.



**Figura 6.** Ejemplo de las curvas que se obtienen en una reacción de PCR en Tiempo Real. En el gráfico de fluorescencia vs número de ciclos se distinguen la zona de crecimiento exponencial, donde la eficiencia de reacción es máxima; y la de meseta, correspondiente al agotamiento de reactivos. El umbral de fluorescencia (*Threshold line*) determinado en forma arbitraria define los Cts de cada curva. Figura tomada de Kubista *et al.* (2006).

Considerando que la eficiencia de la reacción es de un 100%, es decir que por cada molécula de ADN se generan dos al finalizar cada ciclo, se tiene que la cantidad de ADN en el Ct será proporcional a la cantidad de ADN presente inicialmente en la muestra. Esto se representa en la siguiente ecuación:

$$N_{Ct} = N_i \times 2^{Ct} \quad (1)$$

En donde  $N_{Ct}$  es la cantidad de ADN diana en el ciclo Ct y  $N_i$  la cantidad de ADN diana presente inicialmente en la muestra.

A partir de la ecuación anterior, se puede obtener una representación lineal en donde se considere, además, una eficiencia experimental menor al 100%. Esta última se puede estimar mediante una curva de calibración con estándares de ADN molde de concentraciones conocidas. Los Cts obtenidos para estas muestras se grafican vs el logaritmo de sus concentraciones o números de copias, y los datos se ajustan a la siguiente ecuación:

$$Ct = -\left(\frac{1}{\log E}\right) \times \log(N_o) + \frac{\log N_c}{\log E} \quad (2)$$

Donde Ct es el ciclo umbral obtenido para cada estándar,  $N_o$  es la cantidad inicial de ADN de los estándares,  $N_c$  la cantidad de ADN amplificado en el ciclo Ct y E la eficiencia de la reacción.

La eficiencia de amplificación para cada secuencia se calcula a partir de la pendiente de esta curva como:

$$E = 10^{\frac{1}{k}} - 1 \quad (3)$$

#### 1.6.1.3.3 Cuantificación de especies animales en Frankfurter

La cuantificación de especies animales por medio de PCR en tiempo real, se puede llevar a cabo mediante una curva de calibración utilizando estándares de ADN de concentraciones conocidas (Lopez-Andreo *et al.*, 2005). Estos estándares pueden ser productos de PCR purificados de concentración conocida, diluciones seriadas a partir de una muestra inicial de un plásmido que contenga el gen que se desea amplificar (Kubista *et al.*, 2006) o diluciones de ADN de concentración conocida correspondiente a la especie que se planea cuantificar (Eugster *et al.*, 2009).

Se debe contar también con un método que permita la normalización de las cantidades que se detecten para cada especie. Esto es necesario en productos procesados de forma de contar con un control interno positivo que permita dar cuenta de la cantidad total de ADN que hay presente, así como evaluar inhibición y degradación del ADN en la matriz (Ballín *et al.*, 2009). Para esto se utiliza un gen universal, expresando las cantidades como porcentaje de la especie específica respecto al ADN total de la muestra.

## 2 OBJETIVOS GENERALES

---

Se propone como objetivo general de este trabajo poner a punto técnicas basadas en el análisis de ADN para detectar la composición, en cuanto al contenido de especies animales, vegetales y transgénicos, de la matriz alimentaria Salchicha tipo Viena o Frankfurter.

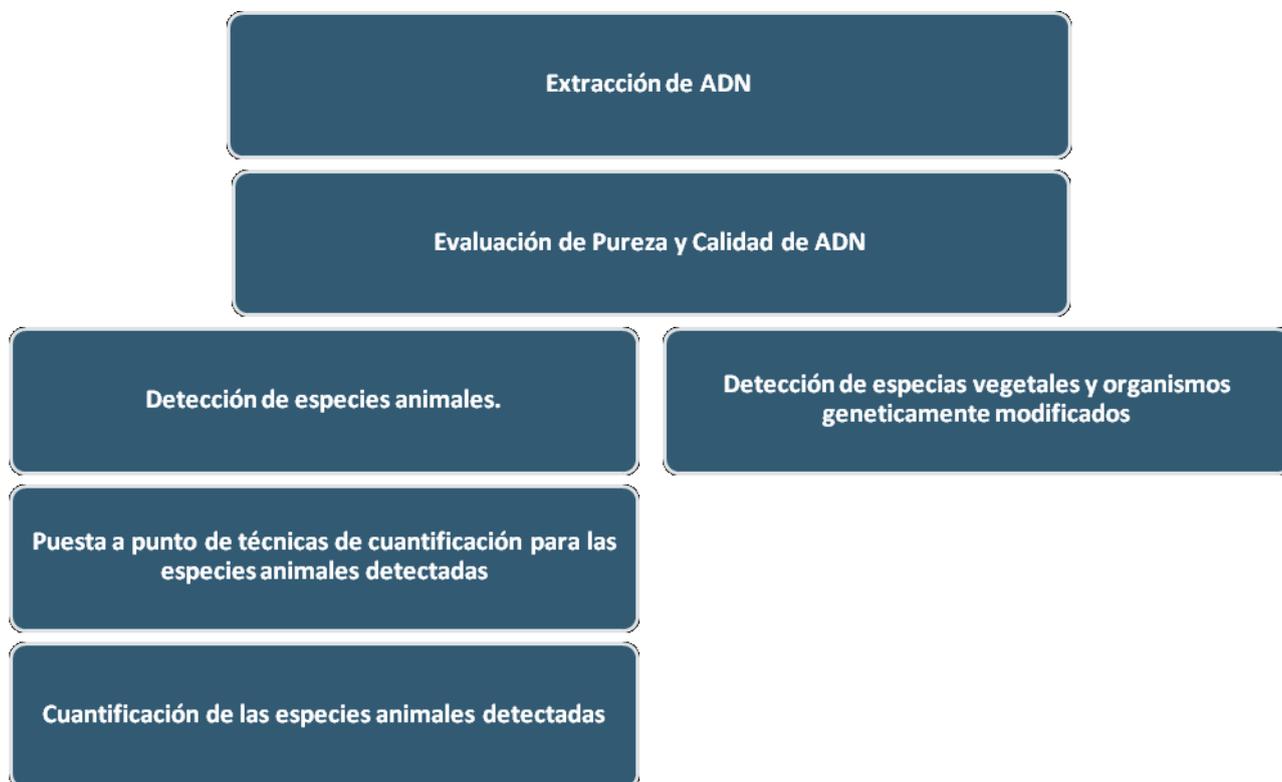
## 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- 1) Extraer ADN de buena calidad de la matriz alimentaria compleja salchicha tipo Viena.
- 2) Emplear técnicas de PCR punto final para detectar especies animales (vaca, cerdo y pollo), y vegetales (maíz y soja) en salchichas tipo Viena
- 3) Emplear técnicas de PCR en punto final para detectar secuencias transgénicas derivadas de vegetales genéticamente modificados en salchichas tipo Viena.
- 4) Poner a punto técnicas de PCR en tiempo real para cuantificar las especies animales vaca, cerdo y pollo en la matriz de estudio.
- 5) Cuantificar por medio de PCR en tiempo real las especies animales encontradas en las Salchichas tipo Viena

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

El esquema general de trabajo se detalla a continuación en la figura 7:



**Figura 7.** Estrategias utilizadas para detección y cuantificación de especies animales (izquierda) y análisis de transgenicidad (derecha).

### *Consideraciones previas: descontaminación del área y materiales de trabajo*

En todos los casos y previo a cada experimento, se descontaminó de ADN el área de trabajo y los materiales a utilizar con hipoclorito de sodio 4%, etanol 70% y realizando un lavado final con H<sub>2</sub>O mRo. Para evitar la contaminación de las muestras en las diferentes etapas del análisis, se utilizaron guantes de nitrilo sin polvo.

También, mediante el uso de luz ultravioleta en la cámara de PCR, se descontaminaron de ADN los materiales y el agua a utilizar en la preparación de la PCR.

Además, se definieron áreas independientes y separadas para realizar las actividades de extracción de ADN, preparación de PCR y electroforesis. De esta manera se minimiza la posibilidad de contaminación cruzada de las muestras.

## 4.1 MUESTRAS Y CONTROLES

Se adquirieron del mercado uruguayo siete Salchichas tipo Viena o Frankfurter de diferentes marcas. Para facilitar la identificación de las muestras las salchichas fueron codificadas como F1, F2, F3, F4, F5, F6 y F7 (Tabla 1). Una vez identificadas, las muestras fueron conservadas en *freezer* a - 20°C hasta su posterior análisis.

Se utilizaron como controles positivos para los análisis de detección de especies animales, ADNs totales obtenidos a partir de carne de vaca, cerdo y pollo, adquiridos en comercios del ramo.

Los controles positivos utilizados para el análisis de detección de especies vegetales maíz, soja y soja transgénica consistieron en ADN genómico extraído de materiales de referencia certificados (MRC) del *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) de la Unión Europea. Dichos controles fueron proporcionados por los tutores de este trabajo, ya que forman parte del banco de ADN del laboratorio.

**Tabla 1.** Se muestran los ingredientes declarados en el envase de cada una de las muestras de salchichas con las que se trabajó.

Muestra	Ingredientes
F1	Carne vacuna, grasa de cerdo, carne de cerdo, sal, proteína de soja, azúcar, especias, emulsionante (INS 450 ii), antioxidante (INS 316), conservador (INS 250).
F2	Carne bovina, carne suina, grasa suina, fécula de mandioca, sal, proteína de soja, azúcar, especias, estabilizantes (INS 452i, INS 450 ii), antioxidante (INS 316), conservante (INS 250).
F3	Carne bovina, carne suina, agua, grasa suina, carne mecánicamente recuperada de bovino, cuero suino, sal, fécula de papa, mondongo, especias, estabilizantes INS 452 ii, antioxidante INS 300, conservante INS 250.
F4	Carne vacuna, agua, carne suina, grasa de cerdo, fécula de mandioca, especias, proteína de soja texturizada, emulsiones de grasa (grasa de cerdo, agua, caseinato de sodio y sal), sal, menudencias vacunas y suinas, estabilizante (INS 452 ii), antioxidante (INS 316), conservantes (INS 251, INS 250).
F5	Frankfurter no envasado.
F6	Carne vacuna, fécula de papa, grasa suina, sal, leche descremada en polvo, estabilizantes: fosfato de sodio y potasio (INS 3399ii y INS452ii), dextrosa, especias, antioxidante: ác. Ascórbico (INS300) y conservante: nitrito de sodio (INS250)
F7	Carne vacuna, grasa de cerdo, fécula de mandioca, proteína de soja, regulador de acidez: lactato de sodio (INS325), sal, azúcar, emulsionante: fosfato de sodio (INS450iii), especias, antioxidante: eritorbato de sodio (INS316), conservante: nitrito de sodio (INS250), colorante: carmín (INS120).

## 4.2 OBTENCIÓN DE ADN

### 4.2.1 Extracción de ADN a partir de Frankfurters.

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante un protocolo rápido y eficaz, muy utilizado en el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria para la extracción de ADN de matrices alimentarias complejas. El método se basó en el método propuesto por Dellaporta *et al.* (1983). Al mismo se le realizó una modificación que consiste en adicionar un paso extra de digestión de proteínas utilizando proteinasa K y una desproteínización empleando cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Esto permite eliminar proteínas presentes en la matriz de trabajo, las que podrían interferir en los siguientes ensayos de análisis de ADN. Como resultado, se aumenta el grado de pureza del ADN que se obtiene.

#### 4.2.1.1 Protocolo Dellaporta modificado.

Se pesaron 100 mg de muestra, la cual se colocó en un mortero de porcelana previamente descontaminado. Allí se le agregó 1 mL de buffer de extracción (compuesto por Tris - HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, SDS 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM) y se procedió a desintegrar la muestra. Después de lograr una mezcla homogénea, se pasó 1 mL del homogenizado a un tubo de 2.0 mL y se agregó 10  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml). Luego se incubó a 65°C por 30 minutos, agitando cada 5 minutos.

A continuación, se añadieron 500  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión enérgica durante 5 minutos y se centrifugó a 12 krpm durante 5 minutos. Posteriormente, se tomó 1 mL de sobrenadante al que le fueron agregados 300  $\mu$ l de ACOK 5M. Para mezclar se invirtió el tubo 5 veces y se procedió a incubar 10 minutos en hielo.

Seguidamente, se centrifugó durante 20 minutos a 12 krpm. Se tomó el sobrenadante (1 ml) y se transfirió a otro tubo en donde se añadió 1 mL de isopropanol frío (i- PrOH). Se invirtió el tubo 10 veces para luego centrifugar 15 minutos a 12 krpm. Se procedió a descartar el sobrenadante. El precipitado se lavó con 400  $\mu$ l de EtOH 70% y se centrifugó por 5 minutos a 12 krpm.

En este punto, se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado en vacuosecador rotatorio (SpeedVac SC100, SAVANT, USA).

Por último, el precipitado se disolvió en 100 µl de H<sub>2</sub>O mQ y se dejó resuspendiendo durante 10 horas en hielo.

#### 4.2.2 Extracción de ADN de los Controles de vaca, cerdo y pollo.

La extracción de ADN para cada control positivo se llevó a cabo mediante un kit comercial siguiendo el protocolo establecido por los fabricantes (*DneasyBlood and Tissue Kit*. Qiagen, Alemania).

### 4.3 Cuantificación y estimación de la pureza del ADN obtenido.

Para determinar la concentración de ADN presente en las extracciones realizadas, se utilizó un espectrofotómetro de microvolúmenes (*Nanodrop ThermoScientific ACTGen 3700*). Mediante este equipo se obtienen los valores de concentración de ADN expresados en µg/ml (considerando que  $A_{260nm} = 1 \text{ OD ADN} = 50 \text{ µg/ml}$ ) y el grado de pureza del mismo dado por la relación  $A_{260}/A_{280}$ . Este cociente permite conocer si hay presencia de proteínas al medir la absorbancia a 280nm, longitud de onda en la que la mayoría de las proteínas presentan un pico de absorción por poseer aminoácidos aromáticos. Se considera que el ADN tiene un grado de pureza satisfactorio, sin presencia de proteínas, si dicha relación es mayor o igual a 1,8.

### 4.4 Detección de especies y análisis de transgenicidad en Frankfurters.

#### 4.4.1 Amplificación de secuencias de ADN animal por PCR en punto final.

Se buscó detectar por PCR en punto final las especies animales *Bos taurus* (vaca), *Sus scrofa* (cerdo) y *Gallus gallus* (pollo). Para ello se eligió como secuencia blanco de amplificación, la secuencia del gen que codifica para el citocromo b (CYTB), presente en el ADN mitocondrial (ADNmit) de todos los animales.

El método utilizado para este fin fue el descrito por Matsunaga (Matsunaga *et al.*, 1999) con modificaciones. Estas consistieron en variar la temperatura de trabajo, la concentración de los cebadores, además de que las reacciones de amplificación para cada especie animal se llevaron a cabo de manera independiente (*uniplex*) y no *multiplex* como se plantea en dicho trabajo.



termociclador *Axygen MaxyGene Gradient*, el cual permite realizar esta variación de temperatura en un mismo ensayo, permitiendo una optimización más rápida y sencilla del ensayo.

Finalizada esta parte, se procedió a amplificar los ADNs presentes en las muestras de chacinados por medio de PCR punto final, haciendo uso del termociclador *Eppendorf Mastercycle personal*.

#### 4.4.1.1.1 Reacción cruzada

Con el fin de asegurar la especificidad de la reacción y evitar falsos positivos, se llevaron a cabo los ensayos de reacción cruzada en las PCRs punto final. Este estudio se efectuó para cada par de cebadores, utilizando los controles positivos de las especies animales implicadas.

#### 4.4.1.2 Análisis de las muestras de Frankfurters

Para cada muestra de Frankfurter se buscó por PCR en punto final la presencia de *Bos taurus* (vaca), *Sus scrofa* (cerdo) y *Gallus gallus* (pollo), utilizando el protocolo descrito y puesto a punto anteriormente. Todas las muestras se ensayaron por duplicado, empleando en todos los casos los controles positivos conteniendo la secuencia blanco de cada especie animal y negativos (sin ADN).

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, cuya mezcla contenía: 100 ng de ADN, 2,5  $\mu$ L de buffer 10X, 1,25  $\mu$ L  $MgCl_2$  50 mM, 1  $\mu$ L de cada cebador 10 mM, 0,25  $\mu$ L dNTPs 10 mM, 0,25  $\mu$ L Taq ADN polimerasa HybriPol (Bioline) y agua csp. 25  $\mu$ L.

El termociclador (*Eppendorf Mastercycle personal*) se programó para realizar 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 33 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de hibridación específica de cada especie animal (vaca: 65°C, cerdo: 64°C y pollo: 63°C) y 30 segundos a 72°C. Por último, una extensión final de 7 minutos a 72°C.

#### 4.4.2 Amplificación de especies vegetales por PCR en punto final.

Las especies vegetales que se buscaron detectar fueron *Zea mays* (maíz) y *Glycine max* (soja). Para esto, se realizaron ensayos por duplicado de PCR en punto final dirigiendo la búsqueda a secuencias génicas específicas de cada una de estas especies. En conjunto con las muestras, se

emplearon controles positivos de cada especie vegetal (ADN genómico extraído de materiales de referencia certificados) y controles negativos (sin ADN).

Para detectar la especie maíz se amplificó la secuencia correspondiente al grupo de proteínas de alta movilidad (*hmgA*), y para detectar la especie soja, una región conservada del gen de lectina de soja (Le1). Los cebadores utilizados fueron obtenidos del “*Compendium of Reference Methods for GMO analysis*” del Joint Research Centre de la Unión Europea (Bonfini *et al.*, 2012). Los amplicones característicos poseen una longitud de 74 pb para soja y 79 pb para maíz. (JRC referent report - Europe, 2011).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL conteniendo: 100 ng de ADN genómico, 2,5 µL de buffer 10X, 1,25 µL MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µL de cada cebador 10 mM, 0,25 µL dNTPs 10 mM, 0,15 µL Taq ADN polimerasa Immolase (Bioline) y agua csp. 25 µL.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (*Eppendorf Mastercycle personal*) que se programó para realizar una desnaturalización inicial a 94° por 4 minutos, seguida de 33 ciclos: 94° por 30 segundos, 62° por 30 segundos y 72° por 30 segundos. Finalmente, un ciclo de extensión a 72° por 7 minutos.

#### 4.4.3 Análisis de transgenicidad por PCR en punto final

Se propuso determinar si las especies vegetales presentes en la matriz de estudio derivaban de organismos genéticamente modificados.

Para ello, se realizó una primera etapa de rastreo de transgenes por PCR en punto final, buscando detectar secuencias comunes a la mayoría de los eventos transgénicos liberados: la secuencia 35S del promotor del mosaico del coliflor (p35S) y la del terminador del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (t-nos) (Barbau-Piednoir *et al.*, 2010). Los cebadores utilizados para detectar estas secuencias son los descritos en el *Compendium of Reference Methods for GMO analysis* (J.R.C.) y materiales de Referencia Certificados del IRMM. El amplicón esperado para la secuencia de 35S es de 82 pb y para la secuencia de T-nos de 84 pb.

Posteriormente, se realizó un ensayo de PCR punto final por un método específico de construcción para identificar el/los eventos de soja que podían estar implicados. Se optó por

buscar el evento MON 40-3-2 (Soja RR), por tratarse de la variedad de soja mayormente cultivada en Uruguay (ISAAA, 2016). Para la identificación de este evento, se utilizaron los cebadores CTP4 y 35S descritos en el JRC, con los que se obtiene un amplicón de 74 pb.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, cuya mezcla contenía: 100 ng de ADN, 2,5  $\mu$ L de buffer 10X, 1,25  $\mu$ L  $MgCl_2$  50 mM, 1  $\mu$ L de cada cebador 10 mM, 0,25  $\mu$ L dNTPs 10 mM, 0,25  $\mu$ L Taq ADN polimerasa Immolase (Bioline) y agua csp. 25  $\mu$ L.

El programa de ciclado consistió de una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C por, 30 segundos a 72°C, y una última extensión por 7 minutos de 72°C.

#### 4.4.4 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.

La visualización de los amplicones obtenidos por los ensayos de PCR punto final (especies animales, vegetales y transgénicos), se realizó por medio de geles de poliacrilamida 12%. Para la construcción de los geles, se utilizaron 7 mL de acrilamida 12%, 7  $\mu$ L de TEMED, y 70 $\mu$ L de persulfato de amonio 10% y se usó como buffer de corrida TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8.0). Para el revelado se utilizó la técnica de tinción de plata que permite detectar hasta 1 ng de ADN presente (Sanguinetti *et al.*, 1994).

#### 4.4.5 Confirmación de la identidad de las especies por técnica de secuenciación

Con el fin de confirmar la identidad de las especies analizadas por PCR en punto final, se seleccionaron muestras para secuenciar. Las muestras elegidas fueron las que en los ensayos de electroforesis presentaron fragmentos del tamaño esperado para vaca, cerdo, soja y soja GM. Además de estas, se seleccionó una muestra en la que se obtuvo una banda tenue que, de acuerdo con su peso molecular, correspondería a la especie pollo, la cual también fue secuenciada para descartar/confirmar su presencia en la matriz de estudio. Todas las muestras fueron secuenciadas por MACROGEN (Corea).

Luego, se procedió a mejorar la calidad de las secuencias utilizando el programa Chromas 2.6.4 (Technelysium Pty Ltd). Para esto se partió de los cromatogramas en los que se eliminaron las

primeras y últimas bases y se hizo una limpieza de modo que cada pico distinguible coincidiera con la base correspondiente. Las secuencias así obtenidas fueron alineadas con secuencias de referencia de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando el programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) para evaluar su concordancia con estas últimas.

## 4.5 Cuantificación de especies animales en la matriz de estudio.

### 4.5.1 Cuantificación de especies animales por PCR en tiempo real (qPCR).

Se utilizaron dos estrategias independientes para cuantificar las diferentes especies animales presentes en las salchichas: Primero, por medio de kits comerciales validados y segundo, usando como guía el protocolo de López-Andreo (López-Andreo *et al.*, 2005).

#### 4.5.1.1 Estrategia 1) Empleo de kit comercial validado RAPIDFINDER™ ID kit.

Se basó en el empleo de kits comerciales validados de la línea RAPIDFINDER™ ID kit de Life Technologies, que permiten detectar y cuantificar una variedad de especies animales por medio de la técnica de qPCR. Se optó por realizar el análisis de vaca, por tratarse de una especie que se declara en la etiqueta de la matriz de estudio, y de pollo, considerándolo como un posible adulterante de productos cárnicos.

La detección se realizó utilizando los kits específicos de especie (RAPIDFINDER™ Beef ID kit para vaca y RAPIDFINDER™ Chicken ID kit para pollo), mientras que la cuantificación se hizo combinando el kit específico de especie junto al RAPIDFINDER™ Quant Multi Meat ID kit, el que permite determinar el porcentaje de la especie animal en cuestión respecto al total de carne presente en la muestra.

Todos los ensayos se realizaron siguiendo las especificaciones del fabricante para determinar, en primera instancia, la presencia/ausencia de las especies animales vaca y pollo y, como segunda parte, cuantificar el porcentaje de pollo presente en la matriz de estudio, utilizando el kit para detección de pollo en combinación con el RAPIDFINDER™ Quant Multi Meat ID kit.

#### 4.5.1.2 Estrategia 2) Uso de protocolo descrito en la bibliografía

Consistió en usar como guía el protocolo propuesto por López-Andreo (López-Andreo *et al.*, 2005) que permite la detección y cuantificación de especies animales en mezclas de estas por medio de PCR en Tiempo Real.

El método utiliza cebadores específicos para secuencias de ADN mitocondriales de cada especie animal y el agente intercalante SYBR Green como química de generación de fluorescencia. Además, usa cebadores dirigidos a la secuencia del gen nuclear 18S de ARNr que se encuentra presente en todos los organismos eucariotas (Lopez-Andreo *et al.*, 2005) y actúa como normalizador de los valores de cantidades obtenidos para cada especie.

##### 4.5.1.2.1 Estudio de la especificidad de los cebadores

Previo a los análisis de las muestras de Frankfurter, se estudió la especificidad de los cebadores propuestos por Lopez-Andreo *et al.* (2005). Para esto, se ensayaron por medio de PCR en Tiempo Real los controles positivos de las especies animales con cada par de cebadores, usando SYBR Green y el ciclado detallado en el protocolo. A continuación, se analizaron las curvas de disociación para comprobar la obtención de picos únicos para cada par de cebadores.

##### 4.5.1.2.2 Construcción de las curvas de cuantificación

Se realizaron diluciones seriadas de controles positivos con concentraciones conocidas para las tres especies animales (vaca, cerdo y pollo) y a partir de estas se construyeron dos curvas estándar: una curva para la especie en cuestión y una segunda curva para el gen nuclear 18S. Las cantidades de ADN control utilizadas para generar dichas curvas estándar fueron de 100 ng, 25 ng, 6,25 ng, 1,56 ng, 0,39 ng, 0,0976 ng.

A continuación, se construyeron los gráficos de ciclo umbral (Ct) de las diluciones estándar versus el logaritmo de las concentraciones de estas mismas muestras, y se calcularon la eficiencia de amplificación para cada secuencia. Considerando los Cts que presentó cada muestra, se interpolaron en la curva estándar especie específica y del gen normalizador 18S, para obtener los valores iniciales en nanogramos de cada secuencia de ADN detectada. Finalmente, el contenido de cada especie en cada muestra se obtuvo al normalizar los valores, utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{Cantidad ADN especie específico})}{(\text{Cantidad ADN 18S ó Cantidad ADN TOTAL amplificable})} \times 100 = \% \text{ especie presente en la muestra} \quad (4)$$

#### 4.5.1.2.3 Cuantificación de las muestras de Frankfurters

Se buscó cuantificar en cada muestra de Frankfurter las especies animales vaca, cerdo y pollo mediante la técnica de PCR en Tiempo Real, utilizando el protocolo descrito y puesto a punto previamente. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado y utilizando los controles positivos y negativos necesarios.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ , conteniendo 12,5  $\mu\text{l}$  de SYBR Green MasterMix, 0,75  $\mu\text{l}$  300 nM de cada cebador, 2  $\mu\text{l}$  de ADN y 9  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , utilizando concentraciones de 50 ng/ $\mu\text{l}$  para las muestras de salchicha.

Los ensayos de cuantificación se llevaron a cabo en el equipo para PCR en Tiempo Real 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), el cual se programó para una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C y un ciclado de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 55°C durante 40 ciclos.

Para el análisis de datos, los parámetros de línea de base y umbral de fluorescencia (*threshold*) fueron calculados automáticamente por el equipo de PCR Real Time, con excepción de algunos casos en los que se hizo un ajuste manual.

Así, para cada muestra se registraron los Ct, correspondiente al ciclo en que la fluorescencia del SYBR Green supera el valor umbral, y el análisis de la curva de disociación para asegurar que la señal obtenida correspondía a la secuencia de interés y no a productos de amplificación no específicos y/o dímeros de cebadores.

#### 4.5.1.3 Alternativa a la Estrategia 2 de cuantificación: curva estándar generada con la matriz salchicha.

Se llevó a cabo un ensayo adicional en el que se realizó la curva estándar con muestras de una de las matrices salchicha, en lugar de controles positivos de las especies animales. Con esto se intentó considerar en la cuantificación el efecto matriz, teniendo en cuenta las características de

dicha matriz y los procesos de producción asociados a esta. Las diluciones, como en el caso anterior de cuantificación fueron de 100 ng, 25 ng, 6,25 ng, 1,56 ng, 0,39 ng, 0,0976 ng.

A partir de la nueva curva de calibración se optimizó una nueva forma de realizar los cálculos de cuantificación, en la que se tuviera en cuenta la diferencia en el número de copias de ADN mitocondrial de las secuencias diana de vaca y cerdo, y con la que luego se realizarían los cálculos de cuantificación. Esta ecuación fue extraída del trabajo de Lopez-Andreo *et al.* (2012), como sigue.

Para el cálculo alternativo de los porcentajes se consideró una diferencia arbitraria entre el número de copias de las dos especies animales, vaca y cerdo. Este parámetro D, se define como la cantidad de ciclos que deben agregarse al Ct experimental obtenido para cerdo que al interpolarlo en la curva estándar correspondiente permita obtener la misma cantidad de ADN detectado para vaca en la muestra 50:50. Considerando que en la mezcla se tienen iguales cantidades de vaca y cerdo y que la ecuación de la curva estándar es  $Ct = m \log N + b$  (5), se tiene que:

$$\frac{Ct_{vaca\ 50} - b_{vaca}}{m_{vaca}} = \frac{Ct_{cerdo\ 50} + b_{cerdo} + D}{m_{cerdo}} \quad (6)$$

Por lo tanto, D se puede determinar según:

$$D = m_{cerdo} \left( \frac{Ct_{vaca\ 50} - b_{vaca}}{m_{vaca}} \right) + b_{cerdo} - Ct_{cerdo\ 50} \quad (7)$$

La siguiente ecuación considera el valor D para hacer el cálculo de la cantidad de cerdo:

$$N_{cerdo} = 10^{\left( \frac{Ct - b_{cerdo} + D}{m_{cerdo}} \right)} \quad (8)$$

Finalmente, los porcentajes de vaca y cerdo se calcularon como:

$$\% \text{ cerdo} = \frac{N_{cerdo}}{(N_{cerdo} + N_{vaca})} \quad (9) \quad \% \text{ vaca} = \frac{N_{vaca}}{(N_{cerdo} + N_{vaca})} \quad (10)$$

en donde  $N_{vaca}$  es la cantidad de vaca en nanogramos obtenida directamente al intrapolar en la curva estándar de esta especie animal. La muestra 50:50 de vaca y cerdo que permite realizar este cálculo se obtuvo mezclando iguales cantidades de tejido muscular de cada especie animal, previa desintegración de los tejidos y homogeneizado. De esta muestra generada se procedió a extraer el ADN utilizando el kit de extracción de ADN *DneasyBlood and Tissue Kit* (Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Extracción y cuantificación de ADN.

Luego de extraído el ADN de las salchichas y de los controles, se procedió a su cuantificación y estimación de la pureza. En las **tablas 3 y 4** se exponen los valores de concentración e índice de pureza obtenidos por espectrofotometría para las extracciones de ADN de las muestras y los controles, respectivamente. Los valores corresponden, en todos los casos, a un promedio de medidas independientes.

**Tabla 3.** Medidas de concentración y pureza de ADN de las muestras de Frankfurters (numerados como F1 a F7) obtenidos con *Nanodrop ThermoScientific ACTGen 3700*. Se considera que el ADN es puro si se obtiene un valor de  $A_{260}/A_{280}$  igual o superior a 1.8.

MUESTRAS	$A_{260}$	$A_{260}/A_{280}$	Concentración ng/ $\mu$ l
F1	5,5	2,02	280
F2	3,79	2,01	190
F3	1,4	1,94	70
F4	4,75	1,95	240
F5	7,18	1,96	360
F6	8,31	2,04	415
F7	8,24	2,01	410

En la **Tabla 3** se pueden observar los valores de concentración de ADN y pureza estimada de las muestras obtenidas por el método de extracción de Dellaporta *et al.* (1983) modificado, a partir de Frankfurters. Tal como se mencionó anteriormente, este método ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio, obteniéndose muy buenos resultados. Este caso no es la excepción, obteniéndose concentraciones de ADN de las muestras problema que varían de 190ng/ml a 415 ng/ml. Únicamente la muestra F3 presentó un valor bajo de concentración comparada con las demás, siendo este de 70 ng/ml. Esto pudo deberse al proceso de producción del alimento, en el que el ADN presente puede sufrir degradación como consecuencia de las diferentes etapas de procesamiento y altas temperaturas (Ver protocolo producción FAO, sección 1.4.1).

Estos valores de concentración resultaron óptimos para la utilización de estas muestras en ensayos posteriores de PCR punto final, en donde la concentración de ADN adecuada para la

reacción es de 100 ng/ul. Asimismo, para la PCR cuantitativa, los valores convenientes para las muestras son de 50 ng/ml, por lo que en este caso resultaron aún más satisfactorios.

Los valores de pureza obtenidos para las muestras de Frankfurters fueron desde 1,96 a 2,04. Teniendo en cuenta que el ADN se considera puro cuando la relación  $A_{260}/A_{280}$  es mayor o igual a 1,8, se puede afirmar que todas las muestras presentaron un alto grado de pureza, lo que permite esperar que no haya contaminantes que interfieran en ensayos posteriores a realizar con las mismas.

Tanto los resultados de concentración como los de pureza obtenidos, permiten demostrar, una vez más, la gran utilidad del método Dellaporta *et al.* (1983) de extracción de ADN, en este caso específico, para la matriz Frankfurter.

**Tabla 4.** Medidas de concentración y pureza de ADN de las muestras controles de las especies animales vaca (CV), cerdo (CC) y pollo (BV) obtenidos con *NanodropThermoScientificACTGen 3700*. Se considera que el ADN es puro si se obtiene un valor de  $A_{260}/A_{280}$  igual o superior a 1,8.

CONTROLES POSITIVOS	$A_{260}$	$A_{260}/A_{280}$	Concentración ng/ $\mu$ l
CV	1,82	2,083	105
CC1	12,5	2,06	630
CC2	10,4	2,01	520
BV	4,93	1,24	250

La **Tabla 4** muestra las concentraciones y los grados de pureza de los controles de las especies vaca, cerdo y pollo (obtenidos a partir de tejido muscular de estas especies) utilizando el kit *DneasyBlood and Tissue Kit* (Qiagen, Germany).

Los controles positivos para cada especie animal tuvieron resultados de concentración similares a los de las muestras de Frankfurter. El rango de concentraciones fue de 105 a 630 ng/ul. A su vez, para los tres primeros controles, las purzas tuvieron un valor de cociente de 2, resultando aptas para utilizar en los ensayos posteriores.

Por otro lado, la muestra BV correspondiente al control de pollo, fue la que mostró menor valor de pureza, siendo este de 1,24. Esto es indicativo de la presencia de contaminantes que se extrajeron junto con el ADN de interés y debe ser considerado en los ensayos a seguir, para evaluar si la presencia de estas proteínas afecta en forma negativa los resultados.

## 5.2 Detección de especies y análisis de transgenicidad en Frankfurters

### 5.2.1 Amplificación de secuencias de ADN animal por PCR en punto final.

#### 5.2.1.1 Puesta a punto de la técnica

Utilizando la técnica de PCR en gradiente, se logró ajustar y determinar la temperatura de hibridación adecuada para cada par de cebadores. Se utilizaron como temperaturas de partida las establecidas en el protocolo de Matsunaga de 60°C (Matsunaga *et al.*, 1999) y luego se modificaron para obtener mejores resultados, teniendo en cuenta que el aumento de temperatura mejora la especificidad de la hibridación de los cebadores con la secuencia diana y viceversa. Las temperaturas finales para cada especie animal y el amplicón generado en cada caso, se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Temperatura de hibridación para cada par de cebadores, la especie que se detecta y el número de pares de base de los productos de PCR generados.

Cebadores (Directo/Reverso)	Especie blanco	Temperatura de hibridación	Producto de amplificación
Fsim/RK	Vaca	65°C	274 pb
Fsim/RP	Cerdo	64°C	398 pb
Fsim/RC	Pollo	62°C	227 pb

##### 5.2.1.1.1 Reacción cruzada

Previo al análisis de la matriz de trabajo, se llevaron a cabo los estudios de reacción cruzada. Para esto se utilizaron los controles de vaca, cerdo y pollo y se evaluó, para cada par de cebadores, la amplificación de estas tres especies animales.

Los resultados del ensayo de electroforesis mostraron, en cada caso, una única banda correspondiente a la especie animal que se buscaba amplificar y ausencia de banda de las dos especies restantes (Figura no mostrada). Esto permitió corroborar que los cebadores específicos de especie propuestos por Matsunaga (Matsunaga *et al.*, 1999) logran amplificar de forma específica las secuencias de las especies animales vaca, cerdo y pollo.

##### 5.2.1.2 Análisis de las muestras de Frankfurters

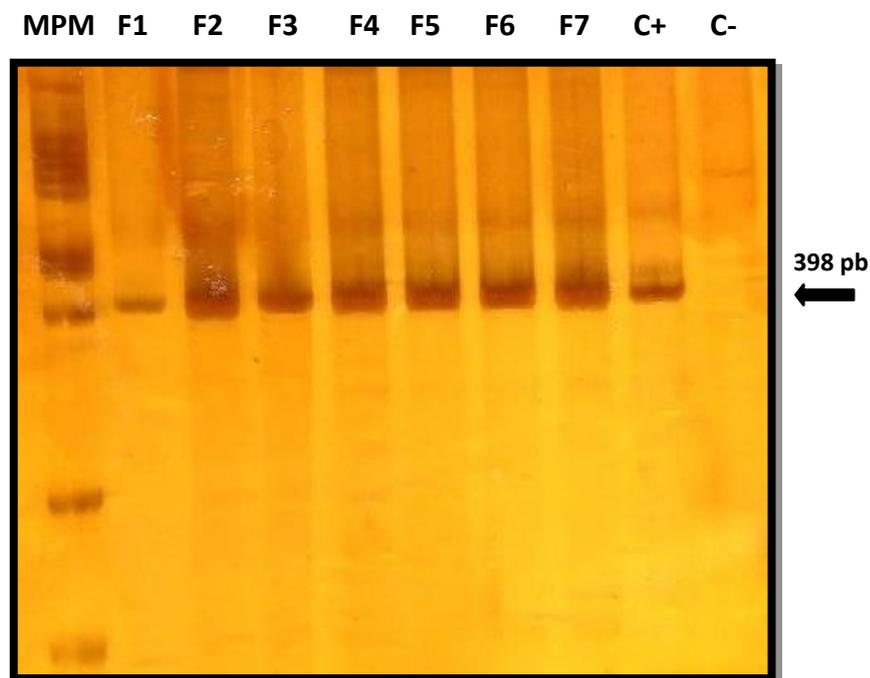
En esta etapa, se buscó determinar la presencia/ausencia de las especies vaca, cerdo y pollo en las siete muestras de salchichas. En todos los casos, se efectuaron amplificaciones utilizando los

cebadores descritos por Matsunaga *et. al.* (1999) para cada especie (Fsim/RK para vaca, Fsim/RP para cerdo y Fsim/RC para pollo) con un análisis posterior de electroforesis para visualizar el resultado de los ensayos.

En primer lugar, para el análisis de presencia de vaca en Frankfurters (resultados no mostrados), se evaluaron los resultados de los controles positivo y negativo. El control positivo mostró una banda de aproximadamente 274 pb, correspondiente al peso molecular del amplicón esperado para vaca de la secuencia de ADN mitocondrial. El control negativo (sin ADN) no presentó ninguna banda. Estos resultados coincidieron con lo esperado y permitieron validar el ensayo.

Respecto a las muestras de Frankfurter, se tuvo que todas presentaron bandas de igual peso molecular que el control positivo, de 274 pb aproximadamente. Se puede afirmar, por lo tanto, que la especie animal vaca estaría presente en todas ellas, tal como lo establecen las etiquetas de todas las muestras envasadas con las que se trabajó.

En segundo lugar, se llevó a cabo la determinación de cerdo en la matriz. Los resultados se observan en la **Figura 9**



**Figura 9.** Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR punto final con cebadores F-SIM y R-P para detección de cerdo. **1:** MPM Ladder 100 pb. **2:** muestra F1. **3:** muestra F2. **4:** muestra F3. **5:** muestra F4. **6:** muestra F5. **7:** muestra F6. **8:** muestra F7. **9:** ADN control de cerdo. **10:** control negativo de PCR (sin ADN).

Los controles para la detección de cerdo tuvieron los resultados esperados, con una banda de aproximadamente 398 pb en el carril 9 donde se sembró el control positivo y ausencia de banda en el carril 10 correspondiente al control negativo (sin ADN). Esto permite validar los resultados de las muestras problema para este ensayo.

Se puede observar en todos los carriles correspondientes a las muestras de Frankfurter (Carriles 2 al 8), una banda de igual peso molecular a la obtenida en el control positivo de cerdo, de 398 pb aproximadamente. Esto evidencia la presencia de esta especie animal en todas las muestras analizadas, lo que a su vez coincide con lo declarado en la etiqueta de estos productos. La muestra F1 (Carril 2) presentó una banda de menor intensidad que el resto de las muestras, pero que al compararla con la del control positivo resulta apenas menos intensa, por lo que es posible afirmar que es positiva para la presencia de cerdo.

Como última especie animal, se procedió a buscar pollo en las muestras de Frankfurter obteniendo los resultados que aparecen en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR punto final con cebadores F-SIM y R-C para detección de pollo. **1:** MPM *Ladder 100 pb*. **2:** muestra F1. **3:** muestra F2. **4:** muestra F3. **5:** muestra F4. **6:** muestra F5. **7:** muestra F6. **8:** muestra F7. **9:** ADN control de pollo. **10:** control negativo de PCR (sin ADN).

En primer lugar, se visualiza en el control positivo de pollo, una banda de aproximadamente 227 pb que coincide con el peso molecular del amplicón característico buscado para esta especie.

Por otro lado, no hubo presencia de banda en el control negativo (sin ADN). Al validar el ensayo con estos resultados, se procedió a analizar las muestras de salchicha.

De estas últimas, se tienen que las de los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8, no presentaron ninguna banda coincidente con el control positivo de pollo (227 pb). En la muestra del carril 2, por otro lado, se observa una banda de igual peso molecular pero de menor intensidad que el control positivo. Esto sería indicativo de la presencia de pollo en la muestra, pero dado la baja intensidad de la banda, fue necesario realizar otros ensayos para poder confirmar/descartar este resultado. Si de hecho la muestra del carril 2 contuviera pollo, se podría deber a una adulteración del alimento o a una contaminación por trazas, debido a que esta especie animal no se encuentra declarada en ninguna de las etiquetadas de los productos envasados analizados.

Además de las mencionadas, se obtuvieron una serie de bandas inespecíficas: una de estas en el carril 5 de peso molecular aproximado de 250 pb de acuerdo con el MPM y en los carriles 2, 3, 5, 7 y 8 otra banda de mayor peso molecular de 500 pb aproximadamente. La aparición de estas bandas de diferente peso molecular al de la banda de pollo esperada, indica que la reacción de PCR no fue específica. Para mejorar los ensayos, sería interesante mejorar las condiciones de reacción para esta especie animal en esta matriz de estudio en el futuro (por ejemplo, aumentar la temperatura de hibridación de los cebadores) para generar resultados óptimos al detectar pollo. Se podría evaluar también el par de cebadores utilizados ya que podrían no haber sido específicos para la especie en cuestión, de forma de mejorar su diseño para lograr un producto de PCR más específico. Con esto, se podría mejorar la sensibilidad del ensayo, evitando resultados ambiguos y la necesidad de realizar técnicas adicionales para poder informar el resultado con certeza.

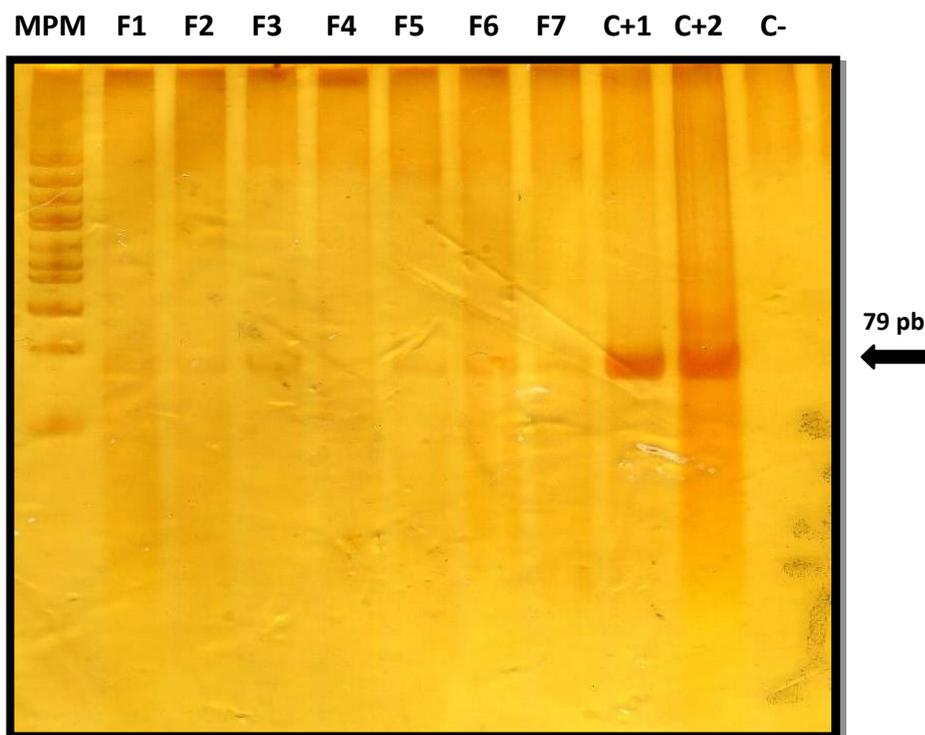
Todas las marcas de Frankfurter envasadas y analizadas, indicaban en su etiqueta la presencia de vaca y cerdo como únicas especies animales con las cuales se habría elaborado el alimento. Los ensayos realizados corroboran esta información al haberse detectado ambas especies en todas las muestras. En lo que respecta a la especie pollo, fue necesario continuar con el análisis para corroborar o descartar su presencia en la muestra dudosa (F1), por lo que se procedió a secuenciar los productos de amplificación de la misma. Además, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real por ser más sensibles y por permitir obtener medidas cuantitativas, para en caso de que estuviera presente, poder distinguir entre una contaminación o una adulteración del alimento usando los criterios de >1% recomendados por la Unión Europea.

**Tabla 6.** Resultado del análisis de la búsqueda de vaca, cerdo, pollo en salchichas tipo Viena. “SI” se detectó, “NO” no se detectó, “NC” no concluyente.

Muestras	Especie declarada	Especie encontrada		
		Vaca	Cerdo	Pollo
F1	Vaca y cerdo	SI	SI	NC
F2	Vaca y cerdo	SI	SI	NO
F3	Vaca y cerdo	SI	SI	NO
F4	Vaca y cerdo	SI	SI	NO
F5	Vaca y cerdo	SI	SI	NO
F6	Vaca y cerdo	SI	SI	NO
F7	Vaca y cerdo	SI	SI	NO

### 5.2.2 Amplificación de especies vegetales por PCR en punto final.

Como primer paso en la detección de especies vegetales en la matriz de estudio, se procedió a buscar la secuencia de maíz del grupo de proteínas de alta movilidad (HMGA), usando los cebadores HMGA-F y HMGA-R del “*Compendium of Reference Methods for GMO analysis*” del *Joint Research Centre* de la Unión Europea. Los resultados se pueden observar en la **Figura 11**.



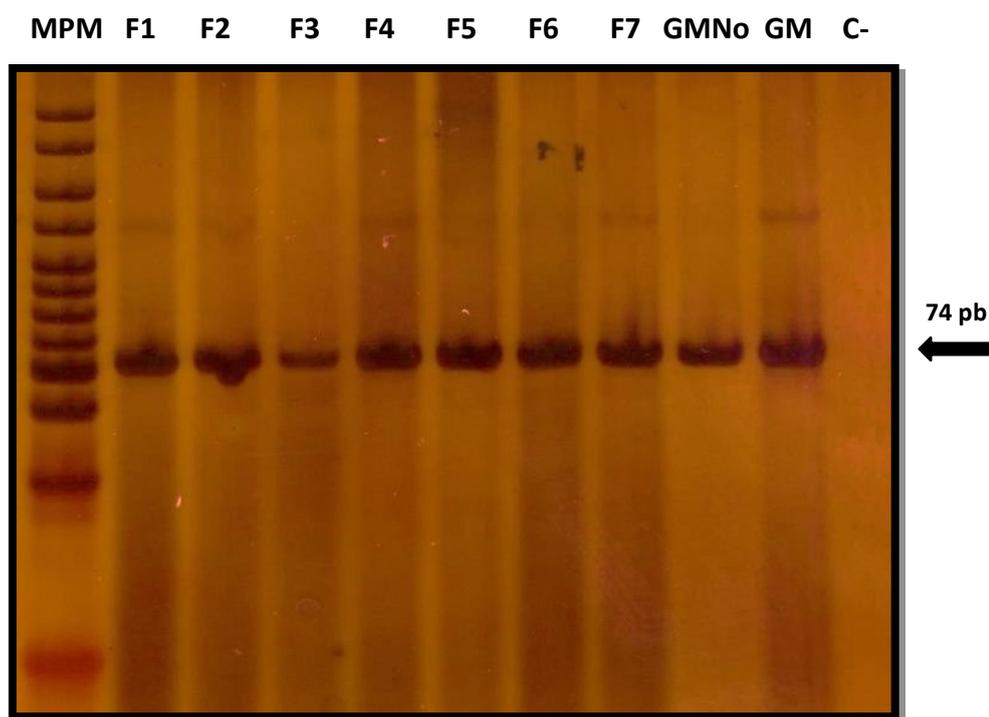
**Figura 11.** Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR punto final con cebadores HMGA-F Y HMGA-R para detección de maíz. **1:** MPM *Ladder 50 pb*. **2:** muestra F1. **3:** muestra F2. **4:** muestra F3. **5:** muestra F4. **6:** muestra F5. **7:** muestra F6. **8:** muestra F7. **9:** ADN control de maíz. **10:** ADN segundo control de maíz. **11:** control negativo de PCR (sin ADN).

Tal como se observa en la **Figura 11**, ambos controles positivos de maíz presentaron una banda de aproximadamente 79 pb que es el peso molecular característico del amplicón de maíz buscado. Además, se tuvo ausencia de esta banda en el control negativo (sin ADN). Estos resultados concuerdan con lo esperado y validan el ensayo.

En las muestras de la matriz de estudio (carriles 2 al 8), se visualiza en todos los casos una banda tenue que coincide con el peso molecular de las bandas de los controles positivos de maíz. La baja intensidad de estas bandas en comparación con el control positivo, permiten categorizar estos resultados como negativos para la secuencia diana de maíz. Lo obtenido concuerda con lo establecido en las etiquetas de las siete marcas de Frankfurter envasadas con las que se trabajó.

Cabe destacar que, al resultar negativas todas las muestras, no se continuó con el análisis de transgenicidad de esta especie vegetal en la matriz de estudio.

En segundo lugar, se buscó la especie vegetal soja (*Glycine max*) en los Frankfurters utilizando los cebadores para la secuencia conservada del gen de lectina de soja (Le1-F y Le1-R) del “Compendium of Reference Methods for GMO analysis” del Joint Research Centre de la Unión Europea. Los resultados obtenidos se exponen en la **Figura 12**.



**Figura 12.** Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR punto final con cebadores Le1-F y Le1-R para detección de soja. **1:** MPM *Ladder* 25 pb. **2:** muestra F1. **3:** muestra F2. **4:** muestra F3. **5:** muestra F4. **6:** muestra F5. **7:** muestra F6. **8:** muestra F7. **9:** ADN control de soja GM. **10:** ADN control de soja no GM. **11:** control negativo de PCR (sinADN).

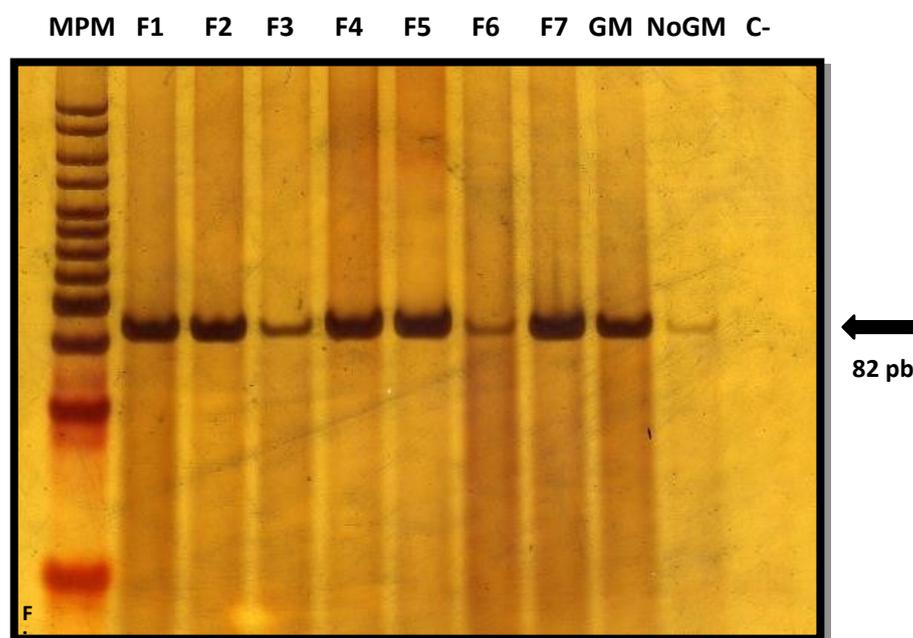
Ambos controles positivos (Soja GM y soja no GM) presentaron una banda de aproximadamente 74 pb que coincide con el peso molecular del producto de amplificación de soja buscado. En cambio, el control negativo no presentó ninguna banda. Esto validó el ensayo por lo que se procedió a evaluar a las muestras de la matriz de trabajo.

Las siete muestras de salchicha presentaron una banda de igual peso molecular que los controles positivos de soja, indicando en todas estas la presencia de soja. La muestra F3 mostró una menor intensidad de banda que los controles positivos y muestras restantes. Según la información presente en las muestras envasadas, F1, F2, F4 y F7 contendrían soja, lo que

coincide con estos resultados. Por el contrario, las muestras F3 y F6 no declaran contener soja, en oposición a lo que se obtuvo en este ensayo. Se debe agregar que, si bien la marca F3 no declaró la presencia de soja, contiene (como se ve en la **tabla 1**) aditivos alimentarios, los cuales pueden provenir de vegetales, tal como la soja (<http://www.aditivos-alimentarios.com/search?q=ins300>). Esto último también es válido para la muestra F6. Para lograr un resultado concluyente y confirmar que no hay proteína de soja agregada en estas dos muestras, se debería repetir el ensayo y, además, realizar la cuantificación por PCR Tiempo Real (por ser una técnica más sensible) de esta especie vegetal en ambas muestras.

### 5.2.3 Análisis de transgenicidad por PCR en punto final

El análisis de transgenicidad a nivel de rastreo de la soja encontrada en las muestras de Frankfurter, se llevó a cabo mediante una amplificación por PCR en punto final, usando cebadores dirigidos a la secuencia del promotor del virus del mosaico de coliflor (35S-F y 35S-R), muy común en la mayoría de los eventos transgénicos. Los resultados se muestran en la **Figura 13**.

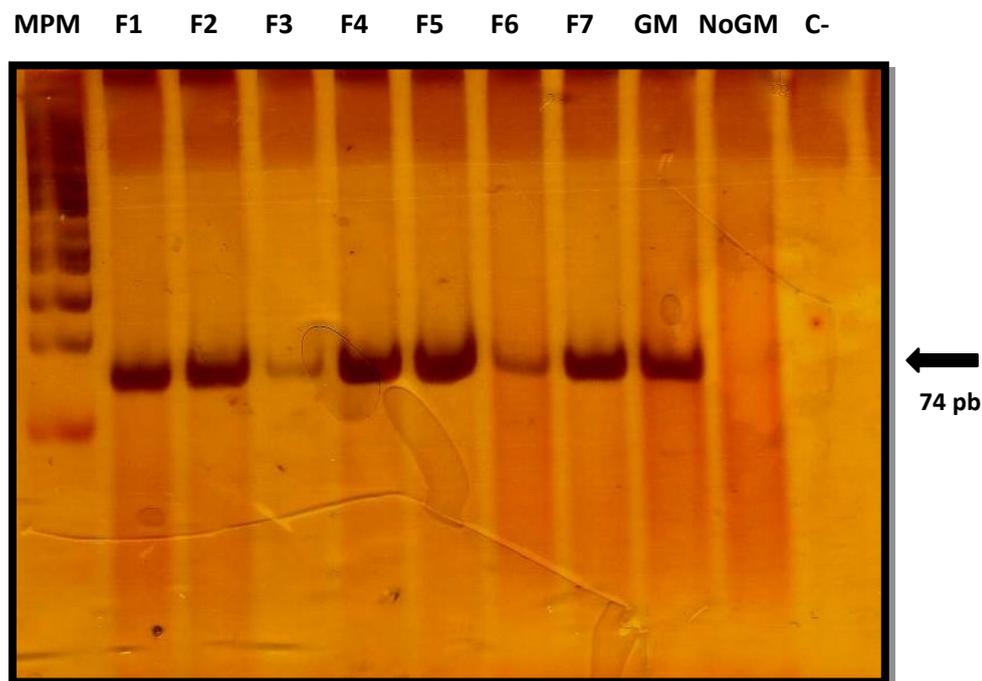


**Figura 13.** Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR punto final con cebadores 35S-F y 35S-R para detección de soja genéticamente modificada. **1:** MPM Ladder 50 pb. **2:** muestra F1. **3:** muestra F2. **4:** muestra F3. **5:** muestra F4. **6:** muestra F5. **7:** muestra F6. **8:** muestra F7. **9:** ADN control de soja GM. **10:** ADN control negativo (Soja no GM). **11:** control negativo de PCR (sin ADN).

En la imagen se tiene que el control positivo de soja GM presentó una única banda de aproximadamente 82 pares de bases. El control negativo de PCR no tuvo ninguna banda, mientras que el control de soja no GM evidenció una banda apenas visible de igual peso molecular que el control positivo de esta especie vegetal.

Respecto a las muestras, se observa que F1, F2, F4, F5 y F7 presentaron una banda de igual peso molecular que el control positivo de soja GM, aproximadamente de 82 pb, denotando que la soja que presentan estas muestras sería de tipo transgénica. Por otro lado, las muestras F3 y F6, también mostraron bandas de muy baja intensidad comparadas con el control positivo, pero similares a la obtenida en el control negativo de soja no GM, con lo cual no se podría concluir respecto a si tiene como ingrediente soja transgénica.

Para el análisis de transgenicidad a nivel de construcción, se realizó una amplificación por PCR en punto final, usando los cebadores CTP4 y 35Soy, específicos para el evento transgénico Mon-40-3-2 en soja. Los resultados obtenidos se visualizan en la **Figura 14**.



**Figura 14.** Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR punto final con cebadores CTP4 y 35SOY para detección de soja genéticamente modificada, correspondiente al evento MON 40-3-2 (Soja RR). 1: MPM *Ladder 50 pb*. 2: muestra F1. 3: muestra F2. 4: muestra F3. 5: muestra F4. 6: muestra F5. 7: muestra F6. 8: muestra F7. 9: ADN control de soja GM. 10: ADN control negativo (Soja no GM). 11: control negativo de PCR (sin ADN).

Las muestras, que se dispusieron como en el caso anterior de detección de soja GM, mostraron los siguientes resultados: el control positivo de soja GM presentó una banda de aproximadamente 74 pb, mientras que ni el control negativo (sin ADN) ni el control de soja no GM, presentaron banda. Esto era lo esperado, validándose así el ensayo.

Respecto a las muestras de Frankfurter (carriles 2 al 8), cinco de estas (carriles 2,3, 5, 6 y 8) presentaron bandas de igual peso molecular que el control positivo de soja transgénica. Asimismo, en las muestras F3 y F6 (carriles 4 y 7) se pudieron observar bandas de igual peso molecular que el control positivo de soja GM pero de menor intensidad. Debido a la baja intensidad de esta señal no se pudo concluir la presencia/ausencia de soja transgénica RR en estas muestras.

La presencia de bandas en los carriles 4 y 7 con iguales pesos moleculares que los controles positivos (tanto en el análisis de transgenicidad a nivel de rastreo como el específico de construcción), pudo deberse, a la presencia de bajas cantidades de soja.

Como ensayo adicional para el análisis de transgenicidad, se realizó una amplificación por PCR de otra de las secuencias que están presentes en la mayoría de los eventos transgénicos aprobados en nuestro país: la del terminador del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, con los cebadores t-nos F y t-nos R. Los análisis mediante geles de poliacrilamida no arrojaron resultados concluyentes sobre la presencia de esta secuencia en la muestra (resultados no mostrados). Sin embargo y de acuerdo con los dos resultados obtenidos con los análisis de transgénicos a nivel de rastreo y específico de construcción, es posible llegar a resultados confiables respecto a la presencia de soja GM en las matrices trabajadas.

En conjunto, los métodos utilizados permitieron confirmar la presencia de la especie vegetal soja y su transgenicidad en cinco de las siete muestras analizadas, tal como se detallaba en la etiqueta de las que se encontraban envasadas. Para dichas muestras se tuvieron resultados consistentes respecto a la presencia de soja, y soja Roundup Ready o RR. Las muestras F3 y F6 mostraron resultados que no permitieron concluir si contenían soja y si esta era GM.

La presencia de soja transgénica en la mayoría de las muestras analizadas se puede deber a que casi el 100% de la soja cultivada en Uruguay es genéticamente modificada (ISAAA, 2016).

Para obtener resultados concluyentes, se deberían realizar ensayos cuantitativos por medio de PCR en Tiempo Real (técnica más sensible), para determinar si efectivamente hay soja y si esta

es genéticamente modificada en la muestra y en qué porcentaje. Llevar a cabo esta técnica en todas las muestras que presentaron soja (resultados positivos para el gen endógeno de lectina), sería importante para determinar la presencia de soja GM y, entonces, el porcentaje de transgénicos para cumplir con los reglamentos nacionales y municipales de etiquetado de transgénicos.

#### 5.2.4 Confirmación de la identidad de las especies por técnica de secuenciación

Con el objetivo de corroborar la identidad de las especies detectadas, se llevó a cabo su secuenciación. Los cromatogramas generados tuvieron diferentes niveles de calidad.

Las secuencias más limpias fueron las correspondientes a vaca y cerdo, mientras que las de maíz, soja, soja GM y pollo contaron con unos pocos nucleótidos, de entre 40 y 60 pb, lo que no permitió realizar alineamientos con secuencias de referencia que pudieran llevar a resultados concluyentes.

En los casos de las muestras de vaca y cerdo, se tuvieron secuencias de aproximadamente 200 pb para vaca y 340 pb para cerdo. Ambas secuencias fueron editadas eliminando los primeros y últimos nucleótidos del cromatograma, así como limpiando en relación a los picos obtenidos. Al realizar los alineamientos con secuencias de referencia de la base de datos NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) por medio del programa BioEdit, se pudo corroborar que la secuencia del amplicón de vaca concuerda en un 95% y la de cerdo en un 99% con las de referencia correspondientes al ADN mitocondrial de citocromo b de las especies animales.

### 5.3 Cuantificación de especies animales en la matriz de estudio.

#### 5.3.1 Cuantificación de especies animales por PCR en tiempo real (qPCR).

La cantidad de las especies animales vaca, cerdo y pollo en las muestras de salchichas, se determinaron por medio de dos estrategias cuyos resultados se presentan a continuación.

### 5.3.1.1 Estrategia 1) Empleo de kit comercial validado RAPIDFINDER™ ID kit.

En primer lugar, se usó el kit RAPIDFINDER™ ID kit (Life Technologies) para determinar la cantidad de vaca en las siete muestras de Frankfurter y confirmar o descartar la presencia de pollo en la muestra F1, que había resultado dudosa en el ensayo de PCR punto final. Los valores de cuantificación de este kit se expresan como % de número de copias específico de especie, sobre número de copias total de ADN de especies animales. Ambas secuencias blanco corresponden a ADN mitocondrial y los estándares se basan en plásmidos con números de copias exactamente conocidos.

Las eficiencias de las curvas de amplificación mostraron valores óptimos siendo 99,7% para la secuencia de vaca, 96,5% para la de pollo y 99,1% para la de ADN total de especies animales. Los resultados de cuantificación se detallan en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Resultado de la cuantificación de vaca y pollo en salchichas utilizando el kit RAPIDFINDER™ ID kit (Life Technologies). El contenido se expresa en porcentaje (%) de especie sobre el total de especies en la muestra.

Muestras	Especie declarada	% Especie encontrada		
		Vaca	Cerdo	Pollo
F1	Vaca y cerdo	3,02	96,98	0.002
F2	Vaca y cerdo	78,17	21,83	0
F3	Vaca y cerdo	183	IND	0
F4	Vaca y cerdo	16,78	83,22	0
F5	Vaca y cerdo	98	2,00	0
F6	Vaca y cerdo	0,04	99,96	0
F7	Vaca y cerdo	42,15	57,85	0

En todas las muestras de salchicha fue posible detectar y cuantificar la especie animal vaca, arrojando diferentes valores de porcentaje. Esto coincide con lo establecido en el etiquetado de las marcas envasadas y con los ensayos realizados previamente por PCR punto final. Los porcentajes variaron desde 0.04% a 180%. La muestra F3 que evidenció una cantidad de vaca mayor al 100% (180%) podría ser consecuencia de una diferencia entre el número de copias de la secuencia especie específica y la correspondiente a ADN total de animales. Si bien ambas secuencias son mitocondriales, el proceso de producción puede haber provocado la degradación de algunas copias de ADN, llevando a una disminución de sensibilidad de la secuencia de ADN total. Para mejorar los resultados de esta muestra, se debería repetir el ensayo y utilizar, además, el kit de cuantificación de cerdo, que es la otra especie animal que se encuentra

declarada en esta matriz, para comparar en relación con el ADN total y evaluar la posible degradación del material génico.

Por otra parte, y en cuanto a la presencia de pollo en la muestra F1, el estudio arrojó porcentajes de 0.002% de esta especie en dicha muestra. Esta cantidad correspondería a trazas presentes en el alimento, tratándose de una contaminación y no adulteración del alimento. Esto es coherente con la obtención de una banda de baja intensidad en los análisis previos, siendo resultados consistentes.

Considerando que las dos únicas especies declaradas en la etiqueta de las muestras de Frankfurter envasadas fueron vaca y cerdo, y que la cantidad de pollo detectada en una de las muestras es del orden de trazas, se optó por calcular el porcentaje de cerdo como la diferencia entre el porcentaje de vaca y el 100% dado por la secuencia de ADN total de especies animales.

Las cantidades detectadas de cerdo en las siete muestras de salchicha fueron variables y reflejan la composición del alimento en el que se usan cantidades variables de diferentes tejidos como carne, grasa y menudencias para su producción. Estos valores se deberían corroborar mediante la detección y cuantificación de cerdo, usando el kit comercial específico de esta especie animal.

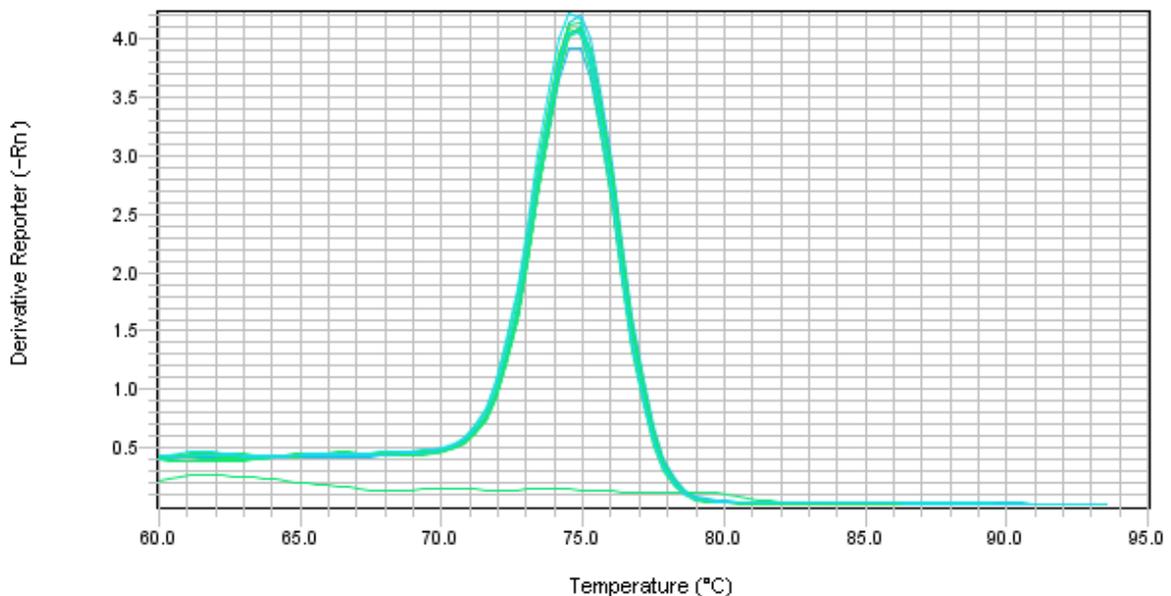
#### 5.3.1.2 Estrategia 2) Uso de protocolo descrito en la bibliografía

En esta estrategia de cuantificación de las especies animales vaca, cerdo y pollo, se emplearon los cebadores propuestos por López-Andreo *et al.* (2005), en conjunto con el agente SYBR Green como química de generación de fluorescencia. La elección del uso de esta química para la detección y cuantificación de pollo, se realizó por ser más simple y de menor costo que el uso de sondas de hidrólisis (Taqman). Además, se ha reportado que dependiendo de la especie a detectar y cuantificar, la utilización de SYBR Green puede ser comparable con el uso de las sondas mencionadas (López-Andreo *et al.*, 2005).

En todos los casos ensayados se empleó, además de las muestras conteniendo ADN, un control negativo (blanco de reacción, sin ADN) para evaluar la formación de dímeros e intensidad de fluorescencia base del método.

### 5.3.1.2.1 Ensayo de especificidad

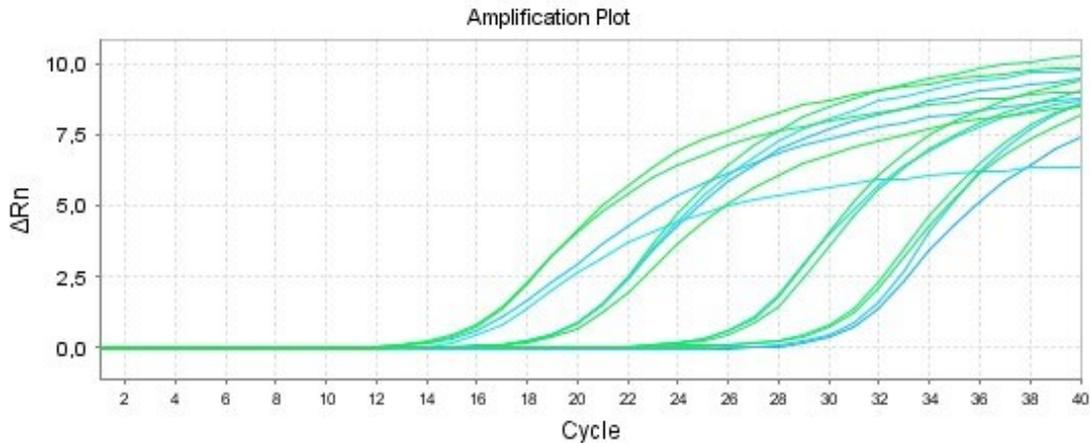
Para empezar, se buscó evaluar la especificidad y la posibilidad de reacción cruzada de cada par de cebadores. Para esto, se ensayaron por qPCR con SYBR Green, los controles positivos y se determinó la temperatura de disociación de los productos de PCR obtenidos en cada caso. Un ejemplo del gráfico obtenido para la curva de disociación se muestra en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Gráfico de curva de disociación, ensayo realizado con cebadores FSUS1 / RSUS2 y SYBR Green para detección de cerdo. Las muestras utilizadas corresponden a estándares de cerdo y muestras de salchicha. En la base se observa el control negativo que no presentó ningún pico.

Todos los pares de cebadores ensayados resultaron ser específicos y no generaron reacción cruzada. Al evaluar las curvas de disociación de cada una de las especies animales, se obtuvieron picos únicos con  $T_m$  de  $75,2^{\circ}\text{C}$  para vaca,  $74,7^{\circ}\text{C}$  para cerdo y  $76^{\circ}\text{C}$  para pollo. La  $T_m$  que se tuvo para la secuencia de 18S fue de  $81,7^{\circ}\text{C}$ .

Como parte de la validación, se procedió a evaluar la sensibilidad y el límite de detección de cerdo, por ser la especie animal con la que se obtuvieron los mejores resultados en la optimización de la técnica. El límite de detección se definió como la menor concentración que pudo ser detectada en el 95% de las réplicas de reacción ensayadas. Con este fin, se realizaron cuatro réplicas de reacción para cada una de las diluciones de los controles positivos de cerdo (10 ng, 1 ng, 0,1 ng y 0,01 ng). Se determinó un límite de detección de cerdo de 0,01 ng con un  $C_t$  asociado de 30,33.



**Figura 16.** Curvas de fluorescencia vs número de ciclo para determinar el límite de detección de cerdo. Se ensayaron 4 réplicas de diluciones seriadas de controles: 10 ng, 1 ng, 0,1 ng y 0,01 ng.

Finalmente, se evaluaron las eficiencias de reacción de cada par de cebadores a partir de una curva de calibración con diluciones de los controles positivos. Es importante destacar que al cuantificar usando la técnica de PCR en Tiempo Real, los valores de eficiencia que se obtienen de las curvas estándar deben encontrarse en el rango de 80% a 110% para considerar que la reacción se produjo correctamente y además, deben ser similares entre sí para poder comparar los valores de cuantificación (López-Andreo *et al.*, 2005).

Las eficiencias de reacción de todos los pares de cebadores ensayados se encontraron en el rango de 89% a 109%. Específicamente, se obtuvo una eficiencia del 107% en la amplificación del ADN de vaca y una regresión lineal  $y = -3,16x + 19,5$  con un  $R^2$  de 0,998. Para el caso de la amplificación de cerdo, la eficiencia fue de 99,7%, siendo la regresión lineal de  $y = -3,33x + 18,0$  y  $R^2$  de 0,999. Respecto a la secuencia de ADN de pollo, se tuvo una eficiencia de 92%, regresión lineal de  $y = -3,52x + 25,7$  y  $R^2$  de 0,998.

Las eficiencias del par de cebadores de la secuencia 18S para cada una de las especies animales fueron: para vaca 109% con una regresión lineal de  $y = -3,105x + 21,512$  y  $R^2 = 0,963$ , para cerdo 92%, regresión de  $y = -3,517x + 23,076$  y  $R^2 = 0,9903$  y, por último, para pollo una eficiencia del 89%, regresión lineal de  $y = -3,6237x + 24,864$  y  $R^2 = 0,993$ . Si bien las eficiencias se encuentran en el rango deseado, los  $R^2$  resultaron bajos en comparación con los obtenidos en las regresiones de las secuencias específicas de

especie. De todas formas, se decidió utilizarlos para los ensayos de cuantificación de especies animales.

Cabe destacar que los controles negativos ensayados (sin ADN), no presentaron intensidad de fluorescencia de base significativa ni formación de dímeros de cebadores (resultados no mostrados).

Las eficiencias calculadas permitieron asegurar que las reacciones de amplificación de las secuencias de interés se llevaron a cabo en forma correcta, pudiendo seguir adelante con la cuantificación de las especies animales en la matriz de trabajo. Se realizaron, entonces, los ensayos de qPCR para la cuantificación de vaca, cerdo y pollo en salchichas, utilizando esta metodología.

#### 5.3.1.2.2 *Análisis de las muestras problema.*

De acuerdo con lo visto, una muestra problema se consideró positiva y cuantificable cuando: primero, presentó un único pico en la curva de disociación con un valor de  $T_m$  igual al asociado al amplicón esperado (determinado previamente en el ensayo con los controles positivos de cada especie animal), con una variación máxima de  $\pm 1$  °C. Segundo, su valor de  $C_t$  fue menor o igual al  $C_t$  asociado al límite de detección para la especie animal en cuestión.

La metodología utilizada permitió determinar la presencia/ausencia de las especies animales vaca, cerdo y pollo en las muestras de Frankfurter. Todas las muestras tuvieron amplificación de las secuencias de vaca y cerdo, con rangos de  $C_t$  que van de 21,17 a 30,84 para vaca y 17,89 a 22,69 para cerdo. A su vez, se obtuvieron picos únicos en las curvas de disociación con valores de  $T_m$  de 75,6°C y 74,9°C para vaca y cerdo, respectivamente. Estos últimos coinciden con aquellos determinados mediante los controles positivos de cada una de estas especies animales.

En esta matriz alimentaria, el cerdo forma parte de los ingredientes, con lo cual, figura en la etiqueta. Sin embargo, la puesta a punto de una técnica que permita su cuantificación puede ser relevante para otras matrices alimentarias en las que sólo se declara carne vacuna y se añade carne de cerdo (Eaqub Ali *et al*, 2012), por constituir esta una adulteración frecuente (Mafrá *et al*, 2008, Ren *et al.*, 2017).

En el caso de la secuencia de pollo, no se detectó amplificación en ninguna de las siete muestras problema. Lo dicho coincide con lo expresado en la etiqueta de todas las muestras envasadas, pero no con los ensayos previos de PCR punto final y estrategia 1 de cuantificación de la muestra F1, los que habrían indicado la presencia de trazas de esta especie animal en esta muestra. Esto denota que el método utilizado en la estrategia 2, posee un límite de detección mayor al 0.002% para la especie animal pollo por ser este último el valor que se pudo detectar al emplear el kit comercial. Debido a que no se detectó pollo en las muestras de salchicha por este método, en los ensayos que le siguieron sólo se buscó cuantificar vaca y cerdo en dicha matriz.

Tal como se detalló en Materiales y Métodos, a partir de los Ct de cada muestra, se determinó la cantidad en nanogramos de las especies animales presentes. Estos valores fueron normalizados respecto a la cantidad total de ADN presente en la muestra usando la secuencia del gen 18S como referencia. Los valores de Ct, en conjunto con los porcentajes obtenidos para cada especie animal en cada muestra evaluada se pueden ver en la **tabla 8**.

**Tabla 8.** Cts y porcentajes obtenidos para las especies vaca y cerdo.

Muestras	Cts				Porcentajes (%)	
	Vaca	Cerdo	Pollo	18S	Vaca	Cerdo
F1	30,84	17,89	IND	28,22	4	>>100
F2	28,33	19,98	IND	31,82	>100	>>100
F3	21,51	22,69	IND	35,67	>>100	>>100
F4	26,33	17,59	IND	27,39	54	>>100
F5	22,09	22,12	IND	IND	-	-
F6	36,83	20,34	IND	IND	-	-
F7	21,17	19,18	IND	38,94	>>100	>>100

Las muestras F1 y F4 presentaron porcentajes de vaca de 4% y 54%, respectivamente. Sin embargo, en las muestras restantes y para la secuencia de 18S se obtuvieron valores de Ct muy elevados, teniendo como resultado porcentajes calculados tanto de vaca como de cerdo, mucho mayores al 100%. Además, en dos de las muestras (F5 y F6) no se pudo calcular la cantidad debido a que no se obtuvo amplificación de la secuencia de ADN ribosomal 18S, lo que fue expresado en la tabla 8 como indeterminado (IND). Los picos de la curva de disociación de cada

muestra para la secuencia de 18S arrojaron temperaturas de *melting* del entorno de los 81,9°C pudiéndose afirmar que el producto de amplificación fue específico.

Estos resultados no permitieron determinar la cantidad real de las especies animales presentes en la muestra. Entre los aspectos que pueden haber afectado la cuantificación por PCR en Tiempo Real, se tienen: la degradación del ADN (dado por el proceso de producción del alimento), extracción del ADN, la composición del tejido (diferentes tejidos con diferentes aportes de ADN desconocidos para el investigador), las diferentes especies animales como componentes del alimento (variabilidad en el número de mitocondrias según especie), entre otros (Ballín *et al.*, 2009).

### ***Degradación de ADN***

En matrices alimentarias como el Frankfurter, que han sufrido condiciones de altas temperaturas y homogeneizado como parte del proceso de producción, es muy común que ocurra fragmentación del ADN debido a estos procesos (Chen, Wang, Ge, & Xu, 2005; Klein, Altenbuchner, & Mattes, 1998). Si bien todo el ADN presente en el alimento se ve sometido a estas etapas, se ha reportado que los genes nucleares son más susceptibles a degradarse que aquellos de origen mitocondrial. La forma circular del ADN mitocondrial contribuye a una mayor estabilidad a lo largo del tiempo, siendo menos susceptible a la degradación en comparación con el ADN nuclear (Gefrides & Welch, 2011). Esto da como resultado una mejor supervivencia del ADN mitocondrial en alimentos altamente procesados que sufren condiciones extremas de procesamiento (Bogehagen, 2009). Es posible, entonces, que gran parte de las secuencias correspondientes al gen nuclear 18S de las muestras analizadas se hayan degradado durante la fabricación del alimento. Esto es coherente con el hecho de que los controles positivos correspondientes a tejido muscular de cada una de las especies animales (matrices que no han sido procesadas), arrojaron valores de Ct y eficiencia óptimos. Este argumento se ve potenciado por lo obtenido en otros ensayos, como en el de Lopez-Andreo *et al.* (2005), en los que al utilizar el gen de ADNr 18S como normalizador en cuantificación de mezclas de especies animales se obtuvieron resultados satisfactorios, pero que, al aplicar la misma metodología para cuantificar ADN de mezclas de carne procesadas, se tuvieron medidas imprecisas (Lopez-Andreo *et al.*, 2005).

### ***Gen nuclear vs mitocondrial.***

Se ha reportado que la elección entre ADN de origen nuclear o mitocondrial puede afectar la especificidad y sensibilidad del análisis por PCR (López-Andreo *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2009).

La elección de secuencias mitocondriales (que presentan múltiples números de copias por célula) en ensayos de PCR, es ideal para aumentar la sensibilidad del ensayo en matrices en las que esta variable se encuentra comprometida (Rojas *et al.*, 2010). Sin embargo, el ADN mitocondrial puede no ser buen candidato en ensayos de cuantificación. El número de copias difiere según el tejido del que se trate (Fajardo *et al.*, 2008b) y, además, distintas especies pueden presentar cantidades diferentes de mitocondrias (Sawyer *et al.*, 2003) lo que afectaría la confiabilidad de los resultados cuantitativos. En este caso, los porcentajes de vaca y cerdo que superaron en gran medida el 100%, pueden deberse en parte al alto aporte del número de copias de ADN mitocondrial especie específico frente al gen nuclear 18S presente en menor número de copias.

Al evaluar la metodología de Lopez-Andreo *et al.* (2005) para la matriz Frankfurter se advierte que presentó limitaciones. Se desprende de este trabajo que no podría aplicarse para cuantificar especies animales presentes en matrices complejas como esta, en la que se desconoce el aporte de cada tejido y de cada especie animal en el producto final. Si bien es una muestra homogénea, y las cantidades de ADN se consideran similares en cualquier sección del alimento que se utilice para los análisis, no es posible relacionar la cantidad de ADN presente con el aporte de masa real de cada especie animal en el alimento.

La situación actual en relación con la cuantificación de especies animales en matrices procesadas presenta una clara limitación que es el no poder correlacionar la cantidad de ADN detectado con la cantidad real de la especie animal presente en el alimento. Dichas matrices contienen variedad de tejidos (muscular, conectivo, grasa) y distintas especies animales, cada uno con diferentes cantidades de ADN, siendo el aporte de cada uno de estos desconocidos para quienes realizan los análisis. Como consecuencia, no es posible aún realizar medidas precisas sobre las cantidades de especies animales en dichas matrices para distinguir, por ejemplo, entre una contaminación o una adulteración del alimento.

Una de las metodologías que en la actualidad se aproximan más a la obtención de medidas precisas incluye la generación de plásmidos que contengan como inserto el amplicón que se

busca detectar, cuyo número de copias es exactamente conocido y con los que se calcularía la relación genoma/genoma. Este es el caso del kit comercial utilizado en la estrategia 1, que apunta a la detección de secuencias mitocondriales tanto la específica de especie como la que se utiliza para normalizar. Ahora bien, no hay publicaciones respecto al método utilizado en dicho kit por lo que no es posible utilizar sus principios en un ensayo desarrollado en el laboratorio.

Se ha reportado, también, que la cuantificación por PCR en Tiempo Real usando curvas de calibración con matrices estandarizadas similares a la que se va a cuantificar como mezclas de las especies animales blanco, generan resultados más exactos y precisos que aquellos obtenidos usando diluciones de muestras puras de cada especie animal para las curvas estándar (Eugster *et al.*, 2009).

Por este motivo, y dado los resultados poco concluyentes obtenidos con la metodología anterior, se realizó una cuantificación adicional utilizando para la curva estándar diluciones de una de las matrices de Frankfurter ensayadas hasta el momento. Se eligió aquella muestra que en la estrategia 1 con kit comercial presentó porcentajes similares de vaca y cerdo, aproximadamente 50% de cada una, la F7. Esto permite considerar y minimizar las diferencias en contenido de ADN de los distintos tejidos y el proceso al cual se somete a la muestra al fabricarla, de forma de evaluar si influyen al momento de determinar la composición del alimento en relación con las especies animales. Los resultados obtenidos en dicha corrida se muestran en la **Tabla 9**

**Tabla 9.** Resultado de la cuantificación de vaca y cerdo en salchichas utilizando una curva estándar con la matriz Frankfurter. El contenido se expresa en porcentaje (%) de especie sobre el total de especies en la muestra.

Muestras	Cts			Porcentajes (%)	
	Vaca	Cerdo	18S	Vaca	Cerdo
F1	25,25	16,28	35,81	>>100	>>100
F2	19,94	17,67	29,20	>>100	>>100
F3	19,89	20,59	32,85	>>100	>>100
F4	21,83	15,44	24,92	>>100	>>100
F5	18,30	19,72	27,28	>>100	>>100
F6	36,42	18,83	30,25	>>100	>>100
F7	21,85	18,07	22,98	>>100	>>100

Los resultados obtenidos con la curva generada a partir de la matriz de salchicha arrojaron porcentajes similares de las especies vaca y cerdo a los obtenidos con la curva de diluciones de

muestras puras de las especies animales. La amplificación de la secuencia de 18S presentó Cts altos, tal como ocurrió con la metodología anterior, siendo esta la limitante para lograr calcular porcentajes precisos de las especies animales en la muestra. Además, en cuatro de las muestras problema, se obtuvieron picos múltiples en la curva de disociación de la secuencia de 18S, indicando inespecificidad del producto amplificado.

Lopez-Andreo *et al.* (2005), en ensayos posteriores a la metodología evaluada en este trabajo, llevó a cabo una cuantificación en la que no utiliza el gen 18S como referencia, sino que combina la curva generada a partir de diluciones con muestras puras de especie y una matriz de referencia que consiste en una mezcla con cantidades conocidas de las especies animales a analizar. Evalúa únicamente un punto en la curva con una mezcla compuesta por 50% de vaca y 50% de cerdo. Esto también se evaluó en este trabajo, para prescindir del gen 18S que hasta ahora había sido el factor limitante. Las curvas estándar, sin embargo, se realizaron con una de las muestras de la matriz de salchicha por ser, de acuerdo con la bibliografía, una forma más exacta para cuantificar especies animales presentes en matrices procesadas.

Para el cálculo de los porcentajes se considera el ajuste de número de copia entre las especies animales vaca y cerdo dado por la diferencia D y según la ecuación (7).

Los nuevos porcentajes calculados con las ecuaciones (9) y (10) para cerdo y vaca, respectivamente, se muestran en la **Tabla 10** y en la **Tabla 11** se los compara con aquellos obtenidos con el kit comercial en la estrategia 1.

**Tabla 10.** Resultado de la cuantificación de vaca y cerdo en salchichas utilizando una curva estándar con la matriz Frankfurter y considerando la diferencia D entre ambas especies. El contenido se expresa en porcentaje (%) de especie sobre la suma de los aportes de ambas especies animales en la muestra.

Muestras	Cts		Porcentajes (%)	
	Vaca	Cerdo	Vaca	Cerdo
F1	25,25	16,28	2,27	97,7
F2	19,94	17,67	72,44	27,6
F3	19,89	20,59	94,60	5,4
F4	21,83	15,44	13,83	86,2
F5	18,3	19,72	96,94	3,1
F6	36,42	18,83	0,00	100,0
F7	21,85	18,07	45,85	54,1

Esta última metodología arrojó porcentajes variados respecto a la presencia de vaca y cerdo y confirma lo informado en las etiquetas de las matrices envasadas, salvo en el caso de F6 que, según este estudio, contendría únicamente cerdo. Este resultado no es coherente con los obtenidos previamente tanto por PCR punto final como con kit comercial al cuantificar, por lo que se debería repetir el ensayo para descartar la posibilidad de un error aleatorio al preparar las reacciones de PCR. Con excepción de F6, se puede afirmar que los resultados son consistentes con los estudios de detección y cuantificación previos realizados en este trabajo.

Al comparar los porcentajes obtenidos con ambas estrategias (kit comercial vs curva estándar con matriz salchicha y ajuste con valor D), se tienen resultados que difieren como máximo en un 5,7% (excluyendo a la muestra F3 cuyo contenido de cerdo no pudo ser determinado mediante la estrategia 1). Se pudo afirmar entonces que esta última aproximación, permitió obtener resultados comparables a los que se obtendría mediante kits comerciales validados.

**Tabla 11.** Comparación de los porcentajes obtenidos de las especies animales vaca y cerdo en salchichas obtenidos mediante el método basado en Lopez-Andreo *et al.* (2005) y Lopez-Andreo *et al.* (2012) (A) y kit comercial validado (B).

Muestras	A. Porcentajes (%) obtenidos considerando diferencia D		B. Porcentajes (%) obtenidos con el kit comercial	
	Vaca	Cerdo	Vaca	Cerdo
F1	2,27	97,7	3,02	96,98
F2	72,44	27,6	78,17	21,83
F3	94,60	5,4	183,00	IND
F4	13,83	86,2	16,78	83,22
F5	96,94	3,1	98,00	2,00
F6	0,00	100,0	0,04	99,96
F7	45,85	54,1	42,15	57,85

La principal limitante que se tuvo en este trabajo al cuantificar las especies animales consistió en la elección del gen normalizador 18S como referencia. Como gen nuclear, tenía la ventaja de presentar un único número de copias en todas las especies a evaluar (Ballin *et al.*, 2009). Sin embargo, en este tipo de muestras, las secuencias nucleares serían más vulnerables a la degradación que aquellas de origen mitocondrial. Se evidencia, entonces, la necesidad de encontrar un gen universal que permita normalizar las cantidades que se obtengan de muestras procesadas, que como se advirtió resultan problemáticas. El uso de una secuencia mitocondrial con este fin sería la mejor opción para aumentar el límite de detección, pero resulta difícil

encontrar una secuencia conservada para todas las especies por el nivel de mutación que tienen los genes mitocondriales. En base a esto, se debe considerar el uso de matrices estandarizadas producidas especialmente para cuantificar especies animales. Los resultados obtenidos permiten afirmar que la alternativa de cuantificación de Frankfurters usando una matriz similar a la que se va a cuantificar y considerando la diferencia  $D$ , sería la opción que permitiría una cuantificación precisa de especies animales. Cabe destacar, que dicho método sólo permite cuantificar las cantidades de especies que se declaran como componentes del alimento. Para poder detectar y cuantificar la presencia de otra especie no declarada en este tipo de matriz, y así descartar una adulteración, se deberían generar matrices estandarizadas con especies que sean las más comunes de utilizar como adulterante. Para que esto se pudiera llevar a cabo, sería imprescindible contar con la información sobre las cantidades de los tejidos y especies animales que usan las empresas para fabricar estos alimentos, para, según esto, producir las matrices estándar. De esta forma, se evitaría el uso de un gen universal, que como se vió en este trabajo y en otros, como el de Lopez-Andreo *et al.* (2015), puede constituir un limitante.

En concreto, para llevar a cabo los controles pertinentes de acuerdo con las regulaciones vigentes, se debe contar con una metodología precisa para distinguir entre contaminación o adulteración. Para esto se debe lograr un compromiso entre la sensibilidad del ensayo y la certeza de poder relacionar la cantidad de producto amplificado con la cantidad de producto real presente. Lo primero, como ya se mencionó, tiene que ver con el número de copias presentes en la muestra de la especie animal a cuantificar, lo cual está muy comprometido en alimentos como la matriz con la que se trabajó. Lo segundo implica que se conozcan el número de copias de los genes que se utilicen en la cuantificación (específico de especie y de referencia) para poder informar con certeza la cantidad presente de especies animales en estas matrices alimentarias

## 6 CONCLUSIÓN

---

### 6.1 Extracción de ADN

Los métodos de extracción de ADN utilizados en este trabajo resultaron óptimos en cuanto a la cantidad y calidad del ADN obtenido y para su posterior utilización en los ensayos planificados. Ambas metodologías (Dellaporta modificado y kit comercial) permitieron la obtención de concentraciones y niveles de pureza aceptables.

El método Dellaporta modificado permitió la extracción de ADN a partir de las muestras de Frankfurter con concentraciones y pureza satisfactorias. Únicamente la muestra F3 presentó un valor menor de concentración relativo a las demás muestras, pero igualmente apta para su uso posterior en los análisis. Los índices de pureza fueron superiores a 1,8 para todas las muestras, indicando la validez del método para la obtención de ADN de buena calidad a partir de esta matriz alimentaria.

Así también, se tuvieron buenos resultados al utilizar el kit comercial *Dneasy Blood and Tissue Kit* para la extracción de ADN a partir de tejido muscular de vaca, cerdo y pollo.

En suma, se demostró la validez del método de Dellaporta modificado para la extracción de ADN a partir de la matriz Frankfurter. Este ha sido utilizado en variedad de ocasiones en nuestro laboratorio, obteniéndose resultados satisfactorios para distintos tipos de matrices alimentarias como quesos, polentas, entre otros.

### 6.2 Detección de especies animales, vegetales y transgénicos mediante PCR en salchichas

En primer lugar, se pudieron amplificar las secuencias correspondientes a las especies animales vaca, cerdo y pollo (en un caso) por medio del uso de los cebadores descritos por Matsunaga *et al.* (1999), pudiendo detectar estas especies en forma específica en la matriz de estudio. Es necesario mencionar que en el análisis de pollo, en el que se utilizaron los cebadores Fsim y RC específicos de pollo, se evidenciaron bandas no específicas de pesos moleculares mayores al de esta especie en varias de las muestras de Frankfurter. Para poder resolver esto, se propone una

nueva puesta a punto de las condiciones de reacción de PCR, así como el uso de cebadores distintos a los utilizados, de forma de lograr mayor especificidad en el producto de amplificación.

En segundo lugar, el uso de los cebadores extraídos del “*Compendium of Reference Methods for GMO analysis*” del JRC permitieron confirmar la presencia de soja en cinco de las siete muestras analizadas y descartar la presencia de maíz en todas ellas. El hecho de que contuvieran soja coincidió con lo declarado en la etiqueta de los productos y resultó esperado ya que la soja tiene un bajo costo económico en nuestro país. Para las muestras F3 y F6 en los que se encontró un resultado presuntivo de presencia de soja, se sugiere seguir con los ensayos de cuantificación por medio de PCR en Tiempo Real, para así descartar la presencia de soja.

Por último, el análisis de transgenicidad a dos niveles (de rastreo y de construcción), permitieron confirmar la presencia de soja transgénica y la identificación evento específico soja RR (Round up Ready. Esto fue así para las muestras F1, F2, F4, F5 y F7. Para el caso de las muestras F3 y F6, se propone ensayos de cuantificación de soja GM por medio de PCR en Tiempo Real para descartar o confirmar la presencia de esta especie vegetal transgénica. Este resultado encontrado en las muestras de Frankfurter fue de esperar ya que casi la totalidad de la soja cultivada en Uruguay es transgénica.

En conclusión, los métodos utilizados para la determinación de presencia/ausencia de las especies animales, vegetales y transgénicos por PCR en punto final, resultaron válidos en la mayoría de los casos para la matriz Salchicha de Viena, permitiendo la obtención de los productos de PCR buscados.

### 6.3 Cuantificación de especies animales en la matriz salchicha

Primero, la estrategia de cuantificación de especies animales mediante el kit comercial *RAPIDFINDER™ ID kit (Life Technologies)* resultó adecuada para la determinación de los porcentajes de vaca y pollo en la mayoría de las muestras analizadas. En particular, la muestra F3 reveló un porcentaje de vaca del 183%, no pudiéndose determinar la cantidad de cerdo tal como se calculó en los otros casos. Se sugiere repetir el ensayo con esta muestra, añadiendo el uso del kit de cuantificación de cerdo de la misma línea comercial para llegar a un valor certero de los porcentajes de ambas especies. En referencia a la muestra F1 y la posible presencia de pollo, se logró determinar un resultado positivo de 0,002% de esta especie animal presente en la

muestra, lo que llevaría a deducir que se trata de una contaminación de la matriz alimentaria por trazas en el proceso de producción de la misma.

En segundo lugar, el método descrito en el trabajo de Lopez-Andreo *et al.* (2005) (estrategia 2 de cuantificación) posibilitó la determinación de la presencia o ausencia de las especies animales vaca y cerdo en forma específica y reproducible, utilizando además un sistema sencillo y económico como es el agente intercalante SYBR Green y la curva de disociación para determinar la especificidad de los productos generados. En el caso particular de pollo, el método no logró la detección de esta especie animal en la muestra F1, de donde se puede afirmar que el método permitiría su detección siempre y cuando se encuentre en porcentajes mayores a 0,002%, según lo que se determinó en la estrategia 1 con kit comercial. Se propone a futuro determinar el límite de detección del método utilizado en la estrategia 2 para pollo, para poder informar a partir de que cantidad es posible detectar esta especie.

En definitiva, el uso de este método en la estrategia 2 es adecuado para descartar la presencia de especies animales no declaradas en la etiqueta de la matriz Frankfurter. Sin embargo, no sería apto para aplicarse en la cuantificación de especies animales presentes en matrices complejas como esta, en la que se desconoce el aporte de cada tejido y de cada especie animal en el producto final. Si bien es una muestra homogénea, y las cantidades de ADN se consideran similares en cualquier sección del alimento que se utilice para los análisis, no es posible relacionar por lo antes mencionado, la cantidad de ADN presente con el aporte de masa real de cada especie animal presente en el alimento.

Referente a los análisis de cuantificación, el método de Lopez-Andreo *et al.* (2005) presentó limitaciones. Específicamente, la secuencia de ADNr 18S amplificó a ciclos de reacción altos, denotando que se encontraba en pocas cantidades en las muestras o degradado. Como consecuencia, no fue posible para la mayoría de las muestras llegar a porcentajes de especie animal de vaca y cerdo. Además, en las muestras F5 y F6 la secuencia no amplificó. Las muestras F1 y F4 mostraron porcentajes de vaca de 4% y 54%, respectivamente. La utilización de una curva estándar generada a partir de muestras de Salchicha produjo resultados similares a los del método anterior, siendo la amplificación tardía de la secuencia de ADNr 18S lo que hacía persistir el no poder calcular los porcentajes de las especies animales.

La elección del gen 18S como referencia para el cálculo de las especies animales fue la limitante para lograr los resultados esperados en la matriz de estudio. Se propone la búsqueda de otro

gen de referencia que tenga un límite de detección bajo como sería el caso de un gen mitocondrial. Tal es el caso del 12S. Más adecuado aún, sería producir plásmidos con los amplicones de las especies a cuantificar y el gen de referencia para conocer en forma exacta el número de copias de cada secuencia diana y así informar resultados precisos en % de número de copias.

El ajuste arbitrario mediante el uso de la ecuación D (7) del trabajo de Lopez-Andreo *et al.* (2012), permitió en conjunto con la curva estándar similar a la matriz de trabajo la obtención de porcentajes de las especies animales vaca y cerdo, similares y con una diferencia máxima del 5,7% respecto a los valores obtenidos en la estrategia 1 con kit comercial. Se desprende de este trabajo que esta última metodología, sería la aproximación más cercana para obtener valores precisos de porcentaje de especies animales vaca y cerdo en la matriz Frankfurter.

Se propone en líneas futuras de investigación, continuar con la puesta a punto de este método a partir de los resultados obtenidos y, de ser posible, comparar con resultados independientes de cuantificación que se obtengan con curvas de calibración en las que se utilicen plásmidos, tal como se mencionó anteriormente. Esto daría una idea respecto a cuál sería la mejor opción en cuanto a validez y precisión para determinar especies animales como vaca, cerdo y pollo en la matriz Frankfurter, para luego poder ser aplicado como técnica de rutina en laboratorios de contralor oficiales.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

---

Abete, Patricia (2009). Tesis de grado titulada "Trazabilidad Molecular de Especies Cárnicas en Alimentos Chacinados Cocidos Embutidos". Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Aditivos alimentarios. Ácido ascórbico. Disponible en: <http://www.aditivos-alimentarios.com/2016/01/E300.html>. Último acceso: 6-12-2017

Aida, A. A., Man, Y. B. C., Wong, C. M. V. L., Raha, A. R., & Son, R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Science*, 69, 47–52.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., RaE, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1994) 'Molecular Biology of the Cell' (3rd ed.), Garland Publishing Inc, New York and London.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Alimentos obtenidos a partir de organismos genéticamente modificados (OGM). Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/OGM.pdf>. Último acceso: 6-12-2017

ArgenBio, Biotecnología. Disponible en: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=267> Último acceso: 24-9-2017.

Aung M. M., Chang Y. S. (2014). Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control* 39, 172-184.

Bánáti, D. (2011). Consumer response to food scandals and scares. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 56-60.

Belloque, J., García, M. C., Torre, M., & Marina, M. L. (2002). Analysis of soyabean proteins in meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 507–532.

Bogenhagen, D. F. (2009). Biochemical isolation of mtDNA nucleoids from animal Cells. In J. A. Stuart (Ed.), *Mitochondrial DNA: Methods and protocols* (pp. 3–14). (2<sup>nd</sup> Ed.). New York: Humana Press.

Botti, S. & Giuffra, E. (2010). Oligonucleotide indexing of DNA barcode: identification of tuna and other scombrid species in food product. *BMC Biotechnology*, v. 10, p. 60-67.

Bonfini, L., Van den Bulcke, M. H., Mazzara, M., Ben, E., & Patak, A. (2012). GMOMETHODS: The European Union database of reference methods for GMO analysis. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1713-1719.

Calvo JH, Osta R, Zaragoza P (2002) Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pâté. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5265–5267.

Chen, Y., Ge, Y., & Wang, Y. (2007). Effect of critical processing procedures on transgenic components in quality and quantity level during soymilk processing of Roundup Ready Soybean. *European Food Research and Technology*, 225, 119–126.

Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T., and Kato, S. (1990). Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay, *Meat Science* 27, 119–128.

Chile Bio (2013) Manual de consulta sobre cultivos transgénicos. Disponible en: <<http://www.chilebio.cl/wp-content/uploads/2015/09/ARCHIVADOR.pdf>> Último acceso: 7-12-2017.

Codex Alimentarius, Etiquetado de los alimentos. FAO/OMS (2007). Disponible en: <<http://www.fao.org/3/a-a1390s.pdf>> Último acceso: 7-12-2017.

Coff, C., Korthals, M., & Barling, D. (2008). Ethical traceability and informed food choice. In C. Coff, D. Barling, M. Korthals, & T. Nielsen (Eds.), *Ethical Traceability and Communicating Food*. pp. 1–18. New York: Springer.

Compendium of reference methods for GMO analysis (2011). JRC referent report, European Union Reference laboratory for GM food and feed.

United Nations (1992). Convention on Biological Diversity, Article 2. Use of Terms. Disponible en: <<https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>> Último acceso: 7-12-2017.

Cámara Uruguaya de Semillas (CUS) 2013. Disponible en: <<http://www.cus.org.uy/biotecnologia/situacion-nacional>> Último acceso: 24-9-2017.

Danezis, G P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusic, V., Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *Trends in Analytical Chemistry* 85, 123–132.

Decreto Nº 34.901 (2013). Alimentos que contienen organismos genéticamente modificados. *Junta Departamental de Montevideo. Resolución N° 5825/13. Intendencia de Montevideo, Uruguay.*

Decreto Nº 35.335, artículo 2 (2014). Resolución N° 5525/14, Junta Departamental de Montevideo, Uruguay.

Dellaporta, S.L., Wood, J., James, B. & Hicks, J.B. (1983). A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, n. 4, p. 19-21.

Diario Oficial Uruguay (2008). Decreto 353/008. Díctanse normas relativas a Bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas y deróganse los Decretos 249/000 y 37/007. Nº 27.534 p. 219-A.

M. Eaqub Ali, & U. Hashim & Th. SabarDhahi & S. Mustafa & Yaakob Bin Che Man & Md. Abdul Latif. (2012). Analysis of Pork Adulteration in Commercial Burgers Targeting Porcine-Specific Mitochondrial Cytochrome B Gene by TaqMan Probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Anal. Methods*, 5, 784–794.

Ebbehoj, K. F. and Thomsen, P. D. (1991). Differentiation of closely related species by DNA hybridisation, *Meat Science* 30, 359–366.

Barbau-Piednoir E., Lievens A., Mbongolo-Mbella G. (2010). “SYBR Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products,” *European Food Research and Technology*, vol. 230, no. 3, pp. 383–393.

Eugster, A., Ruf, J., Rentsch, J., Hübner, P., Köppel, R. (2008). Quantification of beef and pork fraction in sausages by real-time PCR analysis: results of an interlaboratory trial. *Eur Food Res Technol*, 227, 17–20.

Eugster, A., Ruf, J., Rentsch, J., Köppel, R. (2009) Quantification of beef, pork, chicken and turkey proportions in sausages: use of matrix-adapted standards and comparison of single versus multiplex PCR in an interlaboratory trial. *Eur Food Res Technol*, 230, 55–61.

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervuselaphus*), fallow deer (*Damadama*), and roe deer (*Capreoluscapreolus*) in meat mixtures. *Meat Science*, 79, 289–298.

Fernández, Martín (2010). Tesis de grado titulada “Análisis de Transgénesis mediante PCR de 20 Polentas que se encuentran a la venta en el Mercado Uruguayo”. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Fichas técnicas. Procesados de carnes. Disponible en: <<http://www.fao.org/3/a-au165s.pdf>> Último acceso: 6-12-2017

Food Safety Authority of Ireland (FSAI) (2013). FSAI Survey Finds Horse DNA in Some Beef Burger Products. Disponible en: <[https://www.fsai.ie/news\\_centre/press\\_releases/horseDNA15012013.html](https://www.fsai.ie/news_centre/press_releases/horseDNA15012013.html)> Último acceso: 24-9-2017

Food Safety Authority of Ireland (FSAI) (2013). Horse and Pork DNA in Meat Products. Disponible en: <[https://www.fsai.ie/faqs/horse\\_pork\\_dna\\_meat\\_products.html](https://www.fsai.ie/faqs/horse_pork_dna_meat_products.html)> Último acceso: 24-9-2017

Food Standards Agency (FSA) (2002). Traceability in the food chain a preliminary study. UK: Food Standard Agency. Disponible en: <[http://www.quiveter.com/ftp\\_public/articulo361.pdf](http://www.quiveter.com/ftp_public/articulo361.pdf)> Último acceso: 24-9-2017

Fung, D. Y. C., Hajmeer, M. N., Kastner, C. L., Kastner, J. J., Marsden, J. L., Penner, K. P., et al. (2001). Meat safety. En: *Meat science applications*. Y. H. Hui, W-K. Nip, R. W. Rogers, & O. W. Young (Eds.), p. 171–205.

Gachet, E., Martin, G. G., Vigeau, F. & Meyer, G. (1999) Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends Food Sci. Technol.* 9,380-388.

Gefridis, L., & Welch, K. (2011). Forensic biology: Serology and DNA. In A. Mozayani, & C. Noziglia (Eds.), *The forensic laboratory handbook procedures and practice* (pp. 16–49). (2<sup>nd</sup> Ed.). London: Humana Press.

Griffiths, K., Partis, L., Croan, D., Wang, N., & Emslie, K. R. (2002). *Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food*. Australian Government Department of Agriculture Fisheries & Forestry.

Grundy H.H., Kelly S.D., Charlton A.J., Donarski J.A., Hird S.J., Hird H.J. and Collins M.J. (2012). Food Authenticity and Food Fraud Research: Achievements and Emerging Issues. *Journal of the Association of Public Analysts (Online)* 40, 65-68.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.

Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., and deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*, 270, 313–321.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 968-994.

Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Esteve T, Prat S & Pla M (2003) Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Anal Biochem* 323, 164-170.

Hilbeck, A., Binimelis, R., Defarge, N., Steinbrecher, R., Székács, A., Wickson, F., Antoniou, M., Bereano, P. L., Clark, E., A., Hansen, M., Novotny, E., Heinemann, J., Meyer, H., Shiva, V. & Wynne, B. (2015). No scientific consensus on GMO safety. *Environmental Sciences Europe* 27:4

Holland, P.M, Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′–3′-exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7276–7280.

Holst-Jensen, A., De Loose, M., & Van den Eede, G. (2006). Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(8), 2799-2809.

Holst-Jensen, A., Rønning, S. B., Løvseth, A. & Berdal, K. G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 375, n. 8, p. 985-993.

INAC (Instituto Nacional de Carnes). Uruguay, país ganadero. Disponible en: <[http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/3104/1/innova.net/uruguay\\_pais\\_ganadero](http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/3104/1/innova.net/uruguay_pais_ganadero)> Último acceso: 24-9-2017

ISAAA (2015). Pocket K No. 16: Biotech Crop Highlights in 2015. Disponible en: <<http://isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/default.asp>> Último acceso: 24-9-2017

James, Clive. (2015). 20th Anniversary of the Global Commercialization of Biotech Crops (1996 to 2015) and Biotech Crop Highlights in 2015. *ISAAA Brief* No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.

ISAAA (2016). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. Disponible en: <<http://africenter.isaaa.org/wp-content/uploads/2017/06/ISAAA-Brief-52-Executive-Summary.pdf>> Último acceso: 6-12-2017

Klein, J., Altenbuchner, J., & Mattes, R. (1998). Nucleic acid and protein elimination during the sugar manufacturing process of conventional and transgenic sugar beets. *Journal of Biotechnology*, 60, 145–153.

Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F. X. & Wilson A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 16, p. 6196-6200.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jona´k, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95–125.

Lauri Andrea & Mariani Paola O. (2008). Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes Nutr.* 4:1 – 12.

Lin WF, Shiao CY, Hwang DF (2005) Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome b gene sequence and PCR-RFLP analysis. *J Food Drug Anal*, 13, 382–387.

Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11(2), 67–77.

López-Andreo M., Aldeguer M., Guillén I., Gabaldón J. A., Puyet A. (2012). Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA. *Food Chemistry* 134, 518–523.

Lopez-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto MI, Puyet A (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 339:73–82.

Mafra, I., Ferreira, I. M. P. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. O. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649–665.

Manning, L. & Soon, J. M. (2014). Developing systems to control food adulteration. *FoodPolicy*, 49, 23–32.

Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., et al. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82(2), 252–259.

Matsunaga, T., Chikuni K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *MeatScience*, 51, 143-148.

Ministerio de Economía y Finanzas (2017). Manual de Defensa del Consumidor. Disponible en: <<https://www.mef.gub.uy/10406/9/areas/manual-de-defensa-del-consumidor-en-uruguay.html>> Último acceso: 6-12-2017

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. División Industria Animal: Funciones – Departamento técnico. Disponible en: <<http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-ganaderos/institucional/estructura-organizativa/sanidad-animal/industria-animal>> Último acceso: 24-9-2017

Meyer, R., Hofelein, C., Luthy, J., & Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International* 78, 1542–1551.

Miraglia, M., Berdahl, K. G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E. J., Marvin, H. J., Schimmel, H., Rentsch, J., Van Rie, J. P. & Zagon, J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, n. 42, p. 1157-1180.

Núcleo Interdisciplinario Colectivo TÁ. Espacio Interdisciplinario. Disponible en: <[http://www.ei.udelar.edu.uy/renderPage/index/pageId/902#heading\\_6210](http://www.ei.udelar.edu.uy/renderPage/index/pageId/902#heading_6210)> Último acceso: 6-12-2017

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Encefalopatía espongiforme bovina (EEB). Disponible en: <<http://www.oie.int/doc/ged/D13945.PDF>> Último acceso: 24-9-2017

Organizacion Mundial de la Salud (OMS) (2005). Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias. ISBN 92 4 159305, Disponible en: <[http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_sp.pdf)> Último acceso: 6-12-2017

Pascoal A, Prado M, Castro J, Cepeda A, Barros-Velásquez J (2004) Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. *Eur Food Res Technol* 218:306–312

Pearson A.M. and Tauber F. W. (1984), Processed Meats, AVI, Westport Connecticut

Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. (1999). Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol.* 48, 427–34.

Poder Legislativo (2000). Ley Nº 17.250. Defensa del consumidor.

Poder Legislativo (2011). Ley Nº 18.792. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

Premanandh, J. (2011). Global consensus – Need of the hour for genetically modified organisms (GMO) labeling. *Journal of Commercial Biotechnology*, 17, 37 – 44.

Ram, J. L., Ram, M. L., and Baidoun, F. F. (1996). Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 2460–2467.

Recomendación de la Comisión 2013/99/UE (19 de febrero de 2013) sobre un plan coordinado de control para establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de determinados alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea

Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto Nº 315/994 (5 de Julio de 1994).

Reglamento (EC) No 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo (28 de enero de 2002) Artículo 18 (2002). Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Reglamento (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo (25 de octubre de 2011). Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Reglamento 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. Disponible en: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2003R1829:20070112:ES:PDF>> Último acceso: 7-12-2017

Ren, Y.; Li, X.; Liu, Y.; Yang, L.; Cai, Y.; Quan, S.; Pan, L.; Chen, S. (2017). A novel quantitative real-time PCR method for identification and quantification of mammalian and poultry species in foods. *Food Control*. 76, 42–51.

Ririe KM, Rasmunssen RP & Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154-160.

Rizzi A., Sorlini C., Mannino S. & Daffonchio D. (2007) Ensuring Biosafety through Monitoring of GMO in Food with Modern Analytical Techniques, a Case Study. *Food Safety*; 281, 291–294

Robin ED, Wong R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*; 36:507–13.

Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Hernández, P. E., & Martín, R. (2005). TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70, 113–120.

Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., et al. (2010). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Contaminants and Additives*, 27, 749–763.

Rossen, L., Norskov, P., Holmstom, K., & Rasmussen, O. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.*, 17, 37-45.

Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E., Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, n. 17 p. 914-921.

Sawyer J, Wood C, Shanahan D, Gout S, McDowell D (2003) Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* 14:579–583.

Shears, P. (2008). Food fraud - A current issue but an old problem. *Plymouth Law Review*, 118-139.

Shewry P. R., Jones, H. D., Halford, N. G. (2008) Plant Biotechnology: Transgenic Crops. *Adv BiochemEngin/Biotechnol* 111: 149–186.

Simmon, R.B., Weller, S. J. (2001). Utility and evolution of cytochrome b in insects. *MolPhylogenEvol*, 20(2), 196-210.

Spink J, Helferich OK, Griggs JE. (2010). Combating the impact of product counterfeiting. *Distribution Bus Manage J* 10(1):6. Buscarlo o alternativa cadenas se han acelerado y llegado a la población mundial. Sacado de Spink y Moyer 2011.

Spink, J., & Moyer, D. C. (2011a). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), R157–R162.

Spink, J., Moyer D. C., Park, H., Wud Y., Fersht V., Shao B., Hong M., Paek S. Y., Edelev D. (2015). Introducing Food Fraud including translation and interpretation to Russian, Korean, and Chinese languages. *Food Chemistry* 189 (2015) 102–107

Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Goudry, R.A., and Balis, U. (1997b). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22, 176-181.

Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., and Rasmussen, R.P. (1997a). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 134-138.

Yearbook, F.S., 2012. World Food and Agriculture, 2012, URL <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>. Último acceso 21-12-2017

Zagon, J., Schmidt, J., Schmidt A. S., Broll H., Lampen A., Seidler T., Braeuning A. (2017). A novel screening approach based on six real-time PCR systems for the detection of crustacean species in food. *Food Control* 79, 27-34.

Zhang HL, Sun XD, Liu YD. (2011) Food safety and technological implications of food traceability systems. *Computer and Computing Technologies in Agriculture IV*, PT 2; 345:1-10.

## ANEXO - Abreviaturas

---

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**FAO:** Food and Agriculture Organization.

**FSA:** Food Standards Agency

**FSAI:** Food Safety Authority of Ireland

**GC:** Cromatografía de gases.

**LC-MS:** Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas

**GC-MS:** Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas.

**GM:** Genéticamente modificado.

**HLPC:** Cromatografía líquida de alta eficacia.

**INAC:** Instituto Nacional de Carnes

**IRMM:** Institute for Reference Materials and Measurements (Geel, Bélgica).

**ISAAA:** International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications.

**JRC:** Compendium of reference methods for GMO analysis.

**MEF:** Ministerio de Economía y Finanzas

**MGAP:** Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

**MRC:** Materiales de Referencia Certificados

**NMR:** Resonancia Magnética Nuclear

**OGM:** Organismo Genéticamente Modificado.

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction).

**pb:** pares de bases

**qPCR:** PCR en Tiempo Real

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**Taq:** ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*

**TBE:** Buffer compuesto por Tris, borato y EDTA, de uso frecuente en electroforesis.

**TEMED:** Tetrametiletilendiamina.