

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**Técnicas Basadas en Proteínas y ADN para la  
Determinación de Adulterantes en Productos Cárnicos**

**M O N O G R A F Í A**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Ingeniero en Alimentos

PRESENTA

P.D.Ing. en Alim. Cortes López Mario Alberto

Director: M. en C. Sergio Soto Simental

Tulancingo de Bravo, Hgo. Enero 2010



## AGRADECIMIENTOS

*Al M. en C. Sergio Solo Simentel, gracias por apoyarme, brindarme la confianza, su amistad por que lo considero mi amigo, gracias por el apoyo y asesoramiento recibido durante toda mi formación profesional, no tengo como agradecerle todo lo que ha hecho por mí, gracias por sus consejos.*

*Al M en C. Jesús Espino García, una gran persona, gracias por brindarme su amistad, sus consejos, sus asesorías hasta muy tarde después de sus horas de trabajo, sus regaños, y también por soportarme usted fue uno de mis profesores que me inspiraron en mi formación profesional gracias.*

*Al M en C. Dalia Erika Islas por su apoyo, por el jalón de orejas, que hizo que regresar a mi camino, por preocuparse por mí.*

*A mis revisores de tesis, Dr. Marlin Meza Nieto, Dra. Adriana Inés Rodríguez, Dra. Rosa Blanca Pastrana, por sus asesorías, su tiempo y por su apoyo.*

*A mis profesores durante mi formación profesional, M en C. Jesús Espino García, Dra. Norma Güemes, Dr. Juan Francisco Hernández Chávez, gracias por sus consejos, sus enseñanzas y por dar lo mejor de cada uno.*

## DEDICATORIAS

*Dedico esta tesis a todas las personas que se encuentran a mi alrededor y que me apoyaron incondicionalmente en mi desarrollo profesional.*

*A mi madre por que tuvo todo el suficiente valor de afrontar todos los problemas que se presentaron, por grandes que estuvieron y que fue pieza clave para mi desarrollo personal y profesional, por su preocupaciones, siempre estaré agradecido por todo su esfuerzo que ha realizado, para verme convertido en un profesionista T.Q.M y ahora me toca darle todo mamá "gracias".*

*A Lorena por toda su comprensión, amor y cariño como pareja y que siempre estuvo apoyándome en todos los problemas que se presentaban y además por todas las excelentes correcciones, regaños y consejos que fueron excelentes para mi T.E. AMO MUCHO y sabes que eres muy importante en mi vida.*

*A mi amigo Saúl Cortes sabes cual es nuestra amistad gracias por todos los consejos como amigo, por estar en las buenas y*

*en las malas, por brindarme su tiempo, su confianza, gracias carnal.*

*A Jorge Terrzas gracias por preocuparte por mi, por apoyarme, por escucharme, por brindarme tu amistad eres un gran amigo.*

*Éliblhel gracias por tu amistad, por tu apoyo en clases, por echarme la mano cuando mas lo necesitaba en los talleres en verdad te lo agradezco por que si no me hubieras ayudado yo creo que me quedo un semestres gracias sabes que eres una de mis mejores amigas he ojala que no cambies y que sigamos en contacto, no se le olvide nuestra amistad.*

*A Fernando Carvajal (Malaga, España) ese fer el "wey". Gracias por la amistad que me brindaste, la confianza, eres un gran amigo, tus consejos me han ayudado, y sobre todo las pedas que pasamos eran mortales.*

*A loño, que puedo decir de ti eres uno de los pocos amigos que tengo, gracias por la amistad, por las platicas, que creo que a veces nos han ayudado a los dos, espero que nunca cambien la amistad entre los dos y perdón por los malos ratos que te haya hecho pasar un ejemplo el 14 de enero 2010 discúlpame amigo, pero gracias por ayudarme ese y todos los días gracias.*

*Y juntos hemos vivido momentos increíbles, padres, de desmadre, de acabarnos el alcohol hasta no dejar ninguna gota*

*espero y eso siga pasando he canijos y si por el destino nos separamos por un tiempo espero que el rencuentro sea inolvidable como nuestra amistad y nuestros desmadres gracias canijos y ya saben lo que les deseo.*

*Y finalmente a Meche, Coño, Rogelio, Hahir, Cristina, Hadira, Rulo, Angeles, Arely, Viridiana, Jaqueline, kari, Clarita, Edgar, Monse, (Diana, Samantha (Forestales)), Sergio Bautista, Coño Miranda, Dayana, Danae Pineda, Emi, Zury, Borre por hacer una estancia agradable, especial y divertida por que, en su momento cada uno me brindo su amistad*

**Ing. En Alim. Mario Alberto Cortes López**



**ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
Objetivo general.....	3
Objetivos particulares.....	3
<b>CAPITULO 1. ESTRUCTURA Y PERSPECTIVA DE LA INDUSTRIA DE PRODUCTOS CARNICOS EN MÉXICO.....</b>	<b>4</b>
1.1 Importancia de la carne como alimento.....	4
1.2 El sector agropecuario.....	6
1.3 La industria de alimentos en México.....	12
1.3.1 La industria Cárnica en México.....	15
<b>CAPITULO 2. INGREDIENTES DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS TERMICAMENTE PROCESADOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 Sal común.....	18

2.2 Sales de cura .....	19
2.3 Acido Ascórbico-Ascorbato.....	21
2.4 Azúcares.....	21
2.5 Especies.....	22
2.6 Féculas.....	22
2.7 Proteínas no cárnicas.....	23
2.8 Fosfatos.....	26
2.9 Conservadores.....	27
<b>CAPITULO 3. LEGISLACIÓN APLICABLE EN LA ADULTERACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 La calidad de los productos cárnicos en México.....	28
3.2 Adulteración, un problema en los productos cárnicos.....	28
3.3 Normativa Europea sobre trazabilidad alimentaria.....	31
3.3.1 Legislación Europea sobre etiquetado de productos cárnicos.....	32
3.4 Legislación en México de productos cárnicos.....	34

3.5 Trazabilidad una herramienta decisiva para la seguridad y la protección de los consumidores.....	36
3.5.1 Trazabilidad en Cárnicos.....	39
3.5.2 Trazabilidad en Productos Cárnicos.....	40
3.6 Empresas Relacionadas con la Trazabilidad alimentaria que operan en territorio Mexicano.....	41
<b>CAPITULO 4. INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE FRAUDES EN PRODUCTOS CÁRNICOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Alimentos y biología molecular.....	43
4.2 Técnicas Analíticas para Determinar la Autenticidad de Productos Cárnicos.....	45
4.2.1 Electroforesis Capilar.....	47
4.2.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	51
4.2.2.2 Análisis Cualitativo de ADN mediante PCR.....	52
4.2.2.2.1 Análisis de Polimorfismos de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP).....	53
4.2.2.2.2 Análisis de Conformación de Polimorfismos de Cadena Sencilla (SSCP).....	53



4.2.2.2.3 Análisis de Perfiles de ADN por Amplificación Aleatoria (RAPD).....	54
4.2.2.2.4 Análisis de Polimorfismos de los Fragmentos de Restricción de Satélites (SFLP).....	55
4.2.2.3 Análisis Cuantitativo de ADN mediante PCR.....	57
4.2.2.3.1 PCR Anidada.....	57
4.2.2.3.2 PCR Competitiva.....	57
4.2.2.3.3 PCR en Tiempo Real.....	58
4.2.2.3.4 Dilución Limite de PCR.....	58

**CAPITULO 5. TECNICAS ANÁLITICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS ADULTERADOS ..... 59**

5.1 Autenticación de Especies Cárnicas en Productos Procesados Térmicamente.....	59
5.2 Técnicas de identificación de especies animales basados en ADN.....	60
5.2.1 ADN Mitocondrial (mt ADN).....	61
5.2.1.1 Características del ADN mitocondrial.....	62

5.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	64
5.2.3 Secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR.....	69
5.3 Técnicas de identificación de especies animales basados en el Análisis de Proteínas.....	71
5.3.1 Técnicas Electroforéticas.....	73
5.3.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (sdspage).....	74
5.3.1.2 Técnicas Inmunoenzimatica (ELISA).....	
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>82</b>

**ÍNDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.</b> Tasas de Crecimiento Medio Anual del PIB del Sector Agropecuario, durante los últimos 60 años.....	8
<b>Cuadro 2.</b> Estructura del valor de la producción pecuaria por tipo de productos. ....	10
<b>Cuadro 3.</b> Producción en valores básicos de las industrias manufacturera, alimentaria y de las bebidas y del tabaco.....	14
<b>Cuadro 4.</b> Consumo intermedio de las industrias manufacturera, alimentaria y de las bebidas y del tabaco. ....	15
<b>Cuadro 5.</b> Producto interno bruto de la industria manufacturera y cárnica y crecimiento porcentual anual promedio. 1960-2007.....	17
<b>Cuadro 6.</b> Efectividad de los aditivos en la producción de embutidos blandos (+ = influencia escasa; ++ = Influencia acentuada).....	19
<b>Cuadro 7.</b> Composición de los productos de proteína de soya.....	25

<b>Cuadro 8.</b> Usos de las proteínas de la leche en productos cárnicos.....	26
<b>Cuadro 9.</b> Algunas marcas de salchichas que adulteran su producto en México.....	31
<b>Cuadro 10.</b> Evolución de la legislación europea en materia de etiquetado de alimentos cárnicos para consumo humano.....	32
<b>Cuadro 11.</b> Aplicaciones principales de la biología molecular.....	44
<b>Cuadro 12.</b> Características de electroforesis capilar (EC).....	48
<b>Cuadro 13.</b> Modalidades de la Electroforesis Capilar y sus Aplicaciones en el Análisis de Moléculas.....	50
<b>Cuadro 14.</b> Comparación de técnicas de análisis de ADN cualitativas.....	56

<b>Cuadro 15 y 16. Métodos de análisis de proteína y ADN.....</b>	60
	61

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Evolución del PIB Agropecuario y PIB no Agropecuario.....	10
<b>Figura 2.</b> Reacción del Nitrógeno en la carne.....	20
<b>Figura 3.</b> Relación de los campos de acción de la biotecnología de alimentos.....	43
<b>Figura 4.</b> ADN mitocondrial de los animales. ....	64
<b>Figura 5.</b> Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....	66
<b>Figura 6.</b> Técnica de ELISA.....	77

## INTRODUCCIÓN

La adulteración es un problema que ha acompañado a la industrialización de los productos cárnicos procesados, siendo el consumidor, el perjudicado final ante los fraudes cometidos. La adulteración de los alimentos no sólo perjudica al consumidor, sino también al sector productivo ya que la industria transformadora puede comprar materia prima de calidad inferior, ocasionando una competencia desleal. La pérdida de calidad del producto y la consiguiente insatisfacción del cliente final es también un factor que debe de ser considerado.

La adulteración de la carne y los productos cárnicos, pueden ocurrir tanto en el producto fresco como en el procesado. En el caso de la carne, la autenticidad se centra en la identificación de la especie animal, ya que existen grandes diferencias de precio de acuerdo a ésta. Por lo que en ocasiones se sustituyen proporciones totales o parciales de carne de una especie por otra, sin hacer la declaración pertinente en la etiqueta del producto.

En la mayoría de los países, la legislación se muestra cada día más estricta, dejando poco espacio para las prácticas fraudulentas. A pesar de ello, los controles de las autoridades reguladoras se limitan en la mayor parte, a los casos de análisis de rutina, los cuales no detectan posibles adulteraciones. Por ello, se requieren de métodos que permitan abordar el problema de una forma eficaz y específica. La utilización de marcadores que puedan ser identificados dentro de un producto cárnico y que permita la discriminación entre muestras de carne o producto cárnico es importante para desarrollar técnicas que realicen esta función, las moléculas de proteínas y Ácido Desoxirribonucleico (ADN) pueden ser utilizados con dicho fin.

Los brotes de algunas enfermedades que pueden llegar a afectar al consumidor, como la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), así como la proliferación de los alimentos genéticamente modificados (OMG), han propiciado la desconfianza de los consumidores respecto al consumo de carne y alimentos OMG. Con ello se ha hecho urgente la necesidad de asegurar la implementación de medidas adecuadas de control de calidad de los alimentos. En la Unión Europea, se ha producido un progreso considerable en lo que respecta a la implementación de reglamentaciones en el sector de control de calidad de alimentos, incluyendo OMG (Anklam y Bataglia., 2001; Colgan et al., 2001; García-Cañas et al., 2002a).

Además del problema de una calidad inferior en el alimento adulterado, existe un gran porcentaje de individuos con problemas de alergia. Cuando se identifica de una manera concluyente el alérgeno, el alimento responsable debe de ser eliminado de la dieta en forma definitiva (Chandra y Prasad, 1994). El consumidor depende totalmente de la veracidad de la lista de ingredientes en el etiquetado y es responsabilidad de las agencias regulatorias, el verificar y asegurar que los productos contengan solo los ingredientes indicados en su etiqueta, ya que el consumidor podría estar restringido al consumo de ciertos ingredientes por razones de alergias, dietas o creencias religiosas (Calvo et al., 2001).

En México, existe la necesidad de implementar técnicas analíticas específicas y eficaces para determinar la autenticidad de la carne y los productos cárnicos procesados térmicamente. Con esto, las instancias regulatorias nacionales podrían estar capacitadas para aplicar y verificar la normatividad existente con el fin de controlar la calidad de los productos. Esto generaría una justa competencia que permita implementar estándares de calidad equivalentes a los establecidos por Estados Unidos, Canadá y la Comunidad Europea.



### **Objetivo general**

Discutir las diversas formas de adulterar productos cárnicos con diversas especies animales, así como las metodologías existentes para su valoración con el fin de reconocer las ventajas y desventajas de la utilización de técnicas que permitan evaluar la autenticidad de los productos cárnicos.

### **Objetivos particulares**

- Reconocer la importancia económica de la industria cárnica en México con el fin de entender las causas de una posible adulteración de productos cárnicos.
- Identificar los principios de la biología molecular y discutir las técnicas basadas en ADN y proteínas que más comúnmente se utilizan en la autenticidad de productos cárnicos.
- Analizar la posible aplicación de técnicas moleculares de ADN y proteínas que permitan mejorar la identificación de especie animal en la autenticidad de productos cárnicos procesados.

## **1. ESTRUCTURA Y PERSPECTIVA DE LA INDUSTRIA DE PRODUCTOS CARNICOS EN MÉXICO**

### **1.1 Importancia de la carne como alimento**

En la energía no hay movimiento, así como las máquinas requieren de combustibles para poder moverse, los seres vivos requieren del alimento que consumen para poder realizar su función. Por ello el alimento es clave para vivir. Por otro lado la vida de las plantas y animales inicia con el proceso de la fotosíntesis, llevado a cabo por las plantas. A partir de las plantas verdes como los organismos autótrofos, como inicio de la cadena alimentaria; pasando por los herbívoros, como segundo eslabón; por el tercer eslabón donde se encuentran consumidores secundarios, donde los carnívoros consumen herbívoros; posteriormente el cuarto eslabón donde los seres vivos carnívoros consumen carnívoros y finalmente se encuentran los descomponedores, que son capaces de producir sustancias inorgánicas a partir de los organismos muertos.

La energía que requiere el hombre para efectuar sus actividades deben provenir de diversas fuentes de alimentación, de otra manera el organismo se ve obligado a elaborar una gran variedad de sustancias que son indispensables para mantener la vida, que son necesarias para que el organismo realice sus múltiples y complejas funciones. Por otro lado, la nutrición comienza como arte, ya que inicia como un proceso de aprendizaje a través de la experiencia. Uno de los objetivos de la nutrición es el dirigir la selección de los alimentos y establecer hábitos de consumo deseables y equilibrados. Las personas que se dedican a la nutrición deben enfrentarse al problema de superar creencias y prejuicios de los alimentos. Estas personas deben al consumidor de utilizar algún alimento o ingrediente en específico (Lloyd, 1982).

Los cambios que ha sufrido el comercio internacional de alimentos ha permitido que estos sean exportados con gran facilidad lo que ha contribuido a que se puedan encontrar alimentos con gran facilidad y de diversa índole en regiones muy distintas del mundo, esto no sido ajeno a la nutrición pues de ser un arte se ha convertido en una ciencia (Bender, 1987).

Una de las principales cocinas en el mundo es la mexicana. Los distintos grupos étnicos de México prehispánico entendieron la prioridad de la vida, por lo que aprendieron a elaborar alimentos de lo que podían recolectar, cazar, pescar, cultivar y criar en el medio en que vivieron. Aunado a ello se mezclaron los productos introducidos por los europeos y otros pueblos, todo ello enriqueció la basta comida mexicana en algunos restaurantes y medios de difusión, pero se debería emprender iniciativas que resalten la importancia de los alimentos tradicionales en México, para hacerlas llegar a niños y jóvenes.

Lo anterior, debido a que grandes empresas de alimentos, utilizando medios masivos de comunicación ha extendido y difundido estilos de consumo que se incorporan cada día a nuestros hábitos alimenticios. Resaltan en esos medios y en estas empresas los productos light, que algunos de ellos no nos aportan nutrientes, y además marginan a otros productos tradicionales de mejor valor nutritivo. La cultura alimentaria en México necesita ser valorada en cada una de sus regiones, fomentando los valores de la vida y comprendiendo la relación existente entre la nutrición y el desarrollo biosocial.

## 1.2 El Sector Agropecuario

La industria cárnica se vincula en su totalidad con las actividades agrícolas, pecuarias y acuícolas, éstas proporcionan las materias primas que se procesan en las ramas que integran el sector. La dependencia de una función de producción biológica para la compra de insumos somete a la industria alimentaria a fluctuaciones tanto de disponibilidad de materia prima como de costos de producción (Rossdale *et al.*, 2003).

Algunos de los elementos importantes, derivados de la política económica, que inciden de manera directa en el desarrollo de la industria de los productos cárnicos procesados térmicamente son la tenencia de la tierra, el control de precios tanto de productos terminados como de insumos, la infraestructura de almacenamiento y de distribución, los programas de fomento a las actividades agropecuarias y la protección de la industria nacional frente a la competencia extranjera (Rossdale *et al.*, 2005).

En el sistema neoliberal el desarrollo del sector agropecuario no ha podido alcanzar las condiciones prevalecientes antes de 1980. La inversión pública en fomento rural disminuyó un 93.4% entre 1981 y 1999, lo que afectó tanto la necesaria expansión de la industria cárnica cuanto las inversiones requeridas para mantener en operación la previamente construida. Además el gasto público global en fomento rural declinó un 74.6% entre 1982 y 1999, con lo que disminuyeron las partidas estratégicas para investigación, extensionismo, sanidad animal, etc (Guerrero, 2004).

A pesar de esa baja inversión pública el campo agropecuario es el único sector en México que registra un crecimiento, aunque su productividad es

precaria, lo cual se hace evidente al observar que 26% de la población produce apenas 6% del Producto Interno Bruto (PIB). Durante la pasada administración federal, el PIB agropecuario disminuyó 1.5% en promedio anual, mientras que el PIB total aumentó 2.6% (Rossdale *et al.*, 2005).

El sector agropecuario ha tenido un crecimiento muy bajo en comparación con los años precedentes (**Cuadro 1**). El escaso crecimiento en el periodo 1982-1988 tiene su origen en las políticas neoliberales implantadas por el gobierno, las cuales generaron dos crisis económicas graves, en 1986 y en 1995 (Guerrero, 2004).

La industria de productos cárnicos procesados no ha escapado a estas crisis y sigue el mismo patrón de crecimiento que el sector agropecuario, por lo cual muchos procesadores de carne han optado por la adulteración de dichos productos para obtener un mejor rendimiento con el fin de obtener mejores ingresos, pero trae un problema grave para los consumidores, los cuales son los principales afectados. En efecto, las tasas de crecimiento más bajas experimentadas por esta industria desde 1940 fueron 0.5 y 1.5 por ciento para los periodos 1982-1988 y 1988-2008, respectivamente (Torres, 2009).

A pesar del pobre desempeño que ha demostrado la economía mexicana en general, y los sectores agropecuarios y alimentario en particular, con la puesta en práctica del modelo neoliberal, no se prevén cambios a éste, por lo que la industria alimentaria deben buscar una mejor manera de desarrollarse sobre las bases de la apertura comercial.

El sector agropecuario ha enfrentado transformaciones profundas durante las tres últimas décadas. El continuo proceso de urbanización, el intenso proceso de globalización y las transformaciones demográficas han configurado un nuevo entorno para el sector agropecuario (Escalante, *et. al.*, 2005 y 2007).

**Cuadro 1.** Tasas de Crecimiento Medio Anual del PIB del Sector Agropecuario, durante los últimos 60 años.

<b>Periodo</b>	<b>Agropecuario</b>	<b>Industria de Productos Cárnicos</b>	<b>Total</b>
1940-1950	5.8	-----	6.0
1950-1960	4.2	7.5	6.1
1960-1970	3.7	6.3	7.0
1970-1982	4.2	4.9	6.2
1982-1988	0.2	0.2	0.3
1988-1998	0.5	0.5	0.8
1998-2008	1.5	3.8	3.2

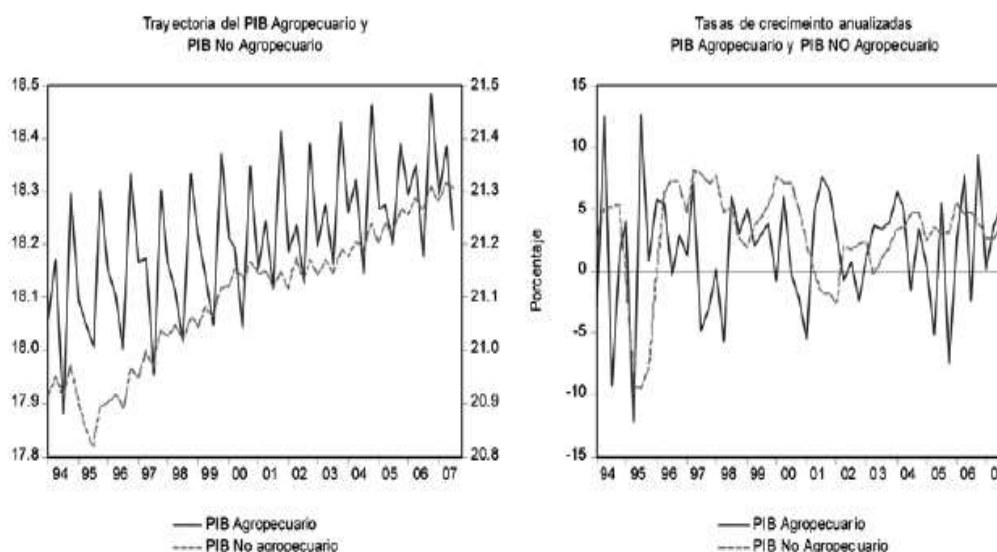
Fuente: I.Nuñez, 2008.

El cual se caracteriza por cambios tecnológicos que redundan en mejoras de la productividad, nuevos cultivos que se ajustan a las exigencias de un mercado internacional, modificaciones genéticas que mejoran las variedades de los productos, nuevos esquemas organizacionales que dinamicen las formas de comercialización y modifican los métodos de inserción en el mercado mundial e incluso, el surgimiento de nuevos esquemas de desarrollo rural (Hernández, 2005).

De la misma manera, estos cambios también impactan al sector agropecuario en sus interacciones con el mercado interno y tienden a polarizar la situación del campo entre un sector asociado al mercado exportador, que cuenta con inversiones cuantiosas que le permiten mejorar su productividad e introducir mejores tecnologías, y la agricultura tradicional de subsistencia que aumenta la producción sobre la base de métodos extensivos (Rodríguez *et al.*, 1998). Junto con ello, las acciones gubernamentales se han concentrado fundamentalmente en propiciar la reconversión productiva, diversificar los cultivos tradicionales, ofrecer asesoría tecnológica, generar infraestructura, atender los problemas derivados del desajuste en el equilibrio poblacional urbano-rural y las condiciones de incertidumbre del mercado.

La evolución de la producción agropecuaria es resultado de diversos factores, asociados a las condiciones internas del sector como: la tecnología, el incremento en la productividad, las condiciones laborales (Taylor, 1997) y a los movimientos cíclicos de la demanda relacionadas con las políticas económicas expansionistas o de estabilización. Además de los aspectos sociales y políticos que han jugado un papel relevante en la orientación de las políticas públicas hacia el sector (Zermeño, 1996; Escalante *et al.*, 1996).

No obstante, es posible identificar ciertas tendencias y patrones regulares en la producción agropecuaria, por ejemplo, en la **(Figura 1)**, se muestra la evolución del Producto Interno Bruto (PIB) Agropecuario y No Agropecuario, con información trimestral de 1994 a 2007. Ambas series muestran una trayectoria ascendente, siendo las actividades agrícolas la que presentan un fuerte componente estacional y una mayor volatilidad en sus niveles de producción, situación que se manifiesta con claridad al considerar las tasas anualizadas de crecimiento de ambas series.



**Figura 1.** Evolución del PIB Agropecuario y PIB no Agropecuario. Fuente: Con base en información de INEGI, 2007. Nota: la trayectoria del PIB Agropecuario y No Agropecuario la escala es logarítmica.

**Cuadro 2.** Estructura del valor de la producción pecuaria por tipo de productos.

Categoría	1990	1994	2000	2005
Carne de bovino	36.6	34.8	29.1	28.9
Carne de cerdo	10.8	10.2	9.8	9.1
Carne de pollo	12.3	15.3	20.1	22.2
Huevos de Aves (gallina)	12.4	12.7	14.7	14.2
Leche de vaca	23.8	23.5	23.4	22.5
Otros	4.1	3.4	2.9	3.1

Fuente: FAOSTAT, sitio de Internet <http://faostat.fao.org/default.aspx>



En resumen, los resultados muestran que el sector agropecuario en la última década, presentó una evolución diferente al resto de los sectores de la economía, caracterizada por un menor ritmo de crecimiento, con una mayor frecuencia de períodos de contracción, así como una mayor volatilidad que incrementa el riesgo en la producción. Uno de los aspectos que resultan relevantes en el análisis del sector agropecuario es identificar las tendencias a nivel de subsectores, es decir, la evolución de la producción agrícola, ganadera, silvícola y pesca, a fin de contar con una perspectiva más amplia de la producción agropecuaria.

Mientras en el caso de la ganadería, la producción de carne de bovino se mantiene como el principal producto, el cual contribuye con 29% del valor de la producción, no obstante que su contribución relativa muestra una clara tendencia descendente (**Cuadro 2**). En contraste, la producción de carne de pollo se consolida como uno de los principales productos en cuanto a su peso relativo en el valor de la producción, en 1990 aportaba sólo 12.3% y en 2005 llegó a ubicarse en 22.2%. De hecho entre los años de 1996 y 2003 el valor de la producción de pollo en términos reales registró un crecimiento promedio anual de 4.2%, en tanto que la carne de bovino muestra una ligera contracción del orden de 0.8% anual, para el mismo período.

La categoría de carne de cerdo muestra un descenso paulatino en su contribución al valor de la producción, en 2005 se ubicó en 9.1%. En general, no ha tenido un buen desempeño en los últimos cinco años, entre 2000 y 2005 registra una caída en el valor de la producción de 4.4% anual en términos reales. Por su parte, el valor de la producción de leche entera de vaca también registra un descenso, pasando de 23.8% en 1990 a 22.5% en 2005, asimismo, entre 2000 y 2005 reportó un descenso en el valor de la producción del orden de 3.6% anual en términos reales (Ibarra, 2006).

En lo que se refiere a la producción de huevo, se observa que desde mediados de la década de los noventa registra un dinámica ascendente, en efecto, entre 1996 y 2003 mantuvo un ritmo de crecimiento de 2.7% anual, en términos reales, lo cual le ha permitido contribuir, en el 2005, con 14.2% del valor de la producción del subsector pecuario. Así, la expansión registrada en la producción pecuaria en los últimos quince años ha estado sostenida básicamente por la producción de carne de pollo y huevo, en tanto que los productos tradicionales como la carne de bovino, de cerdo y leche de vaca presentan una tendencia claramente descendente (Cruz, 2006).

Cabe destacar, que a nivel internacional la producción pecuaria pasa cada vez más de los bovinos y otros rumiantes que se alimentan de pasto y forrajes, a los cerdos y a las aves de corral, criados con concentrados balanceados. El centro de gravedad de la producción pecuaria se ha trasladado de las comunidades agrícolas rurales hacia las afueras de los principales centros urbanos. De este modo, la producción se concentra en empresas industriales avícolas y porcinas localizadas en y alrededor de los principales centros urbanos, donde los productores tienen fácil acceso tanto a insumos y concentrados balanceados baratos como a mercados dinámicos para la carne y los huevos (FAO, 2005).

### **1.3 La Industria de Alimentos en México**

La industria alimentaria, a diferencia de la agricultura, parece aludir el fenómeno de inflexibilidad presente en esta última. Con cada vez mas facilidades para instalarse en ambientes distintos del agrícola, ha adquirido un papel netamente internacional (Rivera, 2002).

Por ello, el estudio del sistema agroalimentario mundial se centra en la declinación de la agricultura como actividad productiva específica y del viejo papel

productor independiente. Los que encabezan la competencia en la producción y distribución de alimentos, son los complejos agroindustriales, los cuales están integrados en productoras de semillas, agrobiotecnológicas, agroquímicas, alimentarias, que además tienen la capacidad para colocar sus productos en diversas partes del planeta (Chaevet y González, 2001).

La actividad manufacturera en México está integrada por nueve ramas económicas: Alimentos, bebidas y tabaco; textiles, vestido y cuero; madera y sus productos; imprenta y editoriales; químicos, derivados del petróleo, caucho y plástico; minerales no metálicos, excepto del petróleo; industrias metálicas básicas; productos metálicos, maquinaria y equipo, y otras industrias manufactureras (**Cuadro 3**). Entre estas, destaca la de alimentos por su importancia estratégica, que se encarga de suministrar estos a una población creciente, permite conservarlos desde que se obtienen hasta que se consumen, mantienen excedentes, agrega valor al producto y satisface nuevas necesidades de consumo. Además, tiene un alto peso en la economía. En el periodo 1994-1998 esta industria contribuyó con 25.1% del valor agregado bruto; 24.7% de la producción bruta; 17.4% de las remuneraciones de asalariados y 19.5% del personal ocupado.

En cuanto a su evolución reciente, el decenio de los sesenta corresponde a un periodo expansivo y de consolidación de la industria alimentaria ver tabla 2. De 1960 a 1965 los establecimientos de esta industria aumentaron 25.1% y la ocupación 97.6% gracias a los productos cárnicos principalmente los procesados térmicamente. La tasa de crecimiento promedio anual del Producto Interno Bruto (PIB) en el decenio 1960-1970 fue de 5.9%. Sin embargo, en el quinquenio 1975-1980 esta actividad resintió una de sus mayores crisis, al disminuir 21.1% el número de establecimientos, aunque la ocupación creció 3.1%. De 1985 a 1988 la industria alimentaria mexicana logró recuperarse e incluso superar los niveles

anteriores de crecimiento; sin embargo, la ocupación resintió las inercias negativas precedentes y apenas aumentó 2.1%. Es importante señalar que en el decenio de los ochenta la industria cárnica creció a una tasa promedio anual 2.4%, superior a la de la industria manufacturera en su conjunto. Son varias las razones que explican el crecimiento de la industria cárnica durante estos años

**Cuadro 3.** Producción en valores básicos de las industrias manufacturera, alimentaria y de las bebidas y del tabaco.

Año	Industria manufacturera	Industria alimentaria	Industria de las bebidas y del tabaco
<b>A Precios corrientes</b>			
2003	4 073 804	761 853	173 231
2004	4 727 358	853 605	188 164
2005	5 147 141	911 305	206 613
<b>A Precios constantes</b>			
2003	4 073 804	761 853	173 231
2004	4 309 912	786 041	186 561
2005	4 519 701	808 233	200 522

Fuente: INEGI, 2006.

. Sin duda, la más importante es la desaceleración general de la economía mexicana, que se tradujo en menores ingresos y en modificaciones de los patrones de consumo, con tendencia a un mayor consumo de bienes básicos, en especial alimento. Ahora bien, en el periodo de recuperación económica, de 1988 a 1993, la industria alimentaria reivindicó su carácter dinámico, coincidente con el incremento relativo de la inflamación y el retorno de las tendencias a diversificar el consumo (Torres, 2009).

En el **Cuadro 4**, se puede observar que en la industria de alimentos desde 2003 a 2006 existe un incremento positivo en el consumo intermedio. Mientras que la participación de la industria alimentaria dentro del sector manufacturero fluctuó entre el 14 y 16% de dicho sector.

**Cuadro 4.** Consumo intermedio de las industrias manufacturera, alimentaria y de las bebidas y del tabaco.

<b>Año</b>	<b>Industria manufacturera</b>	<b>Industria alimentaria</b>
<b>A Precios corrientes</b>		
2003	2 728 420	460 444
2004	3 197 650	521 744
2005	3 517 461	558 307
2006	3 940 447	590 838
<b>A Precios constantes</b>		
2003	2 728 420	460 444
2004	2 911 605	474 635
2005	3 071 562	488 641
2006	3 344 367	499 277

Fuente: INEGI 2006.

### **1.3.1 La Industria Cárnica en México.**

La industria cárnica, se inicia en el rastro la industrialización de cerdos y bovinos. Hay cuatro tipos de rastros: los municipales o locales, los privados, los tipos inspección federal (TIF) y otros (incluye la matanza clandestina). Los TIF son

los que cuentan con un mejor control de calidad e higiene y los utilizan las principales empresas del sector (De la torre, 2008).

La transformación de la carne y elaboración de productos cárnicos comenzó en Europa con la necesidad de aprovechar toda la materia prima como también aumentar el periodo de conservación de ésta con motivo de la escasez de carne y demás alimentos en periodos invernales y para los marineros en sus largas travesías. La mayoría de productos son de origen europeo con embutidos prensados, fermentados, ahumados entre otros. Al principio la elaboración de éstos se realizaba en forma casera procesándolos de una forma rústica la cual aún se hace en algunos lugares, pero con el paso del tiempo se ha creado e innovado tecnología así como maquinaria para la ayuda en la industria cárnica (Shwedel, 2008).

La industrialización se lleva a cabo en el obrador, donde se efectúa el despiece o desbaratado del animal, para obtener diversos cortes de carne para consumo directo o uso industrial. Los obradores surten a tablajeros (Carne curada), al sector de frituras (en el caso de cerdo, para la elaboración de cuero, chicharrón prensado y manteca), a viscereros y a empacadores de carnes frías es el que agrega más valor a los productos (Werner, 1995).

En 1993 las empresas empacadoras recibieron 30% de la oferta de carne en canal. Esta industria tiene dos canales de distribución: las tiendas de autoservicio (45%) y el mercado detallista (55%). La incorporación de la carne de pavo y de las pastas de carne de ave para sustituir las de res y cerdo respectivamente, permitió a la industria empacadora incrementar en forma significativa su producción de 1990 a 1995 a una tasa media anual de 6.3%, para alcanzar las 401 000 toneladas (**Cuadro 5**). Es importante señalar que la

incorporación de pasta de ave comenzó a principios de los años noventa (De la torre, 2008).

**Cuadro 5.** Producto interno bruto de la industria manufacturera y cárnica y crecimiento porcentual anual promedio. 1960-2007.

<b>Industria</b>	<b>1960-1970</b>	<b>1970-1980</b>	<b>1980-1990</b>	<b>1983-2007</b>
Manufacturera	7.8	6.3	2.0	3.25
Cárnica	5.9	4.9	2.4	2.95

Fuente: Shwedel, 2008

En México, la industria cárnica representa más del dos por ciento del PIB, ello implica la trascendencia que reviste esta industria en la vida de los mexicanos, y con ello la importancia industrial, económica, social y cultural. Lo anterior, indica que el hecho de procesar carne para producir productos cárnicos con valor agregado es rentable, ya que el consumo per cápita de carne y productos cárnicos se incrementa año con año (40.6 kg en 1998 a 95 kg en 2008), dentro de este incremento se ha registrado la mayor parte en productos cárnicos cocidos de ave, lo cual puede provocar un conflicto de interés entre los procesadores de carne y los consumidores, debido principalmente a que los consumidores esperan consumir productos con alto contenido de carne y con carne de la especie animal declarada en las etiquetas de los productos, sin embargo según la PROFECO (2005) en un estudio de calidad de salchichas existen marcas comerciales que no declaran ingredientes o bien especie animal con la cual se elaboran esos productos, lo cual puede constituir una adulteración del producto.

## **2. INGREDIENTES DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS TÉRMICAMENTE PROCESADOS**

De acuerdo a la norma NCR 146: 1991 PRODUCTOS CÁRNICOS. CDU 637.52:664.93 y la norma NMX-F-065-1984. ALIMENTOS. ESPECIFICACIONES. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. Estas normas establecen los requisitos que deben cumplir los productos cárnicos y las especificaciones para la elaboración del producto. Se utilizan materias primas o ingredientes de calidad sanitaria, que apliquen buenas técnicas de elaboración, que se elaboren en locales e instalaciones bajo condiciones higiénicas, que se aseguren que el producto es apto para el consumo humano.

### **2.1 Sal Común**

El cloruro de sodio es uno de los ingredientes de curado más antiguos utilizados en la conservación de la carne. Esta molécula, generalmente conocida como sal común, es una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS). La sal común es un sólido blanco y cristalino, con una pureza de 99.8 a 99.9% en sales comerciales. La sal común es un ingrediente multifuncional, es una sustancia soluble en agua, formando iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en solución, esta disociación determina sus funciones en el producto cárnico. La fuerza iónica es crítica en la solubilización y extracción de las proteínas solubles en sal, las cuales son necesarias para la estabilización de la grasa en productos emulsionados y determina la textura del producto. Una concentración de sal de 2% en el producto es necesaria para mantener una fuerza iónica de 0.5, lo cual provoca la desintegración de los filamentos de miosina y la solubilización de las proteínas miofibrilares (Sebranek, 2009).



El cloruro de sodio como sustancia potenciadora de sabor, ya que la carne y el tocino, carentes de sal son insípidos. Pero por añadidura la sal común influye sobre los procesos físicos-químicos y microbianos de maduración que se desarrollan durante el curado y desecado. La carne cede agua y con ella proteínas solubles, que entre otras cosas desempeñan un importante papel en la textura y consistencia de la masa embutida. Además, al adicionar sal se reduce la actividad de agua ( $A_w$ ) de la masa embutida, con lo cual diversos microorganismos, en especial ciertas bacterias patógenas se ven perjudicadas en su vitalidad y capacidad de multiplicación (Sebranek, 2009).

**Cuadro 6.** Efectividad de los aditivos en la producción de embutidos blandos.

	Enrojecimiento	Estabilidad color	Consistencia	Resistencia Corte	Sabor	Aroma	Capacidad conservadora
Sal común				+	++		+
Nitrato/ Nitrito	++	++			+		+
GDL	+	+	+	++			+
Azúcares	+	+	+	++	+	++	+
Ac.	++	++					+
Ascórbico							
Cultivos	++	++	++	++	++	++	++

Fuente: Werner, 1995. (+ = influencia escasa; ++ = Influencia acentuada).

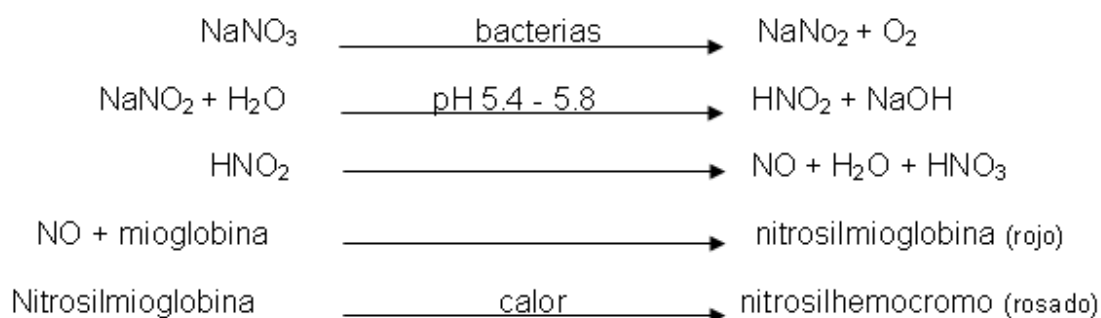
## 2.2 Sales de Cura

Las sales de cura se emplean como aditivos en la fabricación de productos cárnicos curados y, en menor medida, en la conservación del pescado y en la producción de queso. Además de proporcionar color adecuado a la carne.

El nitrito, como sal, es un ingrediente multifuncional en la carne curada pero, en el caso de nitrito, estas funciones se logran con extremadamente concentraciones del 50-100 ppm de nitrito, es adecuado alcanzar las funciones múltiples del nitrito en carnes curadas. Las funciones del nitrito en carne curada han sido extensivamente estudiada y está claro que el nitrito es responsable del

color de la carne curada, del flavor, del sabor, y de la inhibición bacteriana, sin embargo, los medios por los cuales el nitrito alcanza estas funciones no está entendida totalmente en todos los casos (Sebranek, 2009).

El efecto del nitrito sobre la carne es resultado del color rojo en la carne. Es también un buen ejemplo de la complejidad de las reacciones del nitrito en carne porque el nitrito no actúa directamente como agente nitrosilaminado sino forma el óxido nítrico por diversos mecanismos, dependiendo las condiciones. La producción de óxido nítrico del nitrito es un paso necesario para el color de la carne curada porque es el óxido nítrico que reacciona posteriormente con el mioglobulina para producir el pigmento rojo/rosado de la carne que es típico de color de la carne curada, el nitrito se disuelve en la fase acuosa de la carne, los iones del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) están disponibles para reaccionar con los iones de  $\text{H}^+$  con el ácido ( $\text{HNO}_2$ ) (Snell *et al.*, 2004; Weinber y Asbell, 2005).



**Figura 2.** Reacciones del nitrógeno. Para la generación del color, el óxido de nitrógeno (NO) es el agente activo.  
Fuente: Badui, 2006.

### **2.3 Acido Ascórbico-Ascorbato**

El ácido ascórbico ayuda a mantener el color rojo en la carne curada e impide la formación de nitros aminas. Ayuda a impedir la pérdida de color y de sabor al reaccionar con el oxígeno indeseable. Se usa como aditivo nutritivo en bebidas y cereales para el desayuno. El ascorbato de sodio es una forma más soluble de ácido ascórbico. El ácido eritórbico (eritorbato de sodio) realiza las mismas funciones del Ácido ascórbico, pero no tiene valor como vitamina.

Para conseguir un enrojecimiento intenso y rápido, deben incorporarse a la pasta sustancias reductoras como el ácido ascórbico o el ascorbato. Sin embargo, la dosis excesiva de estos compuestos provoca efectos negativos sobre el enrojecimiento y conservación del color. Lo mismo puede decirse de las cantidades insuficientes. Los preparados que lleven ácido ascórbico no deben agregarse a la masa mezclados con la sal curante de nitrito, en tal caso se registra una pérdida de sustancias curante (nitrito). Las consecuencias son entonces el enrojecimiento insuficiente y la mala conservación del color de los embutidos crudos (Hamm, 1960).

### **2.4 Azúcares**

Para conseguir el descenso del pH se agregan hidratos de carbono, que son desdoblados hasta ácidos por los gérmenes presentes en la carne. En principio, es el mismo proceso que acontece en los embutidos duros. La finalidad del descenso del pH es la de conservar el embutido dentro de un límite, así como mejorar las condiciones para que se produzca un intenso y rápido enrojecimiento. No obstante, se evitará incorporar cantidades excesivas de azúcares, puesto que entonces el pH desciende rápidamente y, sobre todo, hasta valores excesivamente bajos, produciéndose alteraciones del sabor (agrio, picante); a la vez, se crean unas condiciones óptimas para la proliferación de gérmenes

indeseable, como son los lactobacilos formadores de peróxidos. Cuanto más desciende el valor del pH, mayor es el peligro de que, en particular, se endurezcan las variedades de embutido blando de grano grueso. Por la misma razón se evitarán dosis demasiado elevadas de azúcar (Newbold,1966).

## **2.5 Especies**

Los condimentos sirven para conferir sabor y delicadeza a los embutidos, careciendo de toda influencia tecnológica. En los embutidos crudos, sean blandos o duros, se incluyen unánimemente condimentos y sustancias sápidas como la pimienta, pimentón, ron, en ocasiones algo de enebro, comino y ajo o cebolla. Es muy importante conocer la exacta composición del condimento y dosificarlo correctamente. Precisamente con productos como el ajo, la cebolla o el comino deben procederse con todo conocimiento y pericia. Es recomendable la incorporación de un preparado completo. Por otra parte, precisamente en estas clases de embutidos crudos debe atenderse que los condimentos carezcan de gérmenes, con objeto de evitar que tenga lugar la intensa contaminación de la pasta tras la incorporación de ellos (Briskey,1964).

## **2.6 Féculas**

La preferencia de América Latina por productos cárnicos más tiernos y succulentos ha convertido al almidón en uno de los ingredientes favoritos a la hora de elaborar carnes emulsionadas. Este auge se debe a las características propias de esta sustancia; la cual, en emulsiones cárnicas, logra ligar la grasa y mantener su dispersión en la mezcla, consiguiendo mantener la viscosidad total, sin desprender ningún sabor u olor desagradable, entre otras de sus múltiples propiedades (Hamm,1960).

Cuando los productos cárnicos son formulados, los procesadores quieren asegurar a sus consumidores la obtención de la más alta calidad posible. La calidad es una medida del rendimiento, ya que los consumidores esperan unas apropiadas características en textura, flavor, tajabilidad, y jugosidad. Adicionalmente, los procesadores de carne son fuertemente prevenidos de que cuando sus productos desarrollan un problema de pérdida de agua, los consumidores rechazarán el producto. Es importante que el procesador considere el uso de ligantes, tales como almidón alimenticio modificado, para prevenir este problema de pérdida de agua e incrementar la vida útil del producto. Los almidones proveen a los procesadores de carnes con una alternativa económica cuando se usa como fuente el maíz cultivado en los Estados Unidos (Newbold, 1966).

Los almidones nativos son derivados de diversas fuentes botánicas como la papa, el maíz, el trigo y la mandioca; utilizados desde hace mucho tiempo en la elaboración de productos cárnicos, debido a la capacidad del almidón como ligante de agua. Grandes cantidades de almidones se utilizan como absorbentes y agentes ligantes de agua, en salchichas y otros productos cárnicos procesados, por ser capaces de retener la humedad durante todo el procesamiento y almacenamiento de los productos, logrando estabilizar la emulsión de humedad, grasa y proteínas (Briskey, 1964).

## **2.7 Proteínas no Cárnicas**

Grupo de aditivos que mejoran el rendimiento, al igual que reducen los costos de producción de las salchichas obteniendo mayores ingresos. Adicionan textura lo cual promueve la succulencia, estabilizan el agua y la grasa de la emulsión. Los niveles de uso son variados, los más utilizados son: proteína de

aislado de soya, concentrado de soya, harina de soya, texturizados, caseinato de sodio, gluten de trigo, proteína de suero de leche, colágeno (Siedler, 2009).

Las proteínas de soya y la harina de la mostaza se utilizan como fuentes de proteína para permitir la extensión adicional y se agregan ligadores para el agua. Los ligadores de la proteína no se pueden utilizar en los productos llamados jamón, pero son permitidos en productos como en extensiones de jamón o rollos de pollo altamente extendidos. El nivel típico del uso está entre 0.5% y 5.0%. Los niveles usados dependen de la proteína usada e independientemente si es un aislante o una harina. Por ejemplo el aislante de soya puede estar entre siete y diez veces su peso en agua mientras que el concentrado de soya estará menos que su peso en agua (aproximadamente cinco veces su peso) mientras que imparte un sabor más agradable (Sebranek, 2009).

La utilización de proteínas de soya permite a menudo a productores a bajar sus costos mientras que obtienen un producto con las mismas características de un producto tradicional. La gente se queja de que la proteína de soya de los productos da un gusto pobre y una pobre textura. Estos problemas pueden existir si las proteínas de soya se utilizan incorrectamente o en un nivel demasiado alto. Cuando las proteínas de soya se utilizan correctamente no hay un efecto nocivo sobre el sabor o textura de un producto. De hecho mejoran el producto (Sebranek, 2009).

El termino “proteína de soya”, cubre una amplia gama de los productos derivados de la soya. Se clasifican estos productos como: harinas de soya, concentrados de proteína de soya, o proteínas aisladas de soya. La composición típica de los productos de la proteína de soya se menciona en la **Cuadro 7**

**Cuadro 7.** Composición de los productos de proteína de soya

Producto	Proteína %	Carbohidratos %
Harina de soya	50	38
Concentrado de proteína de soya	70	24
Proteínas aisladas de soya	90	Menos que 3

Fuente: Sebranek, 2009

De las proteínas de leche son varios los productos que han sido preparados para las formulaciones de productos de carne (**Cuadro 8**). El sólido de leche sin materia grasa es preparado directamente de la leche desnatada por la leche condensada y por secado de aspersion. El producto condensado es una mezcla de proteínas, azúcar (lactosa), y minerales. El concentrado de proteína (CP) de leche es hecho de leche desnatada por una combinación de ultrafiltración y de diafiltración. Las caseínas están en una forma micelar, que se puede separar de las proteínas por el concentración de la proteína por microfiltración de la leche, es relativamente alta en contenido mineral. Una vez que están separadas, las caseínas se pueden secar y procesar en polvos finos. La fracción acuosa se utiliza para preparar diversos productos proteínicos, tales como concentrado de proteína (CP) y aislado de proteína (AP) (Zhang, 2007).

**Cuadro 8.** Usos de las proteínas de la leche en productos cárnicos

<b>Ingredientes de Proteínas</b>	<b>Principales características funcionales</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Ejemplos</b>
Sólidos de leche materia grasa	de Texturización, sin sabor, emulsificación	Para todos los productos cárnicos	Salchicha Frankfurt, salsa de carne
Caseinato sodio	de Emulsificación, texturización y unión de la carne	Salchicha, emulsiones cárnicas	Salchicha de cerdo fresca, Frankfurt, rollos de pavo
Caseinato parcialmente hidrolizable	Emulsificación, texturización y unión del agua	Salchicha, emulsiones cárnicas	Bolas de pescado, bolas de cerdo, empanadas de carne de vaca y nugges.
CP o AP	Gelatinización, inhibición del color rosa	Carnes inyectadas	Salchicha fresca, rollos de pavo, jamón

Fuente: Zhang, 2007. Nota: Concentrado de proteína (CP), Aislado de proteína (AP).

## 2.8 Fosfatos

Los fosfatos se incluyen en muchos productos de carne curada debido a los efectos benéficos que les proporciona. Sin embargo, los fosfatos no son los ingredientes distintivos que caracterizan las carnes curadas, al igual que el nitrito y la sal. Las carnes curadas se pueden fabricar con éxito sin los fosfatos y obtener todas las características típicas de las carnes curadas esperadas por los consumidores. Al mismo tiempo, las ventajas de incluir los fosfatos son tales que estos compuestos se han convertido en un ingrediente común en la mayoría de las carnes curadas, a excepción de productos secos y semisecos (Sebranek, 2009).



Los fosfatos, como muchos de los otros ingredientes curados de la carne, realizan funciones múltiples cuando estos son agregados a la mezcla de la carne. Una de las funciones más importantes de los fosfatos es la capacidad creciente de las proteínas de la carne de ligar y de conservar el agua. El beneficio de la retención del agua no sólo mejora el producto durante el cocimiento, si no también la textura, dulzura, y jugosidad del producto. El efecto de los fosfatos sobre las proteínas de la carne es doble. El uso significativo de fosfatos alcalinos aumentan el pH y la fuerza iónica de las mezclas de la carne, efecto que es bien reconocido como medio para la mejora de la retención del agua aumentando la repulsión de la carga de la proteína (Briskey,1964).

## **2.9 Conservadores**

La conservación de los alimentos es el procedimiento que se dirigen contra el ataque por los microorganismos. La acción antimicrobiana del ácido sórbico se debe a la inhibición de diversas enzimas en la célula microbiana, especialmente enzimas de los hidratos de carbono, como enolasa. La actividad del ácido sórbico se dirige casi totalmente contra mohos y levaduras. Las bacterias sólo son inhibidas en parte, las catalasas-positivas más que las catalasas-negativas y muy pocas las lácticas y los clostridios. En comparación con otras sustancias conservadoras el ácido sórbico tiene un coeficiente de reparto más favorable, debido a lo cual en las emulsiones grasa-agua permanece una porción relativamente mayor de ácido sórbico en la fase acuosa que es la única que puede sufrir el ataque bacteriano (Hamm,1960).

### **3. LEGISLACIÓN APLICABLE EN LA ADULTERACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS**

#### **3.1 La Calidad de los Productos Cárnicos en México**

Los productos cárnicos térmicamente procesados son muy populares en muchos platos, por ejemplo las salchichas como entrada, a la parrilla, en hot dogs, o en muchas formas mas, los productos cárnicos son muy consumidos por los mexicanos, por lo que en el mercado pueden encontrarse de diferentes tipos: Chorizo, salchichas (viena, cocktail, botanera), y jamón etc. En general la composición de los productos cárnicos varía de marca a marca: mientras unas contienen carne de cerdo, otras llevan pavo, pollo o alguna mezcla de éstos; su ingrediente principal, sin embargo, es el agua (70% aproximadamente), y además de la carne y las sales de curado (nitritos), las diversas marcas añaden fosfatos y otros ingredientes como proteínas no cárnicas (principalmente de soya), almidones y grasas (casi siempre de cerdo). Pero la incorporación de estos ingredientes se hace a costa del contenido de carne, con lo cual se abarata el producto (PROFECO, 2005).

#### **3.2 Adulteración un Problema en los Productos Cárnicos**

La palabra “autenticidad” define como confiable, fidedigna, genuina, sin duda del origen. La confiable identificación de las especies es el punto de partida para la autenticación de los productos cárnicos y deberá estar basada en parámetros que no experimenten alteraciones drásticas durante su procesamiento (Lüthy, 1999).

Por otro lado, Hargin (1996) define a un alimento no auténtico, a aquel que no es de la sustancia natural y calidad demandada por el comprador. Considera

que un alimento es adulterado cuando se presenta lo siguiente: la completa o parcial omisión de los constituyentes de alto precio, la total o parcial sustitución de componentes alimenticios de menor calidad o valor económico, encubrimientos de daños o calidad inferior y la adición de materiales o sustancias no declaradas con el fin de incrementar el peso o volumen del producto.

La sustitución o adición de ingredientes en los productos cárnicos, puede ser del tipo: proteína y/o grasa de origen animal y/o vegetal. La proteína de origen animal proveniente de pasta de pavo o carne mecánicamente deshuesada (CMD), es la más utilizada en la industria procesadora de embutidos a nivel mundial (Hargin, 1996). En México la NOM-051-SCFI-1994, estipula que todos los ingredientes deben de ser declarados (SECOFI, 1994), sin embargo la CMD no siempre es declarada. El plasma sanguíneo también se ha reportado por varios investigadores como un aditivo no especificado en la etiqueta en una variedad de productos cárnicos crudos y procesados térmicamente (Hargin, 1996).

Entre los productos frescos embutidos se encuentra el chorizo que tradicionalmente es fabricado a partir de carne y grasa de puerco entre otros ingredientes. Actualmente se encuentran en el mercado chorizos que presentan sustitución de la carne de puerco con soya (González-Córdova et al, 1998); otro producto al que se le ha encontrado soya sin declararlo, es la salchicha (Loyo, 1996; Woychik et al, 1987). Esta sustitución es permitida siempre y cuando se encuentre indicada en la etiqueta y dentro del máximo permisible (SECOFI, 1996), de lo contrario constituye un fraude al consumidor.

Muchos productos se elaboran con carne de cerdo o pavo, y existen productos que contienen mezclas de éstos. Además, un buen número de marcas también contienen soya. A pesar de que varias marcas declaran estar elaboradas

con carne de ave, se ha detectado la presencia de cerdo en las salchichas de diversas marcas comerciales.

PROFECO, (2005) realizó un análisis con 46 marcas: 36 de salchicha y 10 de salchicha cocktail (**Ver cuadro 9**). Aunque la gran mayoría se comercializa a nivel nacional, todos los productos analizados fueron comprados en diversos puntos de venta localizados en el Distrito Federal, y al adquirirlos, se verificó que estuvieran refrigerados, dentro de fecha de caducidad y en empaques cerrados. Cada producto se sometió a las pruebas que se indican a continuación.

➤ **Tipo de carne empleada**

Para verificar la veracidad de lo ofrecido en la etiqueta de cada producto se determinó que el tipo de carne empleada fuera la declarada. Asimismo, se identificó a los productos que agregan soya.

➤ **Contenido de almidones**

Por lo general, casi todas las marcas adicionan almidones a los demás ingredientes; de acuerdo con la normatividad los almidones no deben exceder el 10%. Como se muestra en la tabla 5, se identificaron productos con contenidos mayores de almidones.

➤ **Contenidos de grasa y proteína**

Para conocer el aporte nutrimental de las salchichas, se determinaron sus contenidos de proteína y grasa.

Es probablemente que la mayor parte de productos procesados térmicamente, en México sean alterados de alguna manera, por diversos motivos; y el que sufre las consecuencias es el consumidor, por lo cual se necesitan técnicas rápidas y precisas para detectar las principales adulteraciones que se

realizan en los productos carnicos, principalmente cocidos, y como se menciona en parrafos anteriores, el problema mas grave no es que se utilicen una gran diversidad de ingredientes y aditivos que mejoran aspectos tanto nutricionales como sensoriales, sino el hecho de no declarar al consumidor el uso de uno u otro ingrediente o bien la sustitución de un tipo de carne por otro de bajo valor comercial, lo cual puede constituir un fraude para el consumidor.

**Cuadro 9.** Algunas marcas de salchichas que adulteran su producto en México.

Marca	Información al consumidor	% Grasa	% Proteína	% Almidón	Elaboradas con	Observaciones
Alpino	Completa	8.4	11.7	9.6	Declara ave y se detecta cerdo.	Contienen soya
Fud	Completa	12.8	9.7	8.9	Declara ave y se detecta cerdo.	Contienen soya
La española	Completa	12.4	8.5	11.7	Ave-cerdo	Contienen soya
San Rafael	Completa	21.3	12.1	3.1	Ave-cerdo	Contienen soya
Zwam	Se declara con mas carne, pero tiene igual que muchas otras	10	10.6	5.4	Ave-cerdo	Contienen soya
Bernina	Completa	13	14.6	4	Ave-cerdo-	----- res

Fuente: PROFECO, 2005.

### 3.3 Normativa Europea sobre Adulteración en Alimentos

En Europa muchos años se había regido por la llamada regla del 25% a la hora de aplicar la legislación en etiquetado. Por medio de esta pauta, no era necesario etiquetar aquellos ingredientes que no superaran el 25% del contenido total de producto final. La directiva europea 2000/13/EC, con fecha del 20 de marzo del 2005, se basa en el principio del etiquetado funcional de los productos

alimentarios, con el fin de informar al consumidor de su composición, fabricante, métodos de almacenamiento y preparación, etc. Así mismo, esta directiva permite añadir al etiquetado tanta información como desee el fabricante o producto, siempre y cuando ésta sea precisa y no confunda al consumidor. Una corrección posterior de esta normativa prohíbe además toda mención a propiedades curativas o de prevención de cualquier producto alimentario. Algunos alimentos específicos se hallan regulados por medio de legislaciones especiales, como puede ser el caso del chocolate o la carne de vacuno.

**Cuadro 10.** Evolución de la legislación europea en materia de etiquetado de alimentos cárnicos para consumo humano.

Legislación	Propósito
White Paper on food safety COM (1999) 719	Propuestas legislativas en la elaboración de nuevas directivas sobre higiene alimentaria.
Directiva 2000/13/EC	Etiquetado de alimentos destinados al consume humano.
Directiva 2000/13/EC	Prohibición del etiquetado de ingredientes alimentarios con propiedades preventivas o medicinales.
Directiva 2001/13/EC	Etiquetado obligatorio de todos los ingredientes de productos destinados al consumo humano. Listado de ingredientes potencialmente alergenicos.

### 3.3.1 Legislación Europea sobre Etiquetado de Productos Cárnicos

El movimiento del ganado vacuno y su procedencia ha estado regulado hasta hace poco por medio de normativas propias de cada estado miembro, y la trazabilidad se llevaba a cabo mediante etiquetas tradicionales insertadas en cada animal (Snell *et al.*, 2004; Weinber y Asbell, 2005).

Tras la crisis de la enfermedad de la vacas locas (EEB) de 1996, y en un intento de devolver la confianza a los consumidores, la Unión Europea promulgo legislación que reconociera la importancia del vínculo entre la carne y sus animales de origen. El reglamento 820/97 original sobre etiquetado de vacuno ha sido revocado y sustituido por el reglamento 1760/2000<sup>115</sup>. Este reglamento entro en vigor el 1 de septiembre del 2000, y establece un sistema para la identificación y registro de los animales bovinos, así como para el etiquetado del vacuno y productos de vacuno. Requiere que todo el vacuno y la ternera frescos o congelados sean etiquetados con un código de referencia que vincule la carne a los animales de origen, el país donde el sacrificio y el despiece tuvieron lugar, y los números de aprobación de los mataderos y las plantas de despiece. Hay una derogación limitada para la carne picada (Weinber *et al.*, 2005).

El reglamento 1825/2000<sup>116</sup> del 25 de agosto del 2000 determina de forma más detallada las normas que han de seguirse para aplicar el reglamento 1760/2000. La segunda fase de la normativa entro en vigor el 1 de enero del 2002, y requiere que el etiquetado del vacuno indique los países de nacimiento y el país o países de cría, así como todas las indicaciones ya recogidas en la primera fase (Snell *et al.*, 2004; Weinber y Asbell, 2005)

Además debemos tener en cuenta que la modificación a la directiva 2000/13/EC sobre etiquetado, presentación anuncio de ingredientes alimentarios, obligara el etiquetado del contenido de carne procedente del musculo del animal, compuestos grasos y vísceras (Weinber *et al.*, 2005).

### **3.4 Legislación en México de Productos Cárnicos**

En México existen diversas normas para la regularización de los productos cárnicos, que es atribución de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Alimentación establecer las características y especificaciones zoonosanitarias que deben reunir los productos de origen animal.

La determinación de identificación de especie animal en musculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, se establece con el fin de asegurar a los consumidores que el suministro de alimento corresponda al identificado en la prueba, ya que el consumo de los alimentos de otra especie animal diferente a la deseada, implica diversos riesgos para la salud del consumidor. Para conseguir los propósitos enunciados anteriormente, se ha tenido a bien expedir la Norma Oficial Mexicana NOM-023-ZOO-1995, identificación de especie animal en musculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, por la prueba de inmunodifusión en gel.

Esta norma es de observancia obligatoria en todo el territorio y tiene por objeto, establecer el método de prueba, para la identificación de especie en productos cárnicos de origen animal (bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves). La técnica se utiliza también en caprinos y caninos, siendo aplicable a los laboratorios de análisis de residuos tóxicos en tejidos alimenticios primarios de origen animal, aprobados por la SAGARPA.

Para que el consumidor pueda establecer sin dificultad la relación entre la cantidad del producto, lo que contiene y el precio, es necesario que en los envases y/o etiquetas de los productos se especifique con toda claridad el dato relativo al contenido, contenido neto y la masa drenada según se requiera. La Norma Oficial Mexicana NOM-030-SCFI 1993 Información Comercial Declaración



de Cantidad en la Etiqueta Especificaciones, establece la ubicación y dimensiones del dato cuantitativo referente a la declaración de cantidad, así como las unidades de medida que deben emplearse conforme al Sistema General de Unidades de Medida y las leyendas: contenido, contenido neto y masa drenada, según se requiera en los productos preenvasados que se comercializan en territorio nacional.

Las normas NOM-122-SSA1-1994 (SSA, 1995) y la NOM-145-SSA1-1995 (SSA, 1998) contienen las especificaciones sanitarias y límites permisibles de aditivos, como proteínas no cárnicas y colágeno, entre otros, para los diferentes productos cárnicos. Los límites que mencionan dichas normas para los aditivos mencionados son: proteína de aislado de soya 2.0%, concentrado de soya 3.5%, colágeno 2.0% y 10% de almidones. Estos pueden usarse, sin que su porcentaje total de dicha mezcla, rebase el máximo permitido para cada uno de ellos y sea declarado en la etiqueta del producto.

Los productos cárnicos están regulados por las siguientes normas oficiales mexicanas:

- **NOM-122-SSA1-1994.** Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.
- **NOM-002-SCFI-1993.** Contenido neto. Tolerancias y métodos de verificación.
- **NOM-051-SCFI-1994.** Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Reglamento de control sanitario de productos y servicios.

Estas normas oficiales mexicanas mencionan que los productos como salchichas deben proporcionar ciertas características e información a los consumidores como es; que las salchichas presenten etiquetas, que incluyan información sobre de qué está elaborado el producto y qué tipo o a quien va dirigido el producto.

### **3.5 Trazabilidad una Herramienta Decisiva para la Seguridad y la Protección de los Consumidores**

La trazabilidad, rastreabilidad o “traceability” (como se expresa en inglés) es la capacidad de productores, industriales, comerciantes, consumidores y poderes públicos de poderle seguir la pista a un determinado objeto a lo largo de toda o de parte de su vida útil. La trazabilidad es una característica que se ha venido imponiendo, o exigiendo, a diversos productos desde tiempos inmemoriales. Así, los pintores firman sus cuadros para que todo el mundo sepa quien los hizo; los fabricantes de zapatos colocan una contraseña en el forro, o en la suela, con la misma finalidad. En realidad muchas marcas y etiquetados sirven, al tiempo que de publicidad, para responsabilizar a alguien de los productos elaborados. Era costumbre en los edificios públicos romanos encontrar, por ejemplo, la inscripción “Marcus fecit”, con la que el arquitecto “Marcus” dejaba una huella, un rastro, de su paso por este mundo, pensando –lógicamente– que el edificio le sobreviviría (Wilson, 2004).

Con motivo de los envenenamientos con anilidas, con dioxinas, tras la crisis de las vacas locas o Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), con la aparición de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM), la trazabilidad, pero referida esta vez a los alimentos, se ha puesto de moda. En parte, para tranquilizar a los consumidores y, en parte, para saber a quién hay que echarle la culpa de cualquier problema que surja en el sector alimentario. No es mala cosa

tener perfectamente determinado el historial de un producto por si hay que proceder, de prisa y corriendo, a retirar del mercado otros productos del mismo lote y prevenir en la medida de lo posible otros casos de enfermedad que tengan el mismo origen o la misma causa. La trazabilidad alimentaria será tanto más perfecta en cuanto permita una mayor velocidad de rastreo y se puedan conseguir intervenciones públicas rápidas y completas (Yang *et al.*, 2001).

La trazabilidad resulta ser, pues, un importante instrumento al servicio de la seguridad alimentaria. También la palabra seguridad alimentaria es otra palabra de moda y, de algún modo, equívoca. El problema surge de que dos palabras inglesas "security" y "safety" (seguridad sobre algo, la primera, y estar a salvo de algo, la segunda) se han traducido, ambas, por una única palabra española, "seguridad". Hasta hace pocos años, siempre que en castellano se decía "seguridad alimentaria", todo el mundo interpretaba la expresión en el sentido de garantía del abastecimiento de cereales, de carne, de leche o de cualquier otro producto alimenticio. Hoy día, cuando se habla de "seguridad alimentaria" predomina su empleo como garantía de que un alimento es inocuo, desde el punto de vista sanitario, para su consumo por personas o animales. Quizás hubiese merecido la pena intercalar dos palabras más en cada caso y hablar de "seguridad de abastecimiento alimentario" y de "seguridad de sanidad alimentaria" (Owen y Moline, 2001).

La necesidad de la trazabilidad se ha impuesto en la UE tras las crisis alimenticias que han afectado recientemente a los países desarrollados y en vías de desarrollo. Anilidas, dioxinas, compuestos policlorados o polibromados de difenilo, furanos, vancomicinas y otros antibióticos, favorecedores del engorde de ganado como el clenbuterol, somatotropinas y otras hormonas del crecimiento (Yang *et al.*, 2001).

Gracias a la trazabilidad se puede en gran medida proteger al consumidor comunitario. En Estados Unidos no se habla de rastreabilidad sino de “certificación de procesos de producción a lo largo de toda la cadena alimentaria”, lo cual viene a ser parecido, aunque no es exáctamente lo mismo, porque es un concepto menos exigente que la trazabilidad plena comunitaria, ya que evita referirse a los Organismos Genéticamente Modificados (OGM), ampliamente tolerados en Estados Unidos (Wilson, 2004).

La Declaración Universal de los Derechos Humanos especifica que todas las personas tenemos derecho a una alimentación suficiente y sana. La Unión Europea, en su “Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria”, especifica que: “los consumidores deberían poder acceder a una amplia gama de productos seguros y de calidad, procedentes de todos los Estados miembros”. En definitiva, la seguridad objetiva en los alimentos y también la confianza como sentimiento subjetivo respecto a los productos que consumimos, constituyen un derecho de todos los seres humanos que ha de ser garantizado por los países donde ellos viven y, en el caso del Mercado Común, por la propia Unión Europea (Mills y Kung, 2002).

El citado Libro Blanco, a propósito de la trazabilidad, afirma: “una política alimentaria eficaz, exige un sistema de rastreabilidad de los alimentos destinados al consumo animal y humano y de sus ingredientes. Conviene introducir procedimientos adecuados para facilitar dicha rastreabilidad, entre los que cabe mencionar la obligación, por parte de las empresas productoras de los alimentos citados, de aplicar procedimientos adecuados para retirar dichos alimentos del mercado cuando exista un riesgo para la salud de los consumidores. Asimismo los operadores deberían conservar registros adecuados de los proveedores de materias primas y de ingredientes para poder determinar la fuente de los posibles problemas”. “Sin embargo, es preciso recalcar que una rastreabilidad inequívoca

de los alimentos destinados al consumo animal y humano y de sus ingredientes es una cuestión compleja en la que se debe tener en cuenta la especificidad de los distintos sectores y productos”. Nos encontramos, en este párrafo, implícitamente aceptada la dificultad en llegar a lo que se denomina riesgo “cero”; es decir, la no existencia de riesgos para los consumidores, ya sean estos animales o personas. También se desprende, del mismo párrafo, que la trazabilidad depende del producto y de la “longitud” de la cadena alimenticia (Weinber *et al.*, 2005).

#### 3.5.1 Trazabilidad en Cárnicos

Existen diversas especies ganaderas que se aprovechan por sus carnes cuya trazabilidad, tras los recientes episodios de encefalopatía, glosopeda, peste porcina..., es una exigencia continua, sobre todo para tratar de restablecer la confianza de los consumidores que en algunos casos, ya que también suelen adulterarla mezclando carnes de otro tipo de animal y declarando en la etiqueta que se trata de una sola especie, o por otra parte la crisis de la EEB, ha reducido sensiblemente la demanda de la carne de vacuno, sobre todo de reses con más de dos años y medio de edad, que parece ser una frontera (sumamente inestable) para la propagación de los priones. Los animales jóvenes, o no tienen la EEB o no la desarrollan habitualmente por debajo de los 30 meses. Pero también existen carnes nacionales y carnes comunitarias, carnes importadas de países con problemas de clenbuterol (un anabolizante), de somatotropina o de utilización masiva de antibióticos, que pueden generar en los seres humanos resistencias cruzadas (Mata, 2000).

Asimismo, está el problema de la caza que algunas veces es mirada con prevención por los consumidores, ya que su trazabilidad empieza tras el disparo del cazador y con el reconocimiento veterinario, operación que no siempre se realiza, salvo en la caza mayor (cérvidos y jabalíes). La trazabilidad de una carne

obtenida en granjas intensivas suele ser mejor , ya que tienen que tener registros de la alimentación recibida por el ganado, de los medicamentos utilizados a lo largo de la vida del animal, de las incidencias veterinarias que se hayan presentado, del sacrificio, del faenado, del despiece, de la comercialización, de la utilización o no de frío profundo... Todo lo que sirva de garantía al consumidor debe quedar, de alguna forma, registrado (Anklam, y Battaglia.2001).

### **3.5.2 Trazabilidad en Productos Cárnicos**

Asimismo los productos ganaderos, como leche y huevos, tienen que tener un cierto grado de trazabilidad, aunque vayan precedidos de una colecta o recoba que homogeniza -en lotes- las producciones de varias granjas. También se han hecho populares varios “slogans” que afectan a estos productos ganaderos y a las carnes: “de la granja a la mesa”, “de la granja al tenedor”, “de la granja al mantel”, similares a los de los pescados. Al igual que ocurre con las carnes la trazabilidad es mucho más exigible a los productos importados, sobre todo porque, a veces, el seguimiento sólo puede realizarse desde la frontera, aunque existan certificados de los países de origen, ya que muchos de estos países se limitan a describir la “situación” sanitaria del producto en la aduana de salida, pero sin mencionar el historial, lo que quiebra evidentemente la trazabilidad plena del producto (Wilson, 2004).

Por ultimo, una aplicación reciente es el uso de microorganismos patógenos de los parásitos externos de ovinos para eliminarlos. Estos patógenos son específicos y no dañan ni al ganado, ni al hombre. El objetivo final es tener un gasto ganadero más productivo, una mayor asimilación de los nutrientes contenidos en los piensos y generar menos desechos para que la ganadería sea más amigable con el medio ambiente y para tener ganado más sano (Jimenez, 1991).

### **3.6 Empresas Relacionadas con la Trazabilidad Alimentaria que Operan en Territorio Mexicano**

La mayoría de las empresas dedicadas al sector de la trazabilidad, han diseñado una estrategia de servicios, dejando para un futuro la posibilidad de introducir en el mercado nuevos desarrollos basados en kits de detección con aplicaciones en la industria alimentaria (De la Torre, 2008).

La estrategia de trabajo de las empresas dedicadas a realizar servicios de trazabilidad suele ser parecida. Generalmente formalizan contratos anuales o campañas puntuales con empresas que deciden subcontratar sus servicios. Las grandes superficies como los supermercados suelen ser los clientes principales ya que en los últimos años el aumento de las “marcas blancas”, marcas propias de cada cadena de supermercados, ha obligado a estos establecimientos a exigir a sus distribuidores la certificación de origen de los alimentos, así como la ausencia en la mayoría de los casos de alimentos transgénicos. El proceso de análisis de los productos se suele realizar siguiendo las indicaciones exactas de la empresa cliente, es decir, analizando los lotes y alimentos que deseen, o bien en un muestreo al azar de cualquiera de los productos demandados por el cliente. Los resultados de estos análisis no suelen trascender al consumidor final ya que son utilizados por la empresa como control interno de sus productos (Leamon et al., 2005).

Los alimentos que son sometidos a un mayor número de controles de trazabilidad son aquellos que pueden contener ingredientes derivados de Organismos Modificados Genéticamente, como la soya o el maíz principalmente. El tipo de análisis realizado dependerá del destino final de los alimentos, así los embutidos como el chópéd son unos de los más demandados en cuanto a los análisis de contenido en transgénicos. Los productos susceptibles de fraude son aquellos que son sometidos mas frecuentemente a análisis de autenticidad. En

relación a posibles adulteraciones, las salchichas suelen verse adulterados por medio de la adición de distintas cantidades de grasa, o alguna otra especie cárnica, al igual que los chorizos que pueden contener soya, etc (Hamdan *et al.*, 1998).

El precio de los análisis moleculares de trazabilidad para productos cárnicos varía muy poco en las diferentes empresas que ofrecen estos servicios. Los análisis más sencillos son los realizados para identificación de OMGs y pueden costar alrededor de 60 y 120€, mientras que los más complejos son aquellos en los cuales es necesario la identificación de la especie, con un costo aproximado de 180€. Lo más laborioso de este tipo de análisis es el proceso de purificación, que conlleva un mínimo de dos días (De la Torre, 2008).

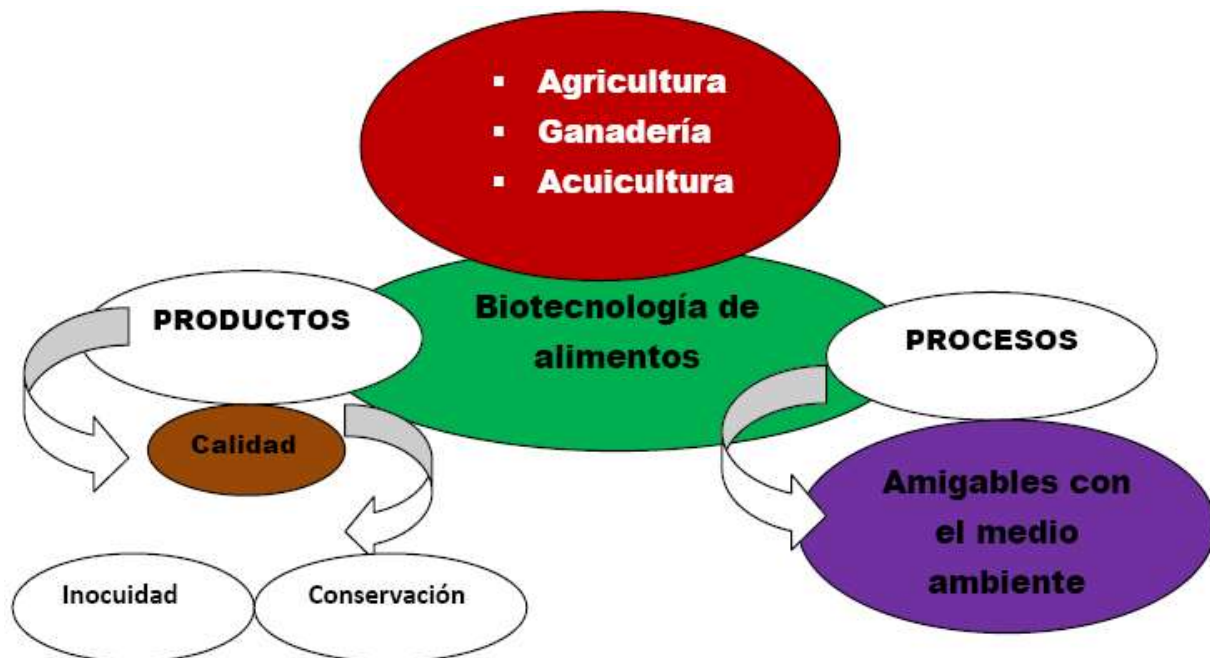
Algunas de las empresas dedicadas a ofrecer productos cárnicos se están dando cuenta de la importancia que tendrá en un futuro la trazabilidad, por lo que están intentando desarrollar un protocolo adecuado que pueda ser admitido por las organizaciones que actualmente certifican productos o procesos de calidad (ISO, Organización Internacional de Normalización). El problema que genera la falta de materiales de referencia es uno de los responsables de que no exista un consenso que permita una certificación a nivel El problema que genera la falta de materiales de referencia es uno de los responsables de que no exista un consenso que permita una certificación a nivel nacional (Jimenez, 1991).



## 4. INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE FRAUDES EN PRODUCTOS CÁRNICOS

### 4.1 Alimentos y Biología Molecular

Cuando se habla de biología molecular o biotecnología y alimentos lo más probable es que vengan a la mente los alimentos transgénicos. Se denominan transgénicos a cualquier ente vivo cuya constitución genética haya sido alterada mediante la supresión o incorporación de genes. Si bien ciertamente estos productos están muy lejos de ser los monstruos armados con partes de distintos cuerpos del legendario personaje y carecen de su erotismo y tristeza, estas alegorías forman parte de los recursos que usamos los seres humanos para convertir en dioses y demonios aquello que no entendemos (De la torre, 2008).



**Figura 3.** Relación de los campos de acción de la biotecnología de alimentos.

El hombre desde que se hizo sedentario ha utilizado esta disciplina sin saberlo. Los alimentos producto de la biotecnología son la cerveza, el pan, el vino, el queso y otros productos lácteos que el ser humano desarrollo desde hace miles de años. Si desde hace más de 4000 años el hombre utilizaba lo que ahora se llama biotecnología entonces ¿Qué es la biotecnología de alimentos? Es el uso y la modificación de sistemas biológicos y bioquímicos para mejorar y desarrollar ingredientes para alimentos así como para mejorar los procesos de conservación de los mismos (**figura 3**).

Los alimentos son producidos fundamentalmente a través de la agricultura, ganadería o la acuicultura y en todas ellas la biotecnología tiene un efecto como veremos a continuación. En el **cuadro 11** se enlistan las aplicaciones principales de la biotecnología (De la Torre, 2008).

**Cuadro 11.** Aplicaciones principales de la biología molecular.

---

Aplicaciones
<b>Agricultura</b>
Biofertilizantes y control biológico (plagas y enfermedades en campo y poscosecha)
Micropropagación
Embriogénesis somática
Diagnostico de enfermedades
Plantas transgénicas
<b>Ganadería</b>
Inseminación artificial
Enzimas para incrementar el aprovechamiento de nutrimentos
Probióticos
Vacunas
Estuches de diagnostico de enfermedades
Biocontrol de parásitos externos
Manipulación de embriones para la obtención de multillizos
Organismos genéticamente modificados
<b>Acuicultura</b>
Tecnologías para el cultivo de peces, crustáceos y moluscos

---

## 4.2 Técnicas Analíticas para Determinar la Autenticidad de Productos Cárnicos

Como consecuencia de que la agricultura (alimentos transgénicos) y la tecnología de los alimentos ha avanzado al igual que la población se ha incrementado, los problemas relacionados con la regulación y el análisis de los alimentos se han hecho muy complejos (Anklam y Battaglia, 2001).

Se ha desarrollado diferentes métodos analíticos para la identificación de especies en carne fresca y procesada con la finalidad de proteger al consumidor de fraudes y adulteraciones (Wolf y Lûthy, 2001).

En general la determinación de la autenticidad en la carne y los productos cárnicos ha consistido en el uso de técnicas cromatográficas para el análisis de la grasa (Matter, 1992), las hormonas (Lone, 1997); electroforéticas (Cota-Rivas y Vallejo-Córdova, 1997; Andrews, 1998) e inmunológicas (Gonzalez- Córdova *et al*, 1998; Hsieh *et al*, 1998) para el análisis de proteínas y de biología molecular para el análisis del material genético (Anklam y Battaglia, 2001).

En la actualidad existen una gran variedad de técnicas analíticas, en las que predominan las que se basan en el análisis de proteínas. Sin embargo, la mayoría de las proteínas se desnaturalizan en productos procesados térmicamente, resultado en cambios de la movilidad electroforética y antigenicidad de las mismas (Hunt *et al.*, 1997; Bunjtjer *et al.*, 1999, Wolf y Lûthy, 2001), lo que se traduce en una interpretación equivocada de los análisis (Wintero *et al.*, 1990).

Las técnicas electroforéticas e inmunológicas a menudo fallan en la detección de especies en productos procesados térmicamente y en alimentos de composición compleja, ya que, las altas temperaturas causan cambios de conformación de las proteínas y demás componentes (Chikuni *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1994; Calvo *et al.*, 2002).

En el caso de las técnicas inmunológicas, los anticuerpos generalmente obtenidos son del suero o del músculo de la carne fresca y no de la carne sometida a procesos térmicos. Wolf *et al.*, 1999 y Hsieh (1998) mencionan, que las técnicas inmunológicas que emplean anticuerpos, pueden sufrir reacciones cruzadas en las proteínas de especies estrechamente ligadas.

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-025-ZOO-1994 para la identificación de especie animal, utiliza la prueba de inmunodifusión pasiva en gel. Sin embargo, esta técnica presenta actividad cruzada con las diferentes especies animales, ya que los anticuerpos utilizados, son anticuerpos antisuero y no anticuerpos antimúsculo, además de ser un protocolo que requiere de aproximadamente 24 horas para arrojar resultados (Meyer *et al.*, 1994; Cota-Rivas y Vallejo-Córdova, 1997; Andrews, 1998) de igual forma, con los métodos que utilizan electroforesis utilizando Isoelectroenfoque no es posible determinar la autenticidad de productos cárnicos procesados, debido a que las altas temperaturas degradan las proteínas solubles del músculo. También los productos marinados, presentan dificultad para la determinación por este método (Wolf *et al.*, 1999) por lo que, la detección de la sustitución fraudulenta de especie en productos cárnicos procesados, requiere de métodos específicos y confiables para la autenticación de los mismos (Hunt *et al.*, 1997; Lockley y Bardsley, 2000).

### **4.2.1 Electroforesis Capilar (EC)**

La electroforesis capilar (EC) es una técnica que combina tanto aspectos de electroforesis convencional como de HPLC. La separación esta basada en la migración diferencial bajo un campo eléctrico y ocurre en solución libre sin el requerimiento de un gel. En la misma forma que en HPLC, la detección se realiza conforme ocurre la separación generando señales detectables por absorbancia UV, fluorescencia o espectrometría de masas permitiendo el análisis en serie con automuestreadores de los sistemas. Con este tipo de detección se evitan los procedimientos de tñido y desteñido necesarios en la electroforesis en gel, disminuyendo así, la dificultad de los análisis (Wehr *et al*, 1996).

El capilar y los viales se llenan con un electrolito con capacidad amortiguadora. La muestra, que esta formada por un conjunto de aniones y cationes, se introduce dentro de este sistema ocupando una única zona o franja. Al someter este sistema a la influencia de un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra, migran hacia el electrodo correspondiente, es decir, se establece un movimiento de los iones que forman parte del sistema. A causa de la alta concentración del electrolito comparada con la concentración de la muestra, algunas propiedades físicas como la conductancia, serán influenciadas principalmente por el electrolito, mientras que la influencia de la muestra podrá ser despreciada. Cuando haya transcurrido cierto tiempo desde el inicio de la aplicación del campo eléctrico, los componentes de la muestra cada uno a su velocidad y se separarán en diferentes zonas, según la movilidad de cada analito (Cancalon, 1995).

**Cuadro 12.** Características de electroforesis capilar (CE).

<b>Nanotécnica</b>	La cantidad de material introducido esta en el rango entre 1-40 nanolitros. Es posible inyectar cantidades tan pequeñas como picolitros y femtolitros hasta varios microlitros (utilizando un sistema de preacondicionamiento).
<b>Alta velocidad</b>	Las sustancias se resuelven en 10-40 min utilizando capilares de sílice fundida de 50-70 $\mu\text{m}$ de diámetro interno (d.i.). es posible efectuar separaciones en menos de 2 min con capilares de menor d.i.
<b>Alta resolución</b>	Es posible alcanzar unos cientos de miles de platos teóricos; se pueden lograr tantos como varios millones de platos.
<b>Alta reproducibilidad</b>	Se pueden obtener tiempos de migración que se pueden repetir con menos de 0.5% de error y menos de 2% de error (desviación estándar) para la reproducibilidad de las áreas de los picos.
<b>Alta sensibilidad</b>	Son posibles niveles de detección de sub-átomos. la EC ha podido lograr limites de $10^{-15}$ M o $10^{-23}$ moles (menos de 200 moléculas).
<b>No hay limite de peso molecular</b>	Las sustancias más pequeñas se pueden separar simultáneamente de las macromoléculas complejas en la misma columna o capilar.
<b>Compatibilidad con sistemas biológicos</b>	Se pueden utilizar niveles de pH consistentes con el ambiente natural de las macromoléculas.
<b>Instrumentación</b>	Es compatible automatizada al nivel de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
<b>Colección micropreparativa</b>	Es posible coleccionar cantidades de microgramos de material purificado.

Fuente: Elaboración propia.

Un componente crítico de la EC, es el flujo de la solución tampón arrastrada por el campo eléctrico a través del capilar, el cual moviliza todas las moléculas hacia el detector. Este fenómeno llamado flujo electrosmótico, juega un papel importante en la EC. Mientras que los componentes de una mezcla migran de acuerdo a su carga neta (y en menor grado, a su masa), el flujo electrosmótico de la solución empuja a los componentes desde el ánodo hacia el cátodo para ser detectados. La movilidad neta de una molécula depende del flujo electrosmótico del sistema, de la solución tampón y de su movilidad electroforética inherente (Cancalon, 1995).

La EC ofrece ventajas sobre la electroforesis convencional en gel en términos de rapidez (**Ver Cuadro 12**), facilidad de automatización y cuantificación. Actualmente, la EC se considera como un método alternativo capaz de realizar, un análisis más rápido y de mayor eficiencia, o como una técnica complementaria para aumentar la información obtenida por otros análisis. El formato de electroforesis convencional proporciona estabilidad mecánica para la separación, reduce la dispersión de solutos debido a la convección y difusión, y permite el manejo para la detección, digitalización y almacenaje (Recio *et al.*, 2001)

En la EC, el microanálisis es posible por las dimensiones tan pequeñas del capilar. El volumen pequeño de la columna tiene repercusiones favorables en tres aspectos de la técnica. Primero, las pequeñas cantidades de solución tampón (mililitros hasta nanolitros) requeridas para el análisis múltiple representan sólo el 1% de lo utilizado para un análisis similar en cromatografía líquida de alta resolución. Según, con una presión o vacío, el capilar puede ser enjuagado en segundos o minutos y utilizado en las siguientes corridas.

**Cuadro 13** Modalidades de la Electroforesis Capilar y sus Aplicaciones en el Análisis de Moléculas.

<b>Modo</b>	<b>Mecanismo de separación</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Solución libre</b>		
Electroforesis Capilar en Zona (ECZL)	Relación carga-masa	Bases, nucleosidos; nucleótidos, pequeños oligonucleótidos, ADN dañado o degradado
Cromatografía Electrocinética Micelar Capilar (CEMC)	Relación carga-masa, partición en micelas basadas en hidrofobicidad	Igual que ECZL
Isotacoforesis Capilar (ITC)	Movilidad "Boundary/Displacemnet"	Técnica de pre-condicionamiento para ECZL y CEMC
Isoelectroenfoque Capilar (IEC)	Punto isoeléctrico	Proteínas
<b>Geles, Red Polimérica</b>		
Electroforesis Capilar en Gel	Tamizado molecular (en relación a su peso molecular)	Oligonucleótidos, cebadores, sondas, ADN anti-sentido, productos PCR, dsADN grandes, puntos de mutación, Secuenciación de ADN.

Fuente: Schawartz y Guttman, 2006.



La EC es extremadamente versátil, ya que con el mismo instrumento básico y a menudo con el mismo capilar, es capaz de analizar un amplio rango de moléculas desde proteínas (vegetal o animal), DNA, RNA, productos PCR, fragmentos de restricción, péptidos, aminoácidos y toda clase de moléculas orgánicas e inorgánicas (Recio *et al.*, 2001). En el caso del análisis de las proteínas, se han utilizado las diversas modalidades de la técnica (**Ver cuadro 13**): Electroforesis Capilar de Zona libre (CZE), Isoelectroenfoque (CIEF), Cromatografía Capilar Electrocinética Milcelar (MECC), Electroforesis Capilar con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-CE) Electrocrmatografía capilar (CEC) y Electroforesis Capilar en Gel (CEG) (Hu y Dovichi, 2002).

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

La PCR es una técnica que permite obtener *In vitro* múltiples copias de una secuencia de ADN específica (secuencia diana), incluso cuando esta se encuentra en una muestra compleja junto con otras moléculas de ADN. Esta técnica, que se comenzó a utilizar al final de la década de los ochentas (Saiki, 1989), causó una revolución en el campo de la biología molecular. La PCR utiliza una polimerasa de ADN termoestable que, como todas las polimerasas de ADN, sintetiza una hebra de ADN en dirección 5'-3' incorporando los dioxinucleótidos correspondientes a partir de un cebador (oligonucleótido) y otra cadena de ADN sencilla que actúa de molde (Saiki, 1988).

El proceso de amplificación se basa en repetir varias veces un ciclo con tres periodos de incubación en los cuales se produce sucesivamente la desnaturalización del ADN (fase de desnaturalización), la hibridación de cada hebra de ADN con su respectivo cebador (fase de hibridación) y finalmente la síntesis de la nueva molécula de ADN (fases de elongación). Este proceso se lleva

a cabo de forma automática en un aparato denominado termociclador (Saiki *et al.*, 1988).

Durante la fase de desnaturalización se somete la mezcla de reacción a una temperatura de 95 °C para que se rompan los puentes de hidrógeno que unen las dos hebras de ADN y se separan. Una vez que el ADN se encuentra desnaturalizado, es necesario disminuir la temperatura hasta 50-70 °C para que los cebadores puedan hibridar con sus secuencias complementarias en las hebras sencillas de ADN. A partir de este momento, se eleva la temperatura de la reacción hasta 72 °C (temperatura óptima de la polimerasa termoestable), para que inicie la polimerización de la hebra de ADN complementaria incorporando el dioxinucleótido complementario al que se adhiere en la cadena de ADN molde. Las moléculas sintetizadas de nuevas también sirven como ADN molde en el siguiente ciclo de desnaturalización-hibridación-elongación, de tal manera, que después de varios ciclos sucesivos se obtiene la amplificación exponencial del amplicón, que consiste en la secuencia de ADN de doble cadena cuyos extremos están definidos por los cebadores (Saiki, 1989).

#### **4.2.2.2 Análisis Cualitativo de ADN mediante PCR**

Este tipo de análisis suele realizarse cuando solo es necesario conocer la presencia o ausencia de alguna secuencia de ADN, como por ejemplo aquellas secuencias determinantes de especie. Para identificar especies animales o vegetales presentes en alimentos mediante técnicas de análisis del ADN, se puede seguir dos estrategias, la búsqueda de polimorfismos entre distintas especies. Así mismo, la detección de OMGs se puede realizar por medio de la detección de fragmentos de ADN indicativos de la trasgenesis, como puede ser promotores de ADN, o fragmentos que se solapan entre las anteriores secuencias de ADN (Ahmed, 2002).

#### **4.2.2.2.1 Análisis de Polimorfismos de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP)**

En esta técnica el ADN obtenido en la extracción es digerido mediante enzimas de restricción; los fragmentos resultantes se separan mediante electroforesis y se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio. Posteriormente, se realiza la transferencia de ADN del gel a una membrana (Southern Blotting), normalmente de nailon. El paso siguiente es la hibridación con una sonda, es decir, un fragmento de secuencia conocida marcada mediante radiactividad o quimioluminiscencia. La sonda se une a los fragmentos de ADN fijados en la membrana, que posean una secuencia complementaria, y estos son revelados a través de una autorradiografía (Rehbein, 2001).

El análisis de polimorfismos basados en PCR-RFLP presenta la ventaja de no requerir un conocimiento previo de la secuencia de la muestra, como ocurre con los métodos que emplean secuenciación. Otra ventaja de la técnica PCR-RFLP es que permite la detección de mezclas de especies, resultando ser una herramienta rápida y segura para identificar con precisión no solo especies, por ejemplo, de atún, si no también de especies que presentan una apariencia y textura similar al atún enlatado (Mackie, 1999).

#### **4.2.2.2.2 Análisis de Conformación de Polimorfismos de Cadena Sencilla (SSCP)**

El análisis de ADN mediante SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism Análisis) consiste en la obtención de patrones electroforéticos en función de la estructura tridimensional de los fragmentos de ADN una sola hebra, que a su vez dependientes de su secuencia nucleotídica. Esta técnica permite el establecimiento de identidades mediante la comparación de los perfiles de las

especies presentes en la muestra, y los de los especímenes auténticos utilizados como patrones.

La técnica PCR-SSCP resulta de especial utilidad para detectar mezclas de especies en muestras de alimentos. Este tipo de análisis se desarrolló en un primer momento para la detección de especies pesqueras (Rey-Mendez, 2003), aunque también la discriminación entre especies ganaderas (Campos, 2001). La principal desventaja de esta técnica radica en los problemas de reproducibilidad de los patrones electroforéticos.

#### **4.2.2.2.3 Análisis de Perfiles de ADN por Amplificación Aleatoria (RAPD)**

La técnica RAPD se basa en la utilización de cebadores arbitrarios de pequeño tamaño (unas 10 bases) para realizar la PCR, con lo cual se amplifica cualquier región del genoma flanqueada por secuencias complementarias al cebador y de una longitud adecuada. El número de fragmentos obtenidos es independiente de la complejidad del genoma y se distribuyen arbitrariamente en éste.

Los polimorfismos que se observan son debidos a inserciones y deleciones que alteran la secuencia en uno a los dos puntos de homología con el cebador, y se hacen visibles por la presencia o ausencia de una banda. Como resultado se obtiene patrones electroforéticos con bandas de diferentes tamaños correspondientes a múltiples genes, que forman una huella genética. Se ha observado que algunos de estos patrones son específicos de especie, y por tanto puede ser empleados en la identificación de especies animales y vegetales (Campos, 2001).

Las ventajas de esta técnica son la de poder manejar cebadores universales, su bajo costo, y sencillez debido a que el patrón de bandas es menos complejo que en el caso del análisis por RFLP. Entre sus inconvenientes se encuentra la baja reproductibilidad de sus resultados y el hecho de que tan solo es capaz de detectar diferencias en secuencias de ADN, cuando estas se encuentran en los lugares específicos de reconocimiento de la correspondiente enzima de restricción (Bardsley, 2000).

#### **4.2.2.2.4 Análisis de Polimorfismos de los Fragmentos de Restricción de Satélites (SFLP)**

Esta técnica es similar a la técnica PCR-RFLP, aunque difieren de esta en el tipo de ADN polimórfico que se analiza. El ADN satélite se localiza en los centrómeros de los cromosomas, y por lo tanto no se trata de ADN mitocondrial, si no de ADN nuclear, se caracteriza por presentar un número repetido de secuencias variables en su longitud. Dependiendo del número de pares de bases que contengan dichas secuencias, recibirán distinta denominación. Este tipo de polimorfismos se utiliza en la identificación de especies híbridas o altamente homólogas, como ocurre entre la especie bovina y el búfalo, o la oveja y la cabra (Campos, 2001).

**Cuadro 14.** Comparación de técnicas de análisis de ADN cualitativas.

Técnica	Ventajas	Desventajas
Secuenciación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generan gran cantidad de información.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requieren tiempo e instrumental técnico específico.</li> </ul>
RFLP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buen manejo y conocimiento de la técnica.</li> <li>• Permite la detección de mezclas de especies.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variación intraespecífica en los sitios de restricción.</li> <li>• El procesamiento por calor puede reducir el tamaño de los fragmentos de ADN.</li> <li>• Técnica laboriosa.</li> </ul>
SSCP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite la detección de mezclas de especies.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variación intraespecífica</li> <li>• Problemas de reproducibilidad de patrones</li> </ul>
RAPD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primers universales</li> <li>• Menores problemas de variación intraespecífica.</li> <li>• Bajo costo y sencillez.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problemas de reproducibilidad</li> </ul>
SFLP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite distinguir ciertas especies híbridas o con alta homología entre si</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No esta diseñada para la identificación múltiple de especies</li> </ul>

Fuente: elaboración propia.

Las técnicas anteriores son las más utilizadas en la identificación de especies con fines de autenticidad de especies con fines de autenticación de productos cárnicos. El tiempo medio necesario para el análisis de una muestra de ADN ronda las 2 horas incluyendo la electroforesis y la tinción. La siguiente cuadro muestra las ventajas e inconvenientes más relevantes de las técnicas mencionadas con anterioridad:

#### **4.2.2.3 Análisis Cuantitativo de ADN Mediante PCR**

Este tipo de análisis permite cuantificar la cantidad total de una o varias secuencias de ADN presentes en una muestra. Es importante la utilización de este tipo de métodos, por ejemplo, para el etiquetado de los alimentos (Campos 2001).

##### **4.2.2.3.1 PCR Anidada**

Se trata de una modificación de la PCR en la que en lugar de dos cebadores se utilizan cuatro, dos externos y dos internos. La amplificación se realiza en dos tandas. En la primera se utilizan los cebadores externos y se amplifica una segunda ronda y procede la amplificación con los cebadores interiores. Este método confiere una mayor especificidad y una mayor sensibilidad, por lo que es útil en los casos en los que se presupone que existe un bajo porcentaje de OMGs. Además, no requiere el aislamiento previo del ADN (Bardsley, 2000).

##### **4.2.2.3.2 PCR Competitiva**

Se utiliza un ADN competidor que tiene la misma secuencia complementaria al cebador, de modo que se amplifica el ADN diana de la muestra

y el ADN competidor. A partir de las cantidades obtenidas de ambos productos amplificados se estima estadísticamente la proporción real de ADN diana y de ADN competidor (Tartaglia *et al.*, 1998).

#### **4.2.2.3.3 PCR en Tiempo Real**

Este sistema se basa en la medición de la fluorescencia emitida por una sonda específica del ADN diana marcada con un fluorocromo no radioactivo, que se añade a la reacción de PCR convencional y cuya emisión de fluorescencia depende directamente de la síntesis del nuevo ADN. La fluorescencia emitida es recogida a través de una fibra óptica y leída por un láser (Bardsley, 2000).

Mediante el registro del contenido de la emisión de fluorescencia en cada ciclo se puede monitorizar de manera continua el incremento de los productos amplificados durante la reacción de PCR (Tartaglia, 1998).

#### **4.2.2.3.4 Dilución Limite de PCR**

Consiste en la dilución de la muestra de ADN a concentraciones conocidas hasta llegar al punto limite de la dilución, que se corresponde con el umbral de amplificación del ADN, permitiendo establecer una correlación con la cantidad de ADN presente en la muestra (Campos, 2001).



## 5. Técnicas Analíticas para la identificación de Productos Cárnicos adulterados

### 5.1 Autenticación de Especies de Productos Procesados Térmicamente

Existen varias técnicas para la autenticación de especies cárnicas. Las más usadas son las inmunológicas, electroforéticas y las cromatográficas. El problema con estos métodos, es la dificultad de detectar especies en productos cárnicos procesados térmicamente.

El DNA mitocondrial se reenvuelve mas rápido que el nuclear, además que contiene una mayor diversidad de secuenciada comparadas con el nuclear, facilitando la identificación de las especies relacionadas entre sí, especialmente para los análisis de muestras procesadas (Wolf y Lüthy, 2001). Una de las ventajas radica en que, tiene un alto número de copias, el cual excede al nuclear por un factor arriba de 10000 ( Wolf *et al.*, 1999; Vawter y Brown, 1986). Consecuentemente, la cantidad de tejidos basados en el DNA mitocondrial para el análisis, es muy pequeña. Además el DNA mitocondrial tiene una mayor velocidad de mutación, por lo que resulta en una cantidad suficiente de puntos de mutación que permite la discriminación de especies estrechamente relacionadas (Lockley y Bardsley, 2000).

## 5.2 Técnicas de Identificación de Especies Animales Basadas en el ADN

Entre las técnicas rápidas de reciente aplicación al análisis de los alimentos se encuentran las genéticas, que se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. De estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada y permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática. Esta técnica se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para el control de la calidad de nuevos productos en la industria alimentaria, ya que permite identificar el origen de muchos de los componentes presentes en los alimentos (Bottero *et al.*, 2002; Verkaar *et al.*, 2002) así como detectar y cuantificar microorganismos de interés higiénico-sanitario (Boyapalle *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2001). Los métodos genéticos de identificación de especies, a pesar de ser más caros y exigir un mayor soporte técnico, presentan importantes ventajas con respecto a los métodos de análisis de proteínas (**Cuadro 15 y 16**). Las técnicas basadas en el ADN son especialmente útiles cuando se analizan productos sometidos a tratamientos térmicos intensos, debido a la estabilidad del ADN en dichos procesos (Kangethe *et al.*, 1986).

**Cuadro 15.** Métodos de análisis de proteínas.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapidez en el análisis de las muestras.</li> <li>• Menor costo de los reactivos.</li> <li>• Técnicas más sencillas de aprender.</li> <li>• Amplia disponibilidad de datos para muchas especies.</li> <li>• Técnicas en general más baratas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es imposible en ocasiones analizar muestras sometidas a procesos intensos o a tratamientos de esterilización.</li> <li>• La conservación de las muestras ha de hacerse en buenas condiciones para obtener resultados reproducibles.</li> <li>• Se requiere gran cantidad de muestra.</li> <li>• El análisis de los perfiles obtenidos es bastante complejo.</li> </ul>

**Cuadro 16.** Métodos de análisis de ADN.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se necesita muy poca cantidad de muestra (unos 100 mg de tejido).</li> <li>• Se pueden analizar muestras conservadas.</li> <li>• Es posible analizar muestras sometidas a intensos procesados, e incluso esterilizadas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El análisis es relativamente lento y caro.</li> <li>• Técnicas más complejas, que necesitan por tanto de personal más especializado.</li> <li>• Existe menos información disponible.</li> </ul>

### 5.2.1 ADN Mitocondrial (mtADN)

La mayoría de las técnicas moleculares utilizadas en la autenticación de especies en productos procesados, están basados en el ADN mitocondrial (mtADN), ya que éste se renaturaliza más rápido que el ADN nuclear, además que contiene una mayor diversidad de secuencias comparadas, facilitando la identificación de las especies relacionadas entre sí, especialmente para los análisis de muestras procesadas (Wolf y Lúthy, 2001). Una de las principales ventajas de utilizar el mtADN, radica que en que tiene un alto número de copias, ya que hay un mayor número de mitocondrias por células que núcleos (Vawter y Brown, 1986; Wolf *et al.*, 1999). El ADN mitocondrial tiene una mayor velocidad de mutación, posee un mayor número de regiones conservadas, además de que su talla es mucho menor a la del nuclear, lo que permite la des criminación de especies estrechamente relacionadas (Lockley y Bardsley, 2000).

El ADN es más termoestable que la mayoría de las proteínas, por lo que es menos susceptibles a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos, aun cuando es degradado parcialmente es posible identificar diferencias; estas técnicas que utilizan el ADN para su estudio son más sensibles, además de que el ADN está presente en la mayoría de las células de un organismo y en principio

con la misma información independientemente del tejido (Lockley y Bardsley, 2000).

Son varios los factores a considerar antes de que un segmento específico de ADN sea seleccionado para ser amplificado. Esta región del genoma tiende a presentar mutaciones lo suficientemente rápidas en organismos estrechamente relacionados que tienen diferentes secuencias, ya que las variaciones dentro de una especie son sustanciales. La longitud del segmento deberá ser lo suficientemente largo para permitir la detección de diferentes secuencias entre especies estrechamente relacionadas, pero lo suficientemente cortas, para ser determinada mediante técnicas electroforéticas utilizando un estándar del ADN. La mayoría de las secuencias de genes empleados en la autenticación de especies, se encuentran en bancos de datos disponibles. Las secuencias del gen para el citocromo b y ATPasa 6 y 8, han sido determinadas para muchos vertebrados incluyendo mamíferos, aves y peces. Estos genes tienen una similitud en cuanto a secuencias, así como en rangos de diversificación (Lockley y Bardsley, 2000).

El citocromo b se ha convertido en el más popular dentro de la población de genetistas y biólogos moleculares. La secuencia de aminoácidos del citocromo b es altamente conservadora. Un factor de elección del citocromo b, al igual que el gen ATPasa 6 y 8, es que al utilizar un solo par de cebadores se puede amplificar un segmento de 309 pb de cualquier vertebrado (Bartlett y Davidson, 1992).

#### **5.2.1.1 Características del ADN Mitocondrial**

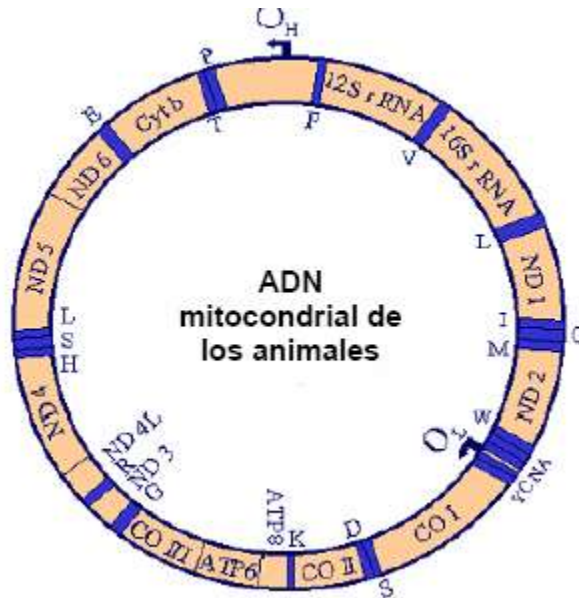
El genoma mitocondrial de los animales es una pequeña molécula de ADN bicatenario circular, aunque se conocen dos organismos en los que aparece como

una molécula lineal, de la que existen muchas copias dentro de la mitocondria. Dependiendo del tipo de célula se pueden encontrar hasta incluso mil copias (**ver figura 4**). El tamaño del genoma mitocondrial en los animales se estima en unos  $16.500 \pm 500$  pares de bases (pb), aunque existen variaciones tanto intraespecíficas como interespecíficas (Moritz *et al.*, 1987; Avise *et al.*, 1987).

El ADNmt es un sistema génico que se diferencia del nuclear en algunos aspectos:

- Es más abundante en las preparaciones de ADN total en comparación con el ADN nuclear.
- Posee una alta tasa de mutación que resulta en un cumulo de mutaciones puntuales que permiten la diferenciación de especies cercanas.
- El ADN mitocondrial tiene un tamaño pequeño.
- Existen varias copias de ADN mitocondrial en la célula.
- Tan sólo posee un alelo y las consiguientes ambigüedades debidas a los genotipos heterocigóticos pueden ser evitadas.
- La secuencia del ADN mitocondrial se conoce para numerosas especies animales.

El ADN utilizado en la detección de transgénicos, vendrá determinado por la secuencia transgénica que se desee identificar, que será indicativa de la presencia de organismos modificados genéticamente en el alimento. Las técnicas empleadas para la detección de transgénicos se basan principalmente en distintas variantes de la PCR, que permiten identificar o cuantificar estas secuencias (Lockley, 2000).



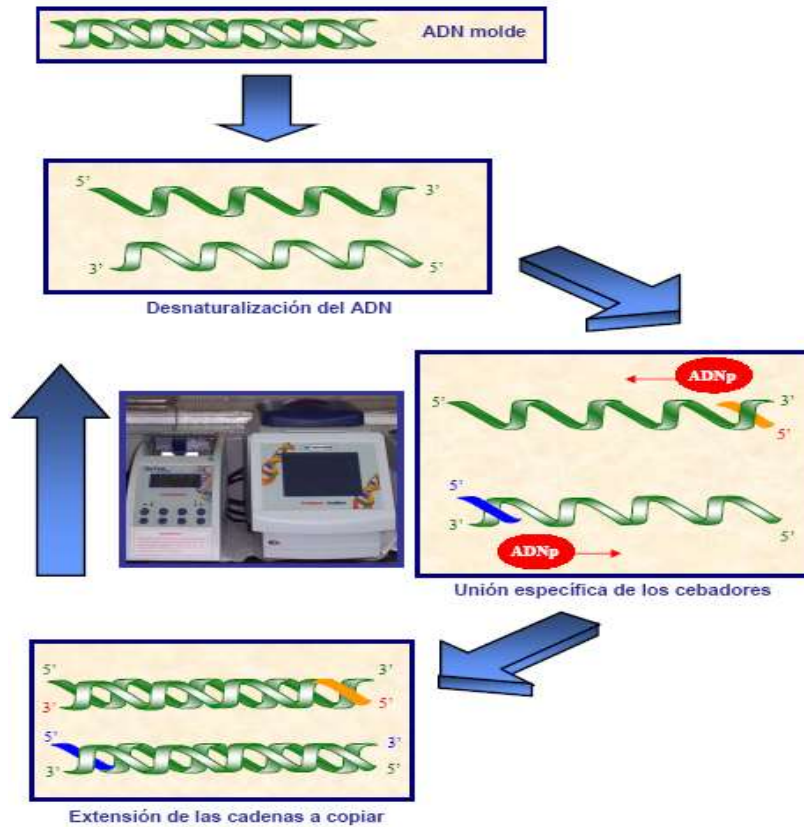
**Figura 4.** ADN mitocondrial de los animales.

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

Ideada por el científico Kary Mullis a mediados de los 80 y más conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la reacción en cadena de la polimerasa ha cambiado el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX. El gran éxito científico de la PCR reside en que permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular.

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas (**Figura 5**) (Watson *et al.*, 1992):

- Desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90°C.
- Unión específica de los cebadores (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión ( $T_a$ , *annealing temperature*) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción. La  $T_a$  depende de la composición de bases y del tamaño de los cebadores. Se suelen emplear dos cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR.
- Extensión de la cadena de ADN a copiar a partir de los cebadores, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra. La polimerasa empleada inicialmente, procedente de *Escherichia coli*, se desnaturalizaba cuando se sometía a temperaturas superiores a 90°C durante la primera etapa de cada ciclo y por lo tanto, había que reponerla al inicio de cada fase de extensión. En la actualidad, sin embargo, se utilizan enzimas termoestables como la *Taq* polimerasa (Saiki y col., 1988), procedente del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*. Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos, la cantidad de ADN generado se incrementa exponencialmente. De este modo, al final de  $n$  ciclos el número de copias de ADN por cada molécula será de  $2^n$ .



**Figura 5.** Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Un proceso de PCR típico, de entre 20 a 40 ciclos, permite amplificar por tanto un millón de veces como mínimo el número de copias del fragmento de ADN diana que exista en la muestra original. Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Cuando los fragmentos esperados son de un tamaño muy pequeño se pueden emplear también geles de poliacrilamida.

La utilización de polimerasas termoestables junto con el diseño de termocicladores, aparatos que permiten llevar a cabo los ciclos de tiempo y



temperatura necesarios de un modo rápido, han permitido la completa automatización de la técnica de PCR, facilitando así su empleo rutinario. Otro factor clave para la expansión de esta técnica ha sido la creciente disponibilidad de cebadores específicos, posibilitada tanto por los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos que han permitido conocer las secuencias de un número considerable de genes, como por el desarrollo de equipos y reactivos que permiten una síntesis rápida y económica de los mismos (Watson *et al.*, 1992).

La técnica de PCR presenta sin embargo una limitación: es necesario conocer parte de la secuencia que se quiere amplificar, al menos aquellas zonas en las que se van a unir los cebadores. Esto, que en principio podría suponer un importante obstáculo a la hora de amplificar ADNs desconocidos, se ha conseguido resolver siguiendo distintas estrategias. Por un lado, se pueden utilizar las secuencias génicas de diversas especies conocidas para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar cebadores denominados *universales*, que permitan la amplificación del mismo gen en una gran variedad de especies (Kocher *et al.*, 1989; Bartlett y Davidson, 1992; Meyer *et al.*, 1995). En otras ocasiones, es posible conocer la secuencia aminoacídica de la proteína que codifica un determinado gen. En estos casos, se pueden diseñar cebadores que amplifiquen dicho gen basándose en el empleo de codones de la especie que estamos estudiando y en posibles homologías con genes similares que hayan sido secuenciados en otras especies (Venkatesh y Brenner, 1997).

La metodología convencional utilizada para la identificación de especies animales ha estado principalmente basada en el análisis de proteínas. Actualmente, el análisis del ADN y, concretamente, las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una atractiva estrategia para la identificación de especies ya que son rápidas, pueden diferenciar especies

estrechamente relacionadas filogenéticamente y permiten el análisis de muestras sometidas a tratamientos intensos (Wolf *et al.*, 2005; Sáez *et al.*, 2007).

La totalidad de los estudios realizados en la identificación genética de especies en carnes y productos cárnicos se ha encontrado en especies como la vaca, oveja, cabra, cerdo, pollo, pavo siendo prácticamente inexistentes los estudios realizados para la diferenciación de carnes y productos cárnicos procedentes de aves como el pavo y pollo, cerdo (Rodríguez *et al.*, 2006; Lahiff *et al.*, 2001; Girish *et al.*, 2004).

La identificación de especies animales mediante técnicas genéticas exige una cuidadosa selección de los marcadores genéticos a utilizar. En la mayoría de las investigaciones realizadas se ha elegido como marcador el gen mitocondrial citocromo b y otros como el gen que codifica para la subunidad 12s del ARNr. Los genes mitocondriales, y en concreto la región 12S, cumplen muchas de las cualidades exigidas para el desarrollo de las técnicas de identificación de especies (Wolf *et al.*, 2001).

Bellagamba *et al.* (2003), emplearon el gen 12S ARNr para la amplificación mediante PCR de fragmentos específicos de rumiantes (231pb), cerdo (186 pb) y aves de corral (256 pb). El límite de detección del ensayo en las harinas de pescado que analizaron fue del 0,125% para las muestras de vaca, oveja, cerdo y pollo y del 0,5% para las muestras de cabra. Asimismo, han desarrollado una técnica de PCR múltiple para la detección simultánea de ADN de rumiantes y cerdo que tiene un límite de detección de 0,25%.

Bottero *et al.* (2003), desarrollaron una técnica de PCR múltiple, utilizando los genes mitocondriales 12S y 16S ARNr, para identificar la presencia de vaca,

oveja y cabra en muestras de leche y queso. Wan y Fang (2003) utilizaron un fragmento del gen citocromo b de 408 pb, para identificar específicamente muestras de tigre y evitar su comercialización ilegal. A pesar de su simplicidad, la identificación de especies animales mediante PCR sin el apoyo de ninguna otra técnica complementaria presenta el inconveniente de que es necesario conocer previamente las secuencias de las especies que se pretenden diferenciar, a fin de poder diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. Aunque en la actualidad esto es más sencillo gracias a las cada vez más amplias bases de datos disponibles, en ocasiones es imposible de llevar a cabo ya que hay algunas especies animales de las que no se conoce ninguna secuencia.

El uso combinado de la PCR con otras técnicas complementarias, como la secuenciación, la técnica de RFLP, RAPD o la técnica de SSCP, han hecho posible la identificación de un gran número de especies.

### **5.2.3 Secuenciación de Fragmentos de ADN Amplificados por PCR**

Este método de identificación de especies consiste en la amplificación de un determinado fragmento génico por PCR y su posterior secuenciación. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas se pueden identificar diferencias interespecíficas que permitan distinguir las especies estudiadas. Para seleccionar adecuadamente la región del genoma que se debe amplificar es preciso tener en cuenta varias premisas (Bartlett y Davidson, 1992):

- Debe acumular mutaciones con suficiente rapidez para que organismos estrechamente relacionados tengan diferentes secuencias nucleotídicas, pero con la suficiente lentitud para que la variación intraespecífica no sea importante.

- El tamaño del segmento de ADN ha de ser lo bastante largo para detectar diferencias en la secuencia entre especies próximas, pero suficientemente corto para poder secuenciarla en un gel estándar de secuenciación.
- Debería elegirse un gen que codifique por una proteína. De este modo, los errores de amplificación y/o secuenciación pueden detectarse traduciendo la secuencia de nucleótidos y comparándola con la secuencia aminoacídica.
- La existencia de secuencias del gen seleccionado en las bases de datos correspondientes a otros organismos sería de gran interés, ya que nos permitiría comparar dichas secuencias con las obtenidas en nuestro estudio.

El análisis de las secuencias obtenidas suele requerir la utilización de programas informáticos complejos. Bartlett y Davidson (1992) fueron los primeros en introducir un programa, basado en la elaboración de árboles filogenéticos, que permite comparar la secuencia de la especie problema con la de otras especies previamente secuenciadas e introducidas en la base de datos. Gracias a este programa informático se puede llevar a cabo la identificación de especies en muestras (siempre que en la base de datos haya secuencias correspondientes a las especies que se pretende identificar), así como se pueden establecer relaciones filogenéticas entre especies. Sin embargo, la gran importancia que está adquiriendo la identificación de especies ha hecho que se diseñen otros programas informáticos más específicos, que ya no están basados en la construcción de árboles filogenéticos, sino en la elaboración de matrices de valoración de distancias genéticas entre secuencias (Forrest y Canergie, 1994; Meyer y Candrian, 1996).

El gen mitocondrial que codifica el citocromo b se ajusta muy bien a todas las premisas expuestas anteriormente para la selección del fragmento a amplificar.

Por ello ha sido el más utilizado en la identificación de especies animales. Kocher *et al.*, (1989) emplearon los genes mitocondriales que codifican la región control, el citocromo b, y el 12S ARNr para identificar más de cien especies animales, entre las que se incluyen mamíferos, aves, anfibios, pescados y algunos invertebrados.

### **5.3 Técnicas de Identificación de Especies Animales Basadas en el Análisis de Proteínas**

Las técnicas utilizadas en la identificación de especies animales cuando no se dispone de base anatómica se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas basadas en el análisis de proteínas y las que se centran en el análisis del ADN o técnicas genéticas. Si bien los métodos basados en el análisis de proteínas han sido los más utilizados, los grandes avances que han tenido lugar en los últimos años en las técnicas de biología molecular han permitido el rápido desarrollo de numerosas técnicas genéticas que se han aplicado con éxito a la identificación de especies.

Los métodos que se utilizan para la identificación de especies animales, basados en el análisis de proteínas, incluyen distintas técnicas electroforéticas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) y las técnicas inmunológicas. Las proteínas del tejido muscular son, en esencia, muy similares en todas las especies animales pudiéndose clasificar, atendiendo a su solubilidad, en tres grandes grupos:

- Las **proteínas sarcoplásmicas**, que constituyen un 30-35% de las proteínas totales, se extraen fácilmente con agua o soluciones salinas diluidas. A este grupo pertenecen gran número de enzimas implicadas en el metabolismo intermediario de la célula. Esto hace que las proteínas

sarcoplásmicas puedan resultar muy adecuadas para la identificación de especies y por lo tanto, que sean las más utilizadas.

- Las **proteínas miofibrilares**, que constituyen el 65-75% de las proteínas totales, se extraen empleando soluciones salinas de fuerza iónica media o alta. De ellas, la miosina, actina, tropomiosina y troponina son las proteínas mayoritarias. Aunque sus secuencias de aminoácidos son muy conservadas entre especies, pueden ser importantes en la identificación de las mismas cuando el producto ha sido sometido a una desnaturalización por calor.
- Las **proteínas del tejido conectivo o del estroma**, representan de un 3-10% del contenido proteico total en la carne. Son insolubles en soluciones salinas y es necesario el empleo de soluciones ácidas o básicas para su completa disolución. Dentro de ellas se encuentran la elastina y el colágeno, siendo esta última la más abundante. Al igual que sucede con las proteínas miofibrilares, resultan de interés en la identificación de especies animales cuando se trata de productos desnaturalizados por calor.

En comparación con las técnicas genéticas, las técnicas basadas en el análisis de proteínas presentan las siguientes ventajas: (a) las muestras se pueden analizar rápidamente; (b) el costo de los reactivos es relativamente bajo; (c) las proteínas tienen una función conocida; y (d) las técnicas son muy sencillas de aprender (Ferguson *et al.*, 1995).

Asimismo, estas técnicas presentan también inconvenientes importantes: (a) las muestras deben ser frescas o congeladas y encontrarse en buen estado; (b) se requieren grandes cantidades de muestra; (c) existe un bajo número de

alelos por *locus*; y (d) el análisis de perfiles puede resultar difícil, especialmente en individuos poliploides (Ferguson *et al.*, 1995).

Los métodos basados en el análisis de proteínas que se utilizan para la identificación de especies animales incluyen distintas técnicas electroforéticas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como las técnicas inmunológicas.

### **5.3.1 Técnicas Electroforéticas**

La electroforesis es un procedimiento analítico basado en la separación de moléculas cargadas en un medio acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado entre dos electrodos, uno positivo y otro negativo. El movimiento de las moléculas, en nuestro caso proteínas, dependerá de su tamaño y de la carga neta que presenten en el pH del tampón seleccionado para el análisis. Aquellas moléculas que tengan una carga neta mayor, tenderán a moverse más rápidamente que aquellas con menor carga neta. En el caso de que esta sea igual, las moléculas menores se desplazarán con mayor rapidez.

Las técnicas electroforéticas incluyen varios sistemas de separación. La elección de uno u otro va a depender del grado de resolución que se desee obtener, así como del tipo de muestra que se quiera analizar: fresca o congelada, sometida a un tratamiento térmico ligero o a un proceso de esterilización. En general, las técnicas electroforéticas en gel han sido poco utilizadas debido a su bajo poder de resolución. Sin embargo, el isoelectroenfoque (IEF), la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y la electroforesis capilar (EC) son los sistemas electroforéticos más utilizados en la identificación de especies de animales de abasto.

### **5.3.1.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS (sdspage)**

Muchos años después de ser utilizada por primera vez, la electroforesis en geles de poliacrilamida continua jugando un papel principal en los análisis experimentales de proteínas y mezclas de proteínas. Aunque la separación bidimensional de proteínas en gel tiene alto grado de resolución (IEF y PAGE), la electroforesis uni-dimensional aun es la técnica mas ampliamente utilizada ya que ofrece suficiente resolución para la mayoría de las aplicaciones y además se puede manipular varias muestras a la vez lo que permite hacer estudios comparativos. Los protocolos básicos para preparar y correr geles de poliacrilamida uni-dimensionales han cambiado muy poco en los años, sin embargo, ha habido avances considerables en el análisis de proteínas separadas mediante esta técnica; por ejemplo, la metodología de blotting de amplio rango (Ghovvat *et al.*, 2009).

Esta técnica consiste en disolver las proteínas de la muestra en soluciones del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS). De este modo, las proteínas pierden sus cargas individuales adquiriendo una carga neta negativa como resultado del complejo *proteína-anión SDS* formado (Weber y Osborn, 1969). La cantidad de detergente que se incorpora por unidad de masa es la misma para todas las proteínas, y en consecuencia, la movilidad en la electroforesis va a depender exclusivamente de la masa. La separación de las proteínas, una vez disueltas, se hace en geles de poliacrilamida a los que se incorpora también SDS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS se ha empleado muy poco en muestras no sometidas a tratamiento térmico. Como se expuso en el apartado anterior, el IEF ha sido la técnica de elección en este tipo de productos gracias a su mayor poder de resolución.



Hofmann (1987) trató de diferenciar especies animales como la vaca, cerdo y caballo mediante SDS-PAGE, pero obtuvo patrones proteicos muy similares en las tres especies consideradas, observando sólo diferencias en la intensidad de las bandas.

Ozgen Arun y Ugur (2000) identificaron varias especies animales (pollo, pavo y cerdo) en salchichas calentadas a 75°C durante 15 min mediante SDS-PAGE. El límite de detección de caballo y cerdo en vaca fue del 5%.

En cuanto a los inconvenientes de la técnica de SDS-PAGE, se puede decir, que es la complejidad de los perfiles proteicos obtenidos y la necesidad de operarios e instrumental especializado.

### **5.3.1.2 Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)**

Las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que constituyen en la actualidad las técnicas inmunológicas más ampliamente utilizadas, se caracterizan por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. En estas técnicas, uno de los elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado (Clark y Engvall, 1980). En algunos formatos, como fase sólida se utilizan membranas, generalmente de nitrocelulosa, a las que se unen las proteínas mediante enlaces hidrofóbicos. Este último tipo de ensayo se denomina *Immunodotting*. La interacción antígeno-anticuerpo se detecta

mediante la reacción colorimétrica producida por una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA, permite cuantificar la reacción inmunológica. Esto supone una importante ventaja frente a la inmunodifusión y la inmunoelectroforesis, que son técnicas cualitativas. En cuanto a la enzima utilizada en la conjugación al antígeno o al anticuerpo es conveniente que esté purificada, que sea activa, fácil de obtener y que al reaccionar con el sustrato origine un producto fácilmente observable y cuantificable.

Las técnicas inmunoenzimáticas se han desarrollado en diversos formatos atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo. En la identificación de especies, los más utilizados son el ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA *sandwich* (Patterson y Jones, 1990). En el ELISA indirecto (**Figura 2**), el antígeno se adsorbe a una fase sólida, y el anticuerpo que se añade a continuación, se une al antígeno inmovilizado. El anticuerpo puede estar directamente conjugado a una enzima o bien se incorpora un segundo anticuerpo marcado con una enzima que reconoce como antígeno al anterior. Finalmente, se adiciona el sustrato específico de la enzima. La degradación del sustrato por la enzima produce una reacción colorimétrica cuantificable por espectrofotometría.

La técnica de *Immunodotting* es una modificación del ELISA indirecto en la que el ensayo se lleva a cabo en una membrana de nitrocelulosa en lugar de en una placa de poliestireno. Los sustratos utilizados en el *immunodotting* se diferencian de los usados en la técnica de ELISA, en que el producto de la reacción enzimática es insoluble y precipita en el lugar de formación. De este modo, la reacción inmunológica se aprecia gracias a la formación de una banda teñida.

La técnica del *immunodotting* presenta importantes ventajas frente al ELISA: a la nitrocelulosa se unen e inmovilizan un menor número de moléculas proteicas que a las placas de poliestireno que podrían ser responsables de las reacciones cruzadas, se utiliza menor cantidad de muestra y el ensayo es sencillo y rápido. Su principal inconveniente, sin embargo, es que se trata de una técnica cualitativa.

Macedo-Silva *et al.* (2000), han conseguido identificar diversas especies de animales de abasto (vaca, pollo, cerdo y caballo) en hamburguesas utilizando la técnica del *immunodotting*.

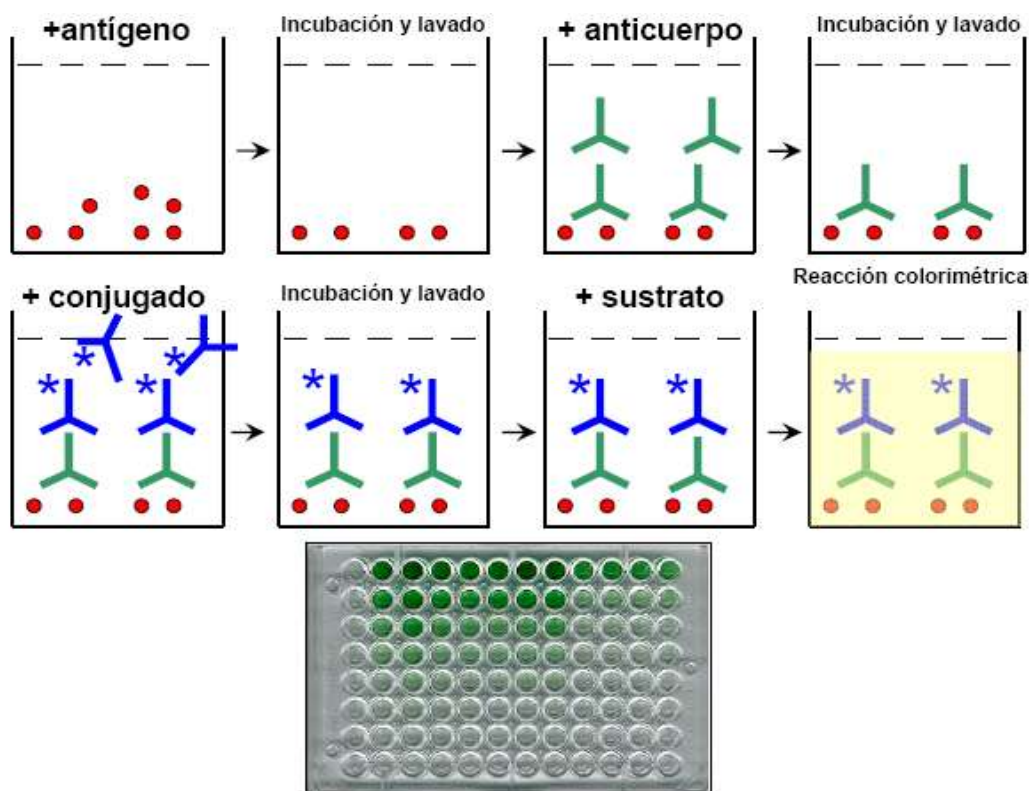


Figura 6. Técnica de ELISA.

El principal inconveniente que presenta el empleo de anticuerpos policlonales producidos frente a extractos musculares solubles, reside en que en

ocasiones son poco específicos y no sólo reconocen la especie frente a la cual se han producido sino también otras (Ayuso *et al.*, 2000; Restani *et al.*, 2002) siendo necesario su purificación.

En el ELISA competitivo, el antígeno purificado se adsorbe a la fase sólida. A continuación, se añaden conjuntamente una muestra que contiene una concentración desconocida de antígeno y un anticuerpo específico marcado con una enzima. Los antígenos presentes en la muestra competirán con los antígenos movilizados por su unión al anticuerpo. Seguidamente, se eliminarán los anticuerpos unidos a los antígenos de la muestra por un lavado. La unión de los anticuerpos a los antígenos adsorbidos a la fase sólida, se mide por la reacción colorimétrica resultante de la adición del sustrato. Cuando la muestra contiene una gran concentración de antígeno, no quedan anticuerpos disponibles para reaccionar con los antígenos inmovilizados y por tanto la reacción colorimétrica es poco intensa. Mientras que cuando el antígeno no está presente en la muestra, se unen una gran cantidad de anticuerpos al antígeno inmovilizado en la fase sólida.

Las primeras aplicaciones de las técnicas de ELISA para la detección y cuantificación de carnes de diferentes especies animales en mezclas cárnicas se deben a Kangethe *et al.*, (1982) y Whithaker *et al.*, (1982). En ambos trabajos, se emplearon anticuerpos policlonales obtenidos frente a la albúmina sérica de vaca, oveja, caballo, canguro, cerdo y camello y, mediante un ELISA indirecto, se consiguieron niveles de detección del 3% de estas especies en diversas mezclas cárnicas. Para eliminar las reacciones cruzadas, los anticuerpos se neutralizaron con las correspondientes albúminas heterólogas. El empleo de los anticuerpos policlonales en diversos formatos de ELISA también ha hecho posible la detección y cuantificación de carne de pollo (Martín y col., 1988a), caballo (Martín y col., 1988b) y cerdo (Martín y col., 1988c) en mezclas de carne, utilizando inmunoseros obtenidos frente a las proteínas sarcoplásmicas del músculo.

## **6. CONCLUSIÓN**

En la actualidad, las técnicas genéticas constituyen unas de las alternativas más específicas para llevar a cabo la diferenciación de especies animales. Las técnicas genéticas aplicadas a la identificación de especies se basan, en su mayoría, en la amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y en la posterior utilización de técnicas complementarias como la secuenciación (PCR- Secuenciación) o el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR.RFLP).

La metodología convencional utilizada para la identificación de especies animales ha estado principalmente basada en el análisis de proteínas. Actualmente, el análisis de ADN y, concretamente, las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una atractiva estrategia para la identificación de especies ya que son rápidas, pueden diferenciar especies estrechamente relacionadas filogenéticamente y permiten el análisis de muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos.

El impacto de la PCR en la biología molecular ha sido muy grande la reacción se lleva a cabo fácilmente, y permite la amplificación de secuencias específicas de ADN con un enorme rendimiento. De un principio básico, se han desarrollado muchas variantes con aplicaciones en la tecnología de genes. Esencialmente el ADN polimerasa se utiliza para la replicación repetida de un segmento definido de ADN. El número de moléculas de ADN se incrementa exponencialmente, duplicándose en cada ciclo de replicación, de tal manera que se puede obtener una cantidad enorme de ADN a partir de un pequeño número de copias del templado inicial.

Las técnicas basadas en el análisis de ADN tienen ciertas ventajas y desventajas. Las ventajas pueden ser:

- Se necesita muy poca cantidad de muestra (unos 100 mg de tejido).
- Se pueden analizar muestras conservadas.
- Es posible analizar muestras sometidas a intensos procesos, e incluso esterilizadas.
- Se pueden detectar mutaciones salientes (imposibles de detectar mediante análisis de proteínas).
- El ADN es el mismo en todos los tipos celulares de un organismo.

En cuanto las desventajas son:

- El análisis es relativamente lento y caro.
- Técnicas más complejas, que necesitan por tanto de personal más especializado.
- Existe menos información disponible.

Las distintas técnicas para diferenciar las especies cárnicas están basadas en la exanimación del estrato músculo. La carne o los productos cárnicos térmicamente procesados son homogenizados y extraídos con agua o diluidos con un solución tampón, filtrados o centrifugados para obtener la compleja solución que contiene proteínas y células sarcoplasmáticas.

En cuanto el análisis de proteínas podemos mencionar ciertas ventajas y desventajas las cuales son:

### Ventajas

- Rapidez en el análisis de las muestras.
- Menor costo de los reactivos.
- Técnicas más sencillas de aprender.
- Amplia disponibilidad de datos para muchas especies.
- Técnicas en general más baratas.

### Desventajas

- Es imposible en ocasiones analizar muestras sometidas a procesos intensos o a tratamientos de esterilización.
- La conservación de las muestras ha de hacerse en buenas condiciones para obtener resultados reproducibles.
- Ser requiere gran cantidad de muestra.
- El análisis de los perfiles obtenidos es bastante complejo.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

Adrews, A. T. 1998. Electrophoresis Methods. In "Analytical Methods of Food authentication". (Eds. P.R. Ashurst and Dennis M. J.) Blackie Academic & Profesional, London, pp, 204-238.

Ahmed, L. 2002. Meat Traceability Using DNA Markers: Aplication to the beef industry. *Meat Science*, 61:367-373.

Anklam, E. y Battaglia. R. 2001. Food analysis and consumer protection. Trends in Food Science & Technologi. *Journal of Food Protection*. 66: 103-109.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990). *Official Methods of Analysis*, 15<sup>a</sup> ed., Washington D.C., EE.UU., 883-889.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. y Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography, the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

Ayuso, R., Lehrer, S.B., Lopez, M., Reese, G., Ibáñez, M.D., Esteban, M.M., Ownby, D.R. y Schwartz, H. 2000. Identification of bovine IgG as a major cross-reactive vertebrate meat allergen. *Allergy* 55:348-354.

Bardsley, A. T. 2000. Electrophoresis Methods. In *Analytical Methods of Food Authentication*. (Eds. P.R. Ashurst and Dennis M.J. Blackie Academia & Profesional, London, pp, 204-238.



Bartlett, S.E. y Davidson, W.S. 1992. FINS (forensically informative sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *BioTechniques* 12: 408-411.

Bellagamba, F., Valfrè, F., Panseri, S. y Moretti, V.M. 2003. Polymerase Chain Reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *Journal of Food Protection* 66: 682-685.

Briskey, E. J. 1964. Etiological status and associated studies of pale, soft, exudative porcine musculature. *Adv. Food Res.* 13:89.

Buntjer, J. B., Lamine, A., Haagsma, N. y J. A. Lenstra. 1999. Species Identification by Oligonucleotide Hybridisation: the influence of processing of meat products. *Journal of Science of Food and Agriculture.* 79:53-57.

Bottero, M.T., Civera,t., Anastasio, a., Turi, R.M. y Rosati, s. 2002. Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection* 65: 362-366.

Bottero, M.T., Civera,T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P. y Turi, R.M. 2003. a multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* 13: 277-282.

Boyapalle, S., Wesley, I.V., Hurd, H.S. y Reddy, P.G. 2001. Comparison of culture, multiplex, and 5´nuclease polymerase chain reaction assays for the rapid detection of *yersinia enterocolitica* in swine and pork products. *Journal of Food Protection* 64: 1352-1361.

Calderón, S. 2005. Gastronomía.... Una medida Postergada. *Agrobusiness*. 4: 6-7.

Calva, J. L. 2004. Política Agrícola para el Desarrollo Agropecuario Sostenido con Equidad". *Agrobusiness*. 9: 2-3.

Calva, J. L. 2005. México más allá del neoliberalismo. Opciones dentro del campo global, Plaza y Janes, México.

Calvo, J. H., Zaragoza, P. y R. Osta. 2002. Technical Note: A Quick and More Sensitive Method to identify pork in processed and un processed food by PCR Amplification of a new specific DNA fragment. *J. Anim Sci.* 79 :108-2112.

Campos, H. A. 2001. Marcadores Moleculares: Conceptos. *Notas Técnicas. AgroSur*. 23:68-75.

Cancalon, P.F. 1995. Capillary electrophoresis: a useful technique for food analysis. *Food Technology* 49: 52-58.

Cancalon, P.F. 1995. Capillary electrophoresis: a new tool in food analysis. *Journal of AOAC International* 78:12-15.

Clark, R.B. y Engvall, E. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Theoretical and practical aspects. En *Enzyme Immunoassays*. Magio, E.T. (Ed.), CRC Press, Cleveland, EE.UU., pp: 161-179.

Cruz, G. 2006. Power of One, el Nuevo concepto de las salchichas, diciembre de 2006, pp 12.

Cota-Rivas, M., y Vallejo-Córdoba, B.V. 1997. Capillary electrophoresis for meat species differentiation. *Journal of Capillary Electrophoresis* 4: 195-199.

Chavet, E. y Gonzalez, A. 2001. Aprendizaje y capacidades tecnológicas en la industria alimentaria en México. *Expansion*. No. 770. Mexico, 2001, pp. 114-119.

Chikuni, K., Tabata, T., Saito, M. y Monma, M. 1990. Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. *Animal Science and Technology* 65: 571-579.

De la Torre, M. 2008. Alimentos y biotecnología. *Cuadernos de nutrición*.2:60-90.

Escalante, A., Ibarra, S., García, M. 2007. Alianzas estratégicas, formulación de éxito para GIMSA, *Agrobusiness*. 1:3-4

FAO. 2005. Respondiendo ante la revolución pecuaria políticas pecuarias 01  
<http://www.rlc.fao.org/es/ganadería/docspoli.htm>

Ferguson, A., Taggart, J.B., Prodöhl, P.A., Mcmeel, O. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. Journal of Fish Biology 47: 103-126.

Forrest, A.R.R. y Carnegie, P.R. 1994. Identification of gourmet using FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). BioTechniques 17: 24-26.

García-Cañas, V., González, R. y A. Cifuentes. 2002a. Detection of Genetically Modified Maize by the Polymerase Chain Reaction and Capillary Gel Electrophoresis with UV Detection and Laser-Induced Fluorescence. Agric. Food Chem. 50: 1016-1021.

Ghavvati, S., Nassiri, M. R., Mirhoseini, S. Z. y Javadmanesh, A. 2009. Fraude identification in industrial meat products. Meat Science 20: 696-699.

Gonzalez-Cordova, A. F., Calderon de la Barca, A. M., Cota-Rivas, M. y B. Vallejo-Cordoba. 1998. Detección inmuniquímica de la adulteración de chorizo de puerco con proteínas de soya. Food Science and Technology International 4:257.-262.

Guerreo, M. 2004. Campo Mexicano: lo que el TLC se llevó. Expansión. 770: 220-229.

Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B.M. y Bhaskar, S. 2004. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science* 66: 551-556.

Hamdan, I.I., Skellen, G.G. y R.D. Waigh. 1998. Use of Capillary Electrophoresis in the Study of Ligand-DNA Interactions. *Nucleic Acids Research* (26). 12:3053-3058.

Hamm, R. 1960. Biochemistry of meat hydration. *Adv. Food Res.* 10:355.

Hargin, K.D. 1996. Identification of the Species of Origin of Raw and Cooked Meat Products Using Oligonucleotide Probes. *Food Chemistry.* 60:437-442.

Hernández, E. 2005. Las cadenas comerciales impactan a las agroindustrias. *Agrobusiness*, diciembre de 2005, pp.7.

Hernández, L. 2008. Megafusión en el mercado de carnes frías. *El financiero*, México, 3 de septiembre de 2008.

Hofmann, K. 1987. Fundamental problems in identifying the animal species of muscle meat using electrophoretic methods. *Fleischwirtschaft* 67: 820-826.

Hsieh, Y-H.P., Woodward, B.B. y HO, S.H. 1998. Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. *Journal of Food Protection* 58: 555-559.

Hunt, D. J., Parkes, H. C. y I. D. Lumley. 1997. Identification of the Species of Origin of Raw and Cooked Meat Products Using Oligonucleotide Probes. *Food Chemistry*. 60 (3):437-442.

Hu, S. y N.J. Dovichi. 2002. Capillary Electrophoresis for the Analysis of Biopolymers. *Analytical Chemistry*. (74). 12:2833-2859.

Ibarra, D. y Acosta, A. 2003. El dilema campesino. *Investigación económica* vol. 42, No. 245, México, abril 2003, pp. 423-436.

Ibarra, A. 2006. Demanda de los productos cárnicos, conferencia obtenida en <http://www.canola.org/aobut/99conven/ibarrainspanisd.tml>, 2006.

INEGI. 2006. *Sistemas de Cuentas Nacionales de México. Cuentas de Bienes y Servicios, 2003-2006*. Aguascalientes Ags. 2008.

Jimenez, M. A. 1991. *Conservación del la carne*. Apoyos Académicos No6. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Kangethe, E.K., Jones, S.J. y Patterson, R.L. 1982. Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *Meat Science* 7: 229-240.

Kangethe, E.K., Jones, S.J. y Patterson, R.L. 1986. Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *Meat Science* 7: 229-240.

Kimura, B., Kawasaki, S., Nakano, H. y Fujii, T. 2001. Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmospherepackaged fish. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 206-216.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. y Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 6196- 6200.

Lahiff, S., Glennon, M., O'brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M. y Shilton, N. 2001. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* 15: 27-35.

Leamon, J., H., Moiseff, A. y J. F., Crivello. 2005. Desarrollo de un proceso altamente productivo de búsqueda y detección de polimorfismos genéticos *Biotechniques*. 28:994-1005.

Lone, E. M. 1997. Antibody Techniques. In *analytical methods of food authentication* (Eds. P.R. Ashurst and Dennis M.J.) Blackie Academic & Profesional, London, pp, 241-266.

Loyo, J. 2007. Identification of the species of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37:157-164.

Lloyd, J. H. 1982. *Nutrición y Alimentos*. Ed Acribia . Vol. 2 pag 214-215. Zaragoza España.

Lüthy, J. 1999. Detection Strategies for food Authenticity and Genetically Modified foods. *Food control*. 10:359-361.

Mackie, I.M. 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science and Technology* 10: 9-14.

Macedo-Silva, A., Barbosa, S.F.C., Alkmin, M.G.A., VAZ, A.J., Shimokomaki, M. y Tenuta-filho, A. 2000. Hamburger meat identification by dot-ELISA. *Meat Science* 56: 189-192.

Mata, L. 2000. Autenticación e Identificación de Alimentos Mediante Métodos Inmunoquímicos. *Alimentación Equipos y Tecnología*. Sep/Oct. Pp. 145-152.

Matter, L. V. 1992. Autenticación e Identificación de Alimentos Mediante Métodos Inmunoquímicos. *Alimentación Equipos y Tecnología*. Sep/Oct. Pp. 145-152.



Meyer, R., Candrian, U. y Lüthy, J. 1994. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *Journal of AOAC International* 77, 617-622.

Meyer, R., Höfelen, C., Lüthy, J. y Candrian, U. 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International* 78: 1542-1551.

Meyer, R. y Candrian, U. 1996. PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 29: 1-9.

Milles, J.A. y Kung, L. Jr. 2002. Detection of Bovine Mitochondrial DNA in Ruminant Feeds: A Molecular Approach to Test for the Presence of Bovine-Derived Materials. *Journal of Food Protection*. Vol. 61. 5:513-518.

Moritz, C., Dowling, T.E. y Brown, W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:269-292.

Newbold, R.P. 1966 .Changes associated with rigor mortis. In "The Physiology and Biochemistry of Muscle as Food" (E.J. Briskey, R.G. Cassens and J.C. Trautman, eds.), pp. 213-224. Univ. of Wisconsin Press, Madison.

Nuñez, I. 2008. Acumulación de capacidades tecnológicas agropecuarias e industrial de productos cárnicos en el modelo de sustitución de importaciones y en el liberalizador, documento de trabajo no publicado, UNAM.

Owen, F.G., y Moline, W.J. 2001. Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products. *Immunology. Meat Science* 40: 327-336.

Ozgen, A. O. y Ugur, M. 2000. Animal species determination in sausages using an SDS-PAGE technique. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 51: 49-53.

PROFECO, 2005. Procuraduría Federal del Consumidor. Estudio de salchichas. *Revista del consumidor*. Julio del 2006, pp.10-18.

Recio, R., Sanz, Y. y Toldrá, F. 2001. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science* 66: 659-665.

Restani, P., Beretta, B., Fiocchi, A., Ballabio, C. y Galli, C.L. 2002. Cross-reactivity between mammalian proteins. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology* 89: 11-15.

Rey- Pérez-Martín, R.I. 2003. Development of an identification and quantitation system for cod (*Gadus morhua*) using Taqman assay. First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. 39: 195-198.

Rivera, E. 2002. Mexico, el plato fuerte. *Reforma*, 17 de abril de 2002.

Rodríguez, J.M. Martínez, J.M., Martínez, M.I., Suárez, A., Herranz, C., Cintas, L.M., y Hernández, P.E. 1998. Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4536-4545.

Rodríguez, M.A., García, T., González, I., Asensio, L., Fernández, A., Lobo, E., Hernández, P.E. y Martín, R. 2006. Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos x Cairina moschata*) foie gras by Multiplex Polymerase Chain Reaction Amplification of the 5S rDNA gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2717-2721.

Rossdale, R., y Muck, R.E. 2003. Estructura y perspectivas de la industria de Alimentos en México. *Comercio exterior*, Vol. 53, Núm. 2, febrero de 2003.

Rossdale, R., y Muck, R.E. 2005. Estructura y perspectivas de la industria de Alimentos en México. *Comercio exterior*, Vol. 20, Núm. 3, Septiembre de 2005.

Sáez, R.H., Wang, J. M., Wu, C. D., y Yin, Q.L. 2009. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique. *Meat Science*. 87:38-44.

Saiki, R.K. 1989. The design and optimisation of the polymerase chain reaction. En: *PCR Technology*. Erlich, H.A. (Ed.), Stockton Press, New York, EE.UU., 7-22.

Saiki, R.K. (1988). The design and optimisation of the polymerase chain reaction. En: *PCR Technology*. Erlich, H.A. (Ed.), Stockton Press, New York, EE.UU., 7-22.

Sánchez, S., y Zapata, C. 2006. Crece el consumo de carnes frías en Mexico. *Agrobusiness*. 1:6-7.

SECOFI.1996. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. NOM-051.SCFI-1994. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Diario Oficial de la federación.

Sebranek, J. G. 2009. Basic Curing Ingredients. In: *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*. Ed. R. Tarté. Springer. New York, NY. USA.

Senell, H. G. J., Oberndorfer, C., Lucke, W. y Van den Weghe, H. F. A. 2004. Diferenciación de productos cárnicos de jabalí europeo (*Sus scrofa scrofa*) y cerdo doméstico (*sus scrofa domestica*) mediante el análisis por PCR. *RCCV*. 57:342-350.

Sieldler, M. K. 2009. Basic Curing Ingredients. In: *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*. Ed. R. Tarté. Springer. New York, NY. USA.

SSA.1998. Secretaria de Salud. NOM-145-SSA1-1995 .Bienes y Servicios de la Carne. Productos Cárnicos Curados y Maduros. Especificaciones Sanitarias. Diario Oficial de la Federación.

SSA. 1993. Secretaria de Salud. NOM-030-SCFI-1993. Información comercial declaración de cantidad en la etiqueta especificaciones. Diario Oficial de la Federación.

SSA. 1994. Secretaria de Salud. NOM-122-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Productos de la Carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación.

SSA. 1995. Secretaria de Salud. NOM- 023-ZOO-1995. Identificación de especie animal en musculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, por la prueba de Inmunodifusión en gel.

Strauch, Dieter. 2002 Limpieza y desinfección de alojamiento e industrias animales. Ed. Acribia.S.A.

Shwedel, K. 2008. La competitividad del sector agroindustrial, *la industria mexicana en le mercado mundial: elementos para una política industrial*, fondo de cultura económica, México, 2008.

Schwartz, D. G. y Guttman, F. K. 2006. Quantitative Competitive (QC) PCR for Quantification of Porcine DNA. *Meat Science*. 57:161-168.

Taylor, U. 1997. Gruma, ¿quien lo iba a pensar?. *Expansion*. 770: 135-141.

Tartaglia, M., saulle, E., Pestalozza, S., Morelli, L., Antonucci, G. y Battaglia, P.A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *Journal of Food Protection* 61:513-518.

Torres, F. 2009. La organización productiva de la industria alimentaria en México. *Comercio exterior*, vol 47 No. 12. Mexico, Enero de 2009, pp 1018-1023.

Vawter, A. y Brown, F. 1986. Nuclear and Mitochondrial DNA Comparisons reveal Extreme rate Variation in the Molecular Clock. *Science*. 234: 194-196.

Verkaar, E.L.C., Nijman, I.J., Boutaga, K. y Lenstra, J.A. 2002. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Science* 60: 365-369.

Venkatesh, B. y Brenner, S. 1997. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene, a comparative analysis of teleost growth hormone gene. *Gene* 187: 211-215.

Wan, Q.H., y Fang, S.G. 2003. Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic Science International* 131: 75-78.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. y Zoller, M. 1992. The polymerase chain reaction. En: *Recombinant DNA*, 2ª ed. Scientific American Books (Ed.), EE.UU., 79-95.

Weber, K. y Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* 244: 4406-4412.

Wehr, H. y Dette, C. 1994. Capillary electrophoresis (CE) – a review. Strategies for method development and applications related to pharmaceutical and biological sciences. *Pharmazie* 49: 83-96.

Weinber, Z. G y Ashbell, G. 2005. Autenticación de carnes procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa por PCR. *RCCV*. 1:215-232.

Werner, F. 1995. Fabricación fiable de embutidos. Editorial acribia, S.A. Zaragoza España.

Whithaker, R.G., Spencer, T.L. y Copland, J.W. 1982. Enzyme linked immunosorbent assay for meat species testing. *Australian Veterinary Journal* 59:125.

Wilson, P.N. y Brigstocke, T.D.A. 2004. DNA-Based Methods for Food Authentication. *Trends in Food Science & technology*. 11:67-77.

Wintero, A. K., Thomsen, P. D. y W. Davies. 1990. A Comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immunoelectrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef. *Meat Science*. 27:75-85.

Wolf, C., Rentsch, J. y Hübner, P. 1998. PCR-RFLP Analysis of mitochondrial dna: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1350-1355.

Wolf, C., Rentsch, J. y Hübner, P. 1999. PCR-RADP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1350-1355.

Wolf, C. y J. Lüthy. 2001. Quantitative Competitive (QC) PCR for Quantification of Porcine DNA. *Meat Science*. 57:161-168.

Yang, X., Chen, H., Gao, H., Li, Z. 2001. Quick and Simple Method for the Identification of Meat Species and Meat Products by PCR Assay. *Meat Science*. 51:143-148.



Zermeño, L., y Escalante, R. 1996. Agricultura y crecimiento. Tesis de Maestría, Facultad de economía, UNAM, México.

Zhang,P.N. 2007. Basic Curing Ingredients. In: Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications. Ed. R. Tarté. Springer. New York, NY. USA.