

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**“IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES CÁRNICAS
COMERCIALES MEDIANTE EL USO DE PCR-RFLP EN
AMAZONAS, 2018”**

Autor: Bach. Josué Tafur Culqui

Asesor: Ph. D. Danilo Edson Bustamante Mostajo

Co - Asesor: Ph. D. Martha Steffany Calderón Ríos

CHACHAPOYAS – PERÚ

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**“IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES CÁRNICAS
COMERCIALES MEDIANTE EL USO DE PCR-RFLP EN
AMAZONAS, 2018”**

Autor: Bach. Josué Tafur Culqui

Asesor: Ph. D. Danilo Edson Bustamante Mostajo

Co - Asesor: Ph. D. Martha Steffany Calderón Ríos

CHACHAPOYAS – PERÚ

2018

Agradecimiento

Mi agradecimiento a Dios por darme la vida y la oportunidad de plantearme metas y poder cumplirlas.

A mi padre, hermanos y amigos por estar en cada momento de mi vida.

A mis asesores por su apoyo incondicional.

A los docentes y directivos de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología (FIZAB) y a todas las personas que de una u otra manera hicieron posible el desarrollo de esta investigación

**Autoridades de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza
de Amazonas**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

Rector

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GUBILLÓN

Vicerrector Académico

Dra. FLOR TERESA GARCIA HUAMÁN

Vicerrectora de Investigación

Ph.D. ILSE SILVIA CAYO COLCA

Decana de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología

Visto Bueno del Asesor de Tesis

Chachapoyas 07 de febrero del 2019

Yo Ph.D. Danilo Edson Bustamante Mostajo identificado con DNI: 43496105 con dirección Jr. Libertad 1308 - Chachapoyas, Asesor de tesis del Bach. Josué Tafur Culqui identificado con DNI: 73121385, expreso lo siguiente:

Que habiendo revisado minuciosamente el informe de tesis con título: "IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES CÁRNICAS COMERCIALES MEDIANTE EL USO DE PCR-RFLP EN AMAZONAS", doy el visto bueno ya que está de acuerdo al formato y cumple con todos los criterios para su impresión y presentación de mismo.

No habiendo más que manifestar cordialmente me despido.

Atentamente:



Ph.D. Danilo/Edson Bustamante Mostajo

DNI: 43496105

Visto bueno del Co-Asesor

Chachapoyas 07 de febrero del 2019

Yo Ph.D. Martha Steffany Calderón Ríos identificado con DNI: 44890495 con dirección Jr. Libertad 1308 - Chachapoyas, Co-asesor de tesis del Bach. Josué Tafur Culqui identificado con DNI: 73121385, expreso lo siguiente:

Que habiendo revisado minuciosamente el informe de tesis con título: “IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES CÁRNICAS COMERCIALES MEDIANTE EL USO DE PCR-RFLP EN AMAZONAS”, doy el visto bueno ya que está de acuerdo al formato y cumple con todos los criterios para su impresión y presentación de mismo.

No habiendo más que manifestar cordialmente me despido.

Atentamente:



PhD. Martha Steffany Calderón Ríos

DNI: 44890495

Jurado Evaluador

M. Sc. ELLARD ERIC VÁSQUEZ MONTENEGRO

Presidente

Dr. RAÚL RABANAL OYARCE

Secretario

Ing. WIGOBERTO ALVARADO CHUQUI

Vocal

Declaración Jurada de no Plagio

Yo, Josué Tafur Culqui identificado con DNI: 73121385 estudiante de la escuela profesional de Ingeniería Zootecnista de la facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:
“IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES CÁRNICAS COMERCIALES MEDIANTE EL USO DE PCR-RFLP EN AMAZONAS, 2018”
2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para lo cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros
4. La tesis no ha ido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional
5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificadas, ni duplicados, ni copiados

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda la responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piraterías, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 14 de febrero de 2019

JOSUÉ TAFUR CULQUI



ANEXO 3-N

**ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL**

En la ciudad de Chachapoyas, el día 05 de febrero del año 2019, siendo las 15:00 horas, el aspirante Josué Tafur Culqui defiende en sesión pública la Tesis titulada: "Identificación de especies cónicas Comerciales mediante el uso de PCR - RFLP en Amazonas 2018"

para obtener el Título Profesional de Ingeniero Zootecnista a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente : M.Cs. Ellard Eric Vásquez Montenegro
Secretario : Dr. Paúl Rabanal Oyace
Vocal : M.Sc. Wigberto Alvarado Chugui



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 16:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

[Signature]
SECRETARIO

[Signature]
VOCAL

[Signature]
PRESIDENTE

OBSERVACIONES: _____

Índice

Agradecimiento	iii
Autoridades de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas	iv
Visto bueno del Asesor	v
Visto bueno del Co-Asesor	vi
Jurado Evaluador	vii
Declaración Jurada de no Plagio	viii
Acta de Evaluación de Sustentación de Tesis	ix
Índice	x
Índice de tablas	xii
Índice de Figuras	xiii
Resumen	xvi
Abstract	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema:	2
1.2. Justificación:	2
II. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. Objetivos:	5
2.2. Variables de estudio:	5
2.3. Materiales	5
2.4. Metodología	6
2.6.1. Diseño de investigación:	6
2.6.2. Población, muestra y muestreo:	6
2.6.3. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos y procedimiento.	7
A. Área de estudio	7
B. Identificación de especies	9
a. Colecta y conservación de muestras	9
b. Extracción de ADN	10

c.	Amplificación del gen mitocondrial 12S por PCR	12
d.	PCR-RFLP (Reacción de la Cadena Polimerasa - Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción)	14
e.	Análisis de datos:	16
III.	RESULTADOS	17
3.1.	Enzima de restricción <i>AluI</i>	17
3.2.	Enzima de restricción <i>ApoI</i>	22
3.3.	Primers Específicos	23
IV.	DISCUSIÓN	26
V.	CONCLUSIONES	29
VI.	RECOMENDACIONES	30
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
	ANEXOS	34

Índice de tablas

Tabla 1. Número de muestras colectadas en los principales mercados de amazonas	7
Tabla 2. Descriptores poblacionales de las provincias de la región Amazonas	8
Tabla 3. Metodología para extracción de ADN de tejidos sólidos.	10
Tabla 4. Primers específicos utilizados para el gen mitocondrial 12S rRNA (Aranguren <i>et al.</i> , 2009)	13
Tabla 5. Patrones de bandas de restricción de las enzimas mostrados por Girish <i>et al.</i> , (2005)	16

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de ubicación geográfica que muestra las seis ciudades donde se llevó a cabo el estudio en la Región Amazonas.	8
Figura 2. Esquema del proceso para la identificación de especies cárnicas	9
Figura 3. Muestras de carne compradas como bovino y porcino	11
Figura 4. Muestras de carne compradas como ovino y caprino	11
Figura 5. Colecta de muestra de carne en un tubo de 1.5 ml., Incubación y centrifugado	11
Figura 6. Filtrado de muestras y ADN extraído en micro tubos para su conservación a -20 °C	12
Figura 7. Preparación del mix para PCR	12
Figura 8. Vortex (para mezcla de componentes de PCR) y centrifugado (spin)	13
Figura 9. Configuración del Protocolo de PCR en el termociclador de punto final	13
Figura 10. Lugar de corte de las enzimas de restricción usadas en la diferenciación de especies cárnicas	14
Figura 11. Enzima de restricción <i>AluI</i> , preparación del buffer enzimático y mezcla de componentes por vortex	15
Figura 12. Centrifugado de la mezcla de reacción con la enzima <i>AluI</i> , incubación a 37°C por 100 minutos e inactivación a 65°C por 15 minutos	15
Figura 13. Mezcla del producto de la reacción con el tinte (Loading 6X) y su posterior puesta en el gel de agarosa	15
Figura 14. Mezcla de reacción más escalera (Ladder), electroforesis en gel por 45 minutos a 120 voltios y transiluminador genómico donde se verán las bandas generadas por la acción de las enzimas de restricción.	15
Figura 15. Patrones de bandas generadas por la enzima <i>AluI</i> para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Chachapoyas: A-E: carne bovina, F-G: carne porcina, H-I: carne ovina.	17
Figura 16. Patrones de bandas generadas por la enzima <i>AluI</i> para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Bagua: A-E: carne bovina, F-G: carne porcina, H-J: carne ovina	18

- Figura 17.** Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Bagua: K: carne ovina, L-N: carne caprina 18
- Figura 18.** Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Bagua Grande: A-B: carne porcina, C-G: carne bovina, H-I: carne ovina 19
- Figura 19.** Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Luya: A-E: carne bovina, F-G: carne porcina, H-I: carne ovina 19
- Figura 20.** Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Pedro Ruiz A-E: carne bovina, F-G: carne porcina 20
- Figura 21.** Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Rodríguez de Mendoza: A-E: carne bovina, F-G: carne porcina, H-I: carne ovina 20
- Figura 22.** Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carne molida colectadas en las ciudades de Bagua: A, Bagua Grande: B, Chachapoyas: C, Luya: D, Pedro Ruiz: E y Rodríguez de Mendoza: F 21
- Figura 23.** Primera repetición Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de embutidos en la ciudad de Chachapoyas: A-B: Mortadela, C-D: Hot Dog de carne, E-F: Hot Dog de pollo 21
- Figura 24.** Segunda Repetición Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de embutidos en la ciudad de Chachapoyas: A-B: Jamonada de pollo, C-D: Mortadela, E-F: Hot Dog de carne, G-H: Hot Dog de pollo 22
- Figura 25.** Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI*: A-B: Chachapoyas, C-I: Bagua 22
- Figura 26.** Patrones de bandas generadas por la enzima *ApoI*: J-K: Bagua Grande, L-M: Luya, N-Ñ: Rodríguez de Mendoza 22
- Figura 27.** Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Bovino: A-E: Chachapoyas, F-J: Bagua Grande 23
- Figura 28.** Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Bovino: A-E: Bagua, F-J: Pedro Ruiz 23

- Figura 29.** Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Bovino: A-E: Luya, F-J: Rodríguez de Mendoza 23
- Figura 30.** Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Porcino: A-B: Chachapoyas, C-D: Bagua, E-F: Bagua Grande, G-H: Luya, I-J: Pedro Ruiz 24
- Figura 31.** Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Porcino: K-L: Rodríguez de Mendoza 24
- Figura 32.** Bandas generadas por el primer específico 12S Ovino: A-B: Chachapoyas, C-I: Bagua 24
- Figura 33.** Bandas generadas por el primer específico 12S Ovino J-K: Bagua Grande, L-M: Luya, N-Ñ: Rodríguez de Mendoza 25
- Figura 34.** Bandas generadas por el primer específico 12S Caprino: A-B: Chachapoyas, C-I: Bagua 25
- Figura 35.** Bandas generadas por el primer específico 12S Caprino: J-K: Bagua Grande, L-M: Luya, N-Ñ: Rodríguez de Mendoza 25

Resumen

Las carnes expandidas en los mercados no proveen suficiente garantía sobre el contenido real de un producto, favoreciendo un ambiente donde las especies de menor valor comercial puedan reemplazar a las especies más valoradas, afectando no sólo a los consumidores, sino también a productores y comerciantes, al verse comprometida la seguridad alimenticia y sanitaria de los productos, además de tener implicancias religiosas y culturales. El presente estudio utilizó la técnica molecular PCR-RFLP para identificar las principales especies cárnicas de valor comercial (bovino, porcino, ovino y caprino) en las principales ciudades de la región Amazonas. Para tal fin, se amplificó el gen mitocondrial 12S rRNA mediante la técnica del PCR y luego este amplicón fue digerido con el uso de enzimas de restricción (*AluI* y *ApoI*) con la finalidad de identificar a las especies cárnicas mediante la formación de distintos patrones de bandas electroforéticas. De las muestras etiquetadas como carne bovina solo una muestra proveniente de Bagua presentó patrones de carne porcina; mientras que las muestras etiquetadas como carne porcina y ovina siempre coincidieron como tales basados en sus respectivas bandas electroforéticas. Sin embargo, las muestras etiquetadas como carne caprina siempre resultaron ser carnes ovinas y en las muestras de embutidos no pudieron ser determinados los tipos de carne que se usaron en su elaboración. Este es el primer estudio de identificación precisa de carnes comerciales bajo un enfoque molecular, que es rápido y de relativo bajo costo para la región. Los resultados del presente estudio muestran la utilidad de esta técnica para la determinación correcta de carnes el cual puede ser usado en programas de inspección sanitaria.

Palabras claves: ADN mitocondrial, carnes comerciales, determinación cárnica, digestión enzimática, etiquetado, PCR-RFLP.

Abstract

The meats sold in the markets do not provide enough guarantee on the actual content of a product, favoring an environment where species of lower commercial value can replace the most valued species, affecting not only consumers, but also producers and traders, when the food and health security of the products is compromised, as well as having religious and cultural implications. The present study used the molecular technique PCR-RFLP to identify the main meat species of commercial value (bovine, porcine, ovine and caprine) in the main cities of the Amazon region. For this purpose, the mitochondrial 12S rRNA gene was amplified by the PCR technique and then this amplicon was digested with the use of restriction enzymes (*AluI* and *ApoI*) in order to identify the meat species by forming different band patterns. Of the samples labeled as bovine meat only one sample from Bagua presented patterns of pork; while the samples labeled as porcine and ovine meat always coincided as such based on their respective electrophoretic bands. However, the samples labeled as goat meat always turned out to be sheep meat and in the sausage samples the types of meat used in their elaboration could not be determined. This is the first study of precise identification of commercial meat under a molecular approach, which is fast and relatively inexpensive for the region. The results of this study show the usefulness of this technique for the correct determination of meat which can be used in sanitary inspection programs.

Key words: mitochondrial DNA, commercial meats, restriction enzymes, identification, PCR-RFLP

I. INTRODUCCIÓN

El incremento del consumo y comercio de carne hace necesaria la identificación de la especie del cual procede, especialmente en productos picados, deshuesados, escabechados, etc, donde desaparecen las características morfológicas que hacen posible su identificación (Rojas y García, 2007). El desconocimiento de la especie del cual proviene la carne y la falta de transparencia en la cadena alimentaria puede ser considerado fraude alimenticio, este tema causa preocupación debido a los reportes de venta de carnes adulteradas (Spink y Moyer, 2015).

La demanda de transparencia en la cadena alimentaria es cada vez mayor, como consecuencia del creciente interés de los consumidores en la bioseguridad y del deseo de productos con atributos específicos; así la adulteración y prácticas fraudulentas puede verse fomentada por el aumento de la demanda (Sumathi, G., Jeyasekaran, G., Jeya Shakila, R., Sivaraman, B., Arunkumar, G., Manimaran, U., y Sukumar, D, 2015). En consecuencia, las especies de menor valor comercial reemplazan a las especies más valoradas haciéndose necesaria la identificación de los productos cárnicos (Rojas y García, 2007; Rojas, González y Martin de Santos, 2008).

El fraude alimentario se define como la sustitución, adición, manipulación o representación deliberada e intencional de alimentos, así como ingredientes alimenticios o envases de alimentos; o declaraciones falsas o engañosas sobre un producto, con fines de beneficio económico (Spink *et al.*, 2015; Espinoza *et al.*, 2015; Ortiz, 2017). Los fraudes alimentarios no sólo perjudican a los consumidores, sino también a productores y comerciantes (Espinoza, et al. 2015). Ortiz (2017) hace mención que en la cocina tradicional y en una gran variedad de productos industriales la mezcla de carnes de diferentes especies animales como consecuencia de fraude alimentario resulta habitual. En tal sentido, se requiere de métodos rápidos y confiables de identificación de especies animales para la obtención de alimentos seguros y de calidad cuando sean demandados por los consumidores (Murugaiah, C., Noor, Z., Mastakim, M., Bilung, L. M., Selamat, J., y Radu, S, 2009).

El uso de las técnicas moleculares se han generalizado en los procesos que pretenden garantizar la calidad y seguridad de un alimento, estas técnicas permiten identificar alimentos de origen animal y sus productos derivados mediante la caracterización del ADN presente en los alimentos y no a una etiqueta asociados a ellos (Aguilar, A., Alonso, G., y

Barrero, M. (2012). En la actualidad una de las técnicas de uso extendido es la Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), el cual complementa la amplificación del ADN mitocondrial obtenido por la técnica de PCR con una digestión enzimática posterior del amplicón. El análisis de los productos amplificados y digeridos brindan gran confiabilidad a los resultados obtenidos (Eaqub, Ahamad, Asing, Hossain y Sultana, 2017) convirtiéndolo en una prueba precisa para la identificación de alimentos que han perdido sus características morfológicas y organolépticas iniciales (Galal, A., Mohammed, K., Osman, A., Abouel, K., Borrell, Y., y Garcia, E, 2016)

1.1. Formulación del problema:

Sustitución de las especies cárnicas de alto costo comercial por otras de menor costo en los principales mercados de las ciudades de Amazonas.

1.2. Justificación:

Debido a que las carnes vendidas en los mercados no proveen suficiente información sobre el contenido real u origen de un producto, es necesario la identificación objetiva de estos productos como un modo de protección a los consumidores y productores de las sustituciones ilegales o de una identificación equivocada (Peral, P., Giovambattista, G., y Verónica, M, 2015). La adulteración, falsificación y engaño de productos destinados al consumo humano es en sí una violencia que puede y debe ser tratada como un problema de salud pública (Sobrado, 2017). La sustitución de especies animales por otros similares pueden causar problemas de salud (Espinoza *et al.*, 2015), impactos económicos o tener implicaciones éticas y religiosas en los consumidores (Ortiz, 2017).

La FAO y OMS (2016), señalan en el Codex Alimentarius que el objetivo es garantizar prácticas leales en el comercio de alimentos y proteger la salud de los consumidores, principalmente a la población más vulnerable (niños, mujeres embarazadas y ancianos). Reduciendo la probabilidad de que se presente un efecto negativo en la salud, como consecuencia de uno o más peligros presentes en productos destinados al consumo humano y de ser necesario; basadas en la identificación del peligro, caracterizar y evaluar las situaciones que se puedan presentar, generando medidas de prevención y control lo cual nos llevaría a la trazabilidad de productos de origen animal en la región Amazonas.

En este sentido, la identificación de alimentos de origen animal con el uso de técnicas moleculares de uso extendido, relativamente de bajo costo, rápidas y de alta precisión serán de gran importancia para la sociedad amazonense, ya que permite conocer

correctamente a las especies cárnicas comerciales expendidas en los principales mercados de la región; además de identificar la presencia de fraude alimentario bajo la modalidad de sustitución de aquellas especies cárnicas por otras de menor costo comercial. De esta manera, la data y metodología generada en el presente estudio podrá ser utilizado y aplicado en programas de inspección sanitaria para prevenir el fraude alimentario en la región.

Bases teóricas:

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) es una reacción enzimática *in vitro* que replica o amplifica miles de copias de una secuencia específica de ADN durante varios ciclos, aprovechando la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay de Dios, Ibarra, y Velasquillo, 2013; Sánchez, 2016). La reacción que tiene lugar es cíclica, de modo que las copias obtenidas aumentan de manera exponencial, obteniendo millones de ellas a partir de una cantidad inicial muy pequeña de ADN (Jimenez y Collada, 2008).

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), es una técnica donde el ADN obtenido en la extracción es amplificado y luego digerido mediante enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se separan mediante la técnica de electroforesis (López, Mallorquín, y Vega, 2003).

Electroforesis: Es un procedimiento que separa ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas en base a su carga eléctrica luego de ser sometidas a un fuente de poder voltaica, las moléculas migran del cátodo (negativo) al ánodo (positivo) (García, 2000).

Enzimas de restricción: Son enzimas que reconocen y cortan las moléculas de ADN en sitios específicas, especialmente en las regiones GAATTC, para generar fragmentos de diferente peso molecular y obtener los patrones de restricción mediante electroforesis en gel (Gana y Abalaka, 2011).

Especie: Es el conjunto de individuos con características similares, capaces de reproducirse y dejar descendencia viable (Jimenez, 2009).

Definición de términos básicos:

ADN: Polinucleótido constituido por cadenas antiparalelas de unidades de desoxirribonucleótidos, dispuestos de forma complementaria, adoptando una estructura enrollada de doble hélice dextrógira (Lorente, 1997).

Gen: Secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN, que contiene la información correspondiente a la producción de los aminoácidos de una proteína. Está formado por ácido desoxirribonucleico cuyo papel fundamental es transmitir la información hereditaria de los seres vivos (Delgado de la Torre, 2006).

Marcador Molecular: Fragmento de ADN genómico que revela variaciones y/o mutaciones en la secuencia de esta, asociado con locus dentro del genoma, permitiendo detectar el polimorfismo entre diferentes alelos o genotipos del gen para una secuencia particular de DNA (Jiang 2017).

Primers: Llamados también como partidores, cebadores o iniciadores (Piedra, Alba, Tapia, Estrella, Engelmann y Morillo, 2002). Los primers son fragmentos de ADN de una única hebra cuya secuencia es complementaria a la región que se va a amplificar (Jimenez y Collada, 2008). Son dos secuencias diferentes denominadas forward (directo) y otra reverse (reverso) las cuales son extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (Sánchez, 2016).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Objetivos:

Objetivo general:

- Identificar las especies cárnicas comerciales con el uso de PCR-RFLP en las principales ciudades de Amazonas.

Objetivos específicos:

- Identificar las especies cárnicas de menor costo comercial y las ciudades donde se realizan prácticas de sustitución de especies.
- Analizar las causas y consecuencias de sustitución de especies cárnicas por otras de menor costo comercial.

2.2. Variables de estudio:

Variable independiente:

Patrón electroforético del PCR-RFLP

Variables dependientes:

Especie cárnica

2.3. Materiales

Los materiales, equipos y reactivos usados para cada protocolo se muestran a continuación.

- Termociclador (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler)
- Balanza analítica (Nimbus® Analytical Balances - Adam Equipment USA)
- Cámara de electroforesis (CompactM biometra)
- Set de pipetas (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)
- Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit catálogo D4068 & D4069 – Zymo Research®
- Tips 10 µL, 1000 unidades
- Tips 200 µL, 1000 unidades
- Tips 1000 µL, 1000 unidades
- Microtubo con tapa de 1.5 mL, 500 unidades
- Tubos PCR 0.2ml (banda de 8 tubos), 1000 unidades
- Papel toalla blanco, caja 18 pack x 200 unid

- Racks para tubos PCR
- Racks para microtubos 1.5 mL (autoclavables)
- Papel aluminio
- Agarosa 500 g
- TAE buffer 10X, 1 L
- SYBR Safe DNA Gel Stain, 400 UI
- DNA ladder, 50 UI
- Dye DNA, 3 MI
- Dye PCR Green Master Mix, tubo 200 reacciones
- Enzimas de restricción
- Mascarilla
- Guantes quirúrgicos (50 unidades /caja)
- Estuche de disección
- Cooler para transporte de muestras

2.4. Metodología

2.6.1. Diseño de investigación:

Tipo de investigación: Diseño descriptivo

M ----- PCR-RFLP ----- A

Dónde:

M: Muestra de distintos tipos de carnes comerciales

PCR-RFLP: Reacción de la Cadena Polimerasa - Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción; es la técnica molecular mediante la observación del patrón del fragmento de restricción.

A: Análisis de datos

2.6.2. Población, muestra y muestreo:

Población

Carnes expandidas en los principales mercados de Amazonas.

Muestra

Muestras de carne colectados en los principales mercados de las ciudades de Bagua (Provincia de Bagua), Bagua Grande (Provincia de Utcubamba), Chachapoyas (Provincia de Chachapoyas), Luya (Luya), Pedro Ruiz (Bongará) y Rodríguez de Mendoza (Provincia de Rodríguez de Mendoza). El número de muestras que se colecto se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Número de muestras colectadas en los principales mercados de Amazonas

Ciudad de Colecta de la muestra	Bovino	Porcino	Ovino	Caprino	Carne molida	TOTAL
Bagua	5	2	3	4	1	15
Bagua Grande	5	2	2	0	1	10
Chachapoyas	5	2	2	0	1	10
Luya	5	2	2	0	1	10
Mendoza	5	2	2	0	1	10
Pedro Ruiz	5	2	2	4	1	14
TOTAL	30	12	13	8	6	69

Adicionalmente, se colectaron ocho muestras de embutidos de la marca Razzeto (Jamonada de pollo (dos muestras), Mortadela (dos muestras), Hot Dog de carne (dos muestras), Hot Dog de pollo (dos muestras)); los cuales solo fueron colectados en la ciudad de Chachapoyas.

Muestreo:

No probabilístico.

2.6.3. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos y procedimiento.

A. Área de estudio

El área de estudio fueron los principales mercados de las ciudades de seis de las siete provincias de la región Amazonas. Ubicada al norte del país, Amazonas limita por el norte con Ecuador, al este con Loreto y San Martín, al sur con La Libertad y al oeste con Cajamarca. Posee un total de 375,993 habitantes, y un área de 39.249,13 km² de superficie. La capital de Amazonas es Chachapoyas y su ciudad más poblada, Bagua Grande.

Las provincias donde se colectaron las muestras se describen en la Tabla 1 y Figura 1.

Tabla 2. Descriptores poblacionales de las provincias de la región Amazonas

Provincia	Ciudad	Superficie (km ²)	Población	Densidad poblacional (hab/km ²)
Bagua	Bagua	5745.7	76 993	13.62
Bongará	Pedro Ruiz	2870	34 147	11.89
Chachapoyas	Chachapoyas	3312	55 352	16.71
Luya	Luya	3237	51 899	16.03
Rodríguez de Mendoza	Mendoza	2359	31 354	13.29
Utcubamba	Bagua Grande	3860	118 792	30.91

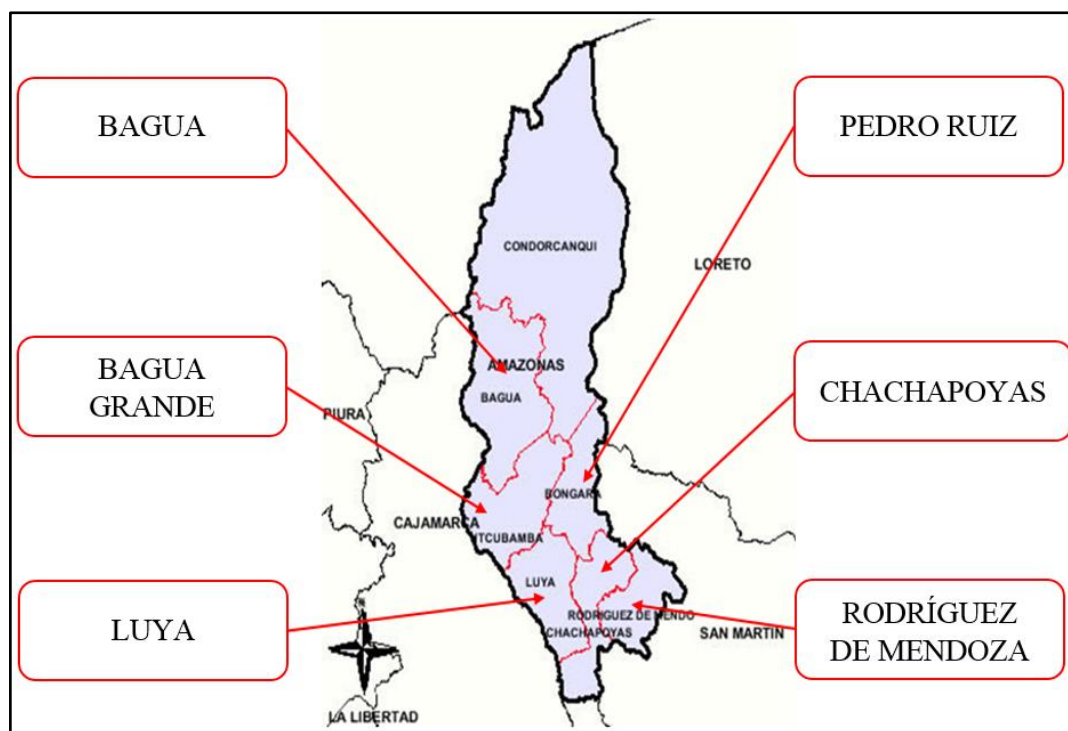


Figura 1. Mapa de ubicación geográfica que muestra las seis ciudades donde se llevó a cabo el estudio en la Región Amazonas.

B. Identificación de especies

Los pasos seguidos para la identificación de especies cárnicas se muestran en la figura 2.

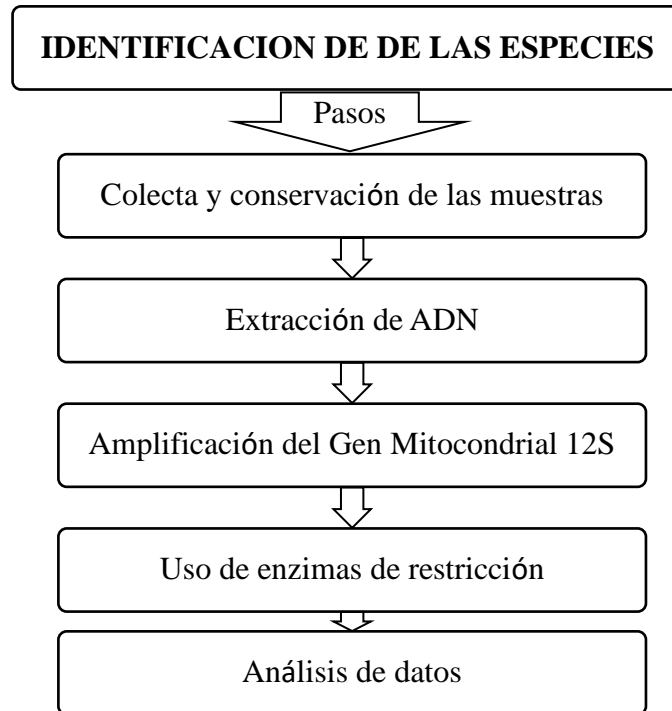


Figura 2. Esquema del proceso para la identificación de especies cárnicas

a. Colecta y conservación de muestras

Las muestras se colectaron de los principales mercados de las ciudades de Bagua (Provincia de Bagua), Bagua Grande (Provincia de Utcubamba), Chachapoyas (Provincia de Chachapoyas), Luya (Provincia de Luya), Pedro Ruiz (Provincia de Bongará) y Mendoza (Provincia de Rodríguez de Mendoza). Se utilizó muestras de tejido muscular para identificar las siguientes especies: bovino (*Bos taurus*), porcino (*Sus Scrofa*), ovino (*Bovis aries*) y caprino (*Capra aegagrus-hircus*). Se usó un cooler con hielo para la conservación y transporte de muestras biológicas. Adicionalmente, se analizaron ocho muestras de embutidos de la marca Razzeto (Jamonada de pollo (dos muestras), Mortadela (dos muestras), Hot Dog de carne (dos muestras), Hot Dog de pollo (dos muestras)); los cuales solo fueron colectados en la ciudad de Chachapoyas.

b. Extracción de ADN

El ADN se extrajo siguiendo la metodología descrita en Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit Catalogo D4068 & D4069 – Zymo Research® (Romero, 2017) para extracción de ADN de tejidos sólidos el cual se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Metodología para extracción de ADN de tejidos sólidos.

	A una muestra de tejido (≤ 25 mg) en un tubo de microcentrífuga, añadir una solución de:
1	a) 95 μ l de agua
	b) 95 μ l de tampón de tejido sólido (azul)
	c) 10 μ l de proteinasa K
	Mezclar bien o agitar en vórtex 10-15 segundos y luego incubar el tubo a 55°C durante 1 a 3 horas o hasta Solubiliza el tejido. Mezclar bien antes de continuar.
2	Nota: Para eliminar los residuos insolubles, centrifugar a $\geq 12,000$ x g por 1 minuto. Transferencia acuosa sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga.
	Nota: Para eliminar los residuos insolubles, centrifugar a $\geq 12,000$ x g por 1 minuto. Transferencia acuosa sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga.
3	Añadir 2 volúmenes de unión genómica Buffer al sobrenadante. Mezcla a fondo o vórtex 10-15 segundos. Ejemplo: Añadir 400 μ l de unión genómica Buffer al sobrenadante de 200 μ l.
4	Transfiera la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IIC-XL en un tubo de recolección. Centrifugar a $\geq 12,000$ x g durante 1 minuto. Deseche el tubo de recogida con el flujo a través.
5	Agregue 400 μ l de tampón de prelavado de ADN a la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recolección. Centrifugar a $\geq 12,000$ x g durante 1 minuto. Vaciar el tubo de recogida.
6	Agregue 700 μ l de tampón de lavado g-ADN a la columna de centrifugación. Centrifugar a $\geq 12,000$ x g durante 1 minuto. Vaciar el tubo de recogida.
7	Agregue 200 μ l de g-DNA Wash Buffer a la columna de centrifugado. Centrifugar a $\geq 12,000$ x g durante 1 minuto. Deseche el tubo de recogida con el flujo a través.
8	Transfiera la columna de centrifugado a un tubo limpio de microcentrífuga. Agregue ≥ 50 μ l de tampón de elución de ADN o agua directamente en la matriz. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego centrifugar a la velocidad máxima durante 1 minuto para eluir el ADN. El ADN eluido se puede usar

inmediatamente para aplicaciones de base molecular o se puede almacenar a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ para uso futuro.



Figura 3. Muestras de carne compradas como bovino y porcino



Figura 4. Muestras de carne compradas como ovino y caprino



Figura 5. Colecta de muestra de carne en un tubo de 1.5 ml., Incubación y centrifugado

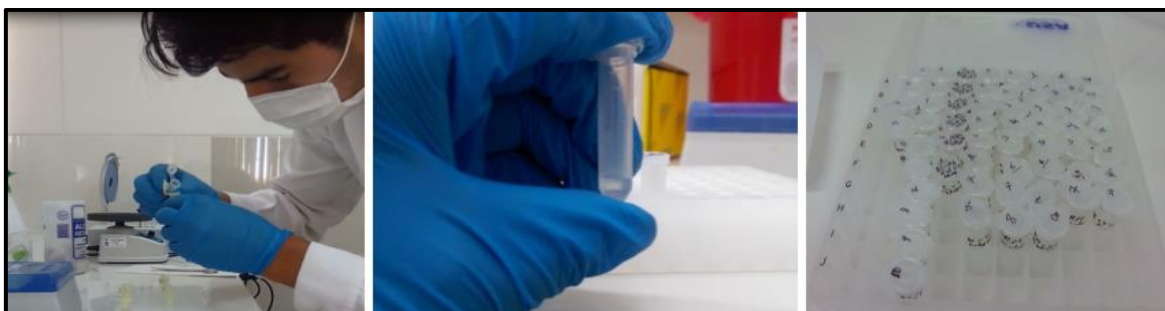


Figura 6. Filtrado de muestras y ADN extraído en micro tubos para su conservación a -20 °C

c. Amplificación del gen mitocondrial 12S por PCR

Para la amplificación del gen mitocondrial 12rRNA, se utilizaron dos tipos de primers: a) los primers universales F: 5'-CAAAGTGGGATTAGATACCCCACTAT-3' y R: 5'-50-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'), que amplifican regiones de 456 pb (Girish, P., Anjaneyulu, A., Viswas, K., Shivakumar, B., Anand, M., Patel, M., y Sharma, B, 2005), fueron utilizados para todos los tipos de carnes colectadas, y b) primers específicos utilizados como vía de confirmación según la especie cárnica colectada (Aranguren, J., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil, Y., Yáñez, L., Borjas, L., y Zabala, W, 2009), cuya secuencia y tamaño de amplificado se muestra en la Tabla 5.

Para la amplificación por PCR se usó el reactivo Master Mix que contiene todos los componentes para el PCR excepto los primers y el ADN de la muestra. El volumen total fue 10 μ L y consistió de 5 μ L de GoTaq® G2 Green Master Mix M782A (Promega, USA), 0.2 μ L de cada primer, 1 μ L de ADN de la muestra y 3.6 μ L de agua destilada. La reacción se realizó en un Termociclador de punto final (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler) usando los siguientes parámetros cuando se trabajó con el primer universal: pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 45 s (desnaturalización), 60 °C durante 45 s (alineamiento) y 72 °C durante 2 min (extensión). Los parámetros de PCR cuando se trabajaron con los primers específicos se muestran en los Anexos 1 - 5.

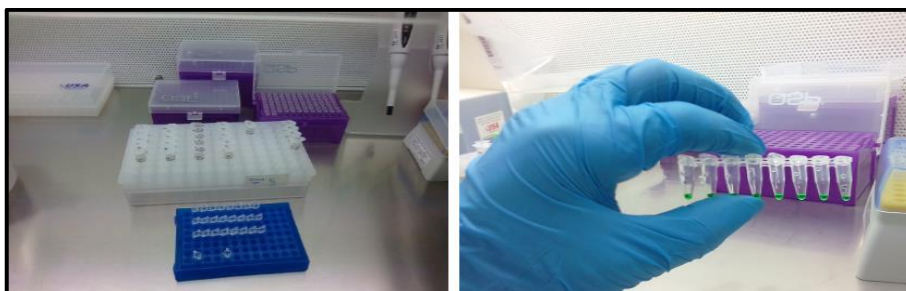


Figura 7. Preparación del mix para PCR



Figura 8. Vortex (para mezcla de componentes de PCR) y centrifugado (spin)



Figura 9. Configuración del Protocolo de PCR en el termociclador de punto final

Tabla 4. Primers específicos utilizados para el gen mitocondrial 12S rRNA (Aranguren *et al.*, 2009)

Especie	Tamaño (pb)	Primers
Bovino	221	F: 5'-AGCCTGTTCTATAATCGATA-3' R: 5'-GTTATTGGTTTCATAATAACG-3'
Porcino	160	F: 5'-AGCCTGTTCTATAATCGATA-3' R: 5'TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC-3'
Ovino	364	F: 5'-AGCCTGTTCTATAATCGATA-3' R: 5'-GTCTCCTCTCGTGTGGTTGA-3'
Caprino	150	F: 5'-AGCCTGTTCTATAATCGATA-3' R: 5'-CCATGGGTTACACCTTGACC-3'

d. PCR-RFLP (Reacción de la Cadena Polimerasa - Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción)

Para la diferenciación de las distintas especies cárnicas colectadas, los productos de PCR obtenidos con los primers universales fueron sometidos a la acción de dos enzimas de restricción o (también llamadas endonucleasas) *AluI* (ThermoFisher, USA) y *ApoI* (Promega, USA) (Girish *et al.*, 2005) (Figura 10). La preparación de la mezcla de reacción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la enzima *AluI*, el volumen total fue 20.0 μL y consistió de 16.3 μL de agua destilada, 2.0 μL de buffer B, 0.2 μL de BSA, 1.0 μL de producto de PCR y 0.5 μL de la enzima. La reacción se incubó a 37°C por 100 minutos y fue seguida de una inactivación a 65°C por 15 minutos. Para la enzima *ApoI* el volumen total fue 50 μL y consistió de 43 μL de agua destilada, 5.0 μL de 10X NE Buffer 1.0 μL de producto de PCR y 1.0 μL de la enzima. La reacción se incubó a 50 °C por 10 minutos y fue seguida de una inactivación a 85°C por 20 minutos. El Lugar de corte de las enzimas de restricción usadas en la diferenciación de especies cárnicas se muestran en la Figura 10.

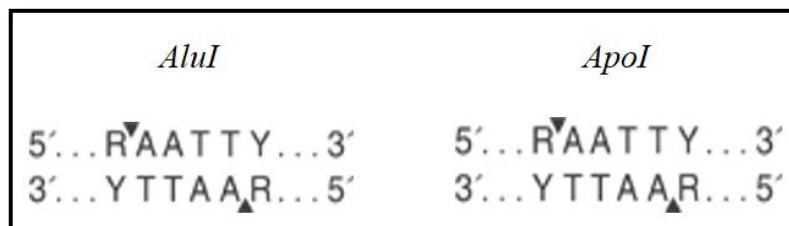


Figura 10. Lugar de corte de las enzimas de restricción usadas en la diferenciación de especies cárnicas

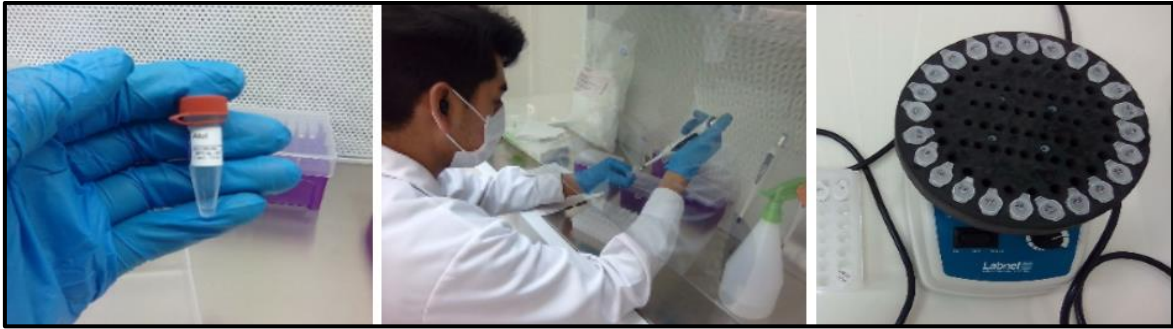


Figura 11. Enzima de restricción AluI, preparación del buffer enzimático y mezcla de componentes por vortex



Figura 12. Centrifugado de la mezcla de reacción con la enzima AluI, incubación a 37°C por 100 minutos e inactivación a 65°C por 15 minutos



Figura 13. Mezcla del producto de la reacción con el tinte (Loading 6X) y su posterior puesta en el gel de agarosa



Figura 14. Mezcla de reacción más escalera (Ladder), electroforesis en gel por 45 minutos a 120 voltios y transiluminador genómico donde se verán las bandas generadas por la acción de las enzimas de restricción.

e. Análisis de datos:

Posterior a la digestión, los preparados enzimáticos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% por 45 minutos. Se usó una escalera (marcador de peso molecular) de 100 pb como referencia de los pares de bases. El patrón de bandas obtenidas en cada gel se observó en un trans-iluminador (omniDOC – Cleaver Scientific Ltd), donde se contabilizó el número de pares de bases (pb) de cada banda para luego ser comparado con el patrón de restricción de cada enzima (Ali *et al.*, 2015; Eqaub *et al.*, 2017; Romero, 2017; Sumathi *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014).

El patrón de restricción para *AluI* en bovino es de 359 y 97 pb, para ovino de 246 y 210 pb, mientras que para caprino es de 246 y 210 pb. La enzima *ApoI* sólo corta los fragmentos de ovino en dos fragmentos de 329 y 127 pb mostrados por Girish *et al.*, (2005), (**Tabla 5**).

Tabla 5. Patrones de bandas de restricción de las enzimas mostrados por Girish *et al.*, (2005)

Enzima de Restricción	Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Ovino (<i>Bovis aries</i>)	Porcino (<i>Sus scrofa</i>)	Caprino (<i>Capra aegagrus-hircus</i>)
<i>AluI</i>	359 + 97	246 + 210	-	246 + 210
<i>ApoI</i>	-	329 + 127	-	-

III. RESULTADOS

El análisis de los fragmentos de restricción de diferentes especies cárnicas colectadas en seis ciudades de la región Amazonas, dio como resultado diferentes patrones de bandas. Adicional a esto se sometió a las muestras a análisis con primers específicos. A continuación, se mostrarán los patrones de bandas formados en cada ciudad cuando se utilizan las enzimas *AluI* y *ApoI*.

3.1. Enzima de restricción *AluI*

3.1.1. Chachapoyas

Los patrones de bandas formadas cuando se utilizó la enzima *AluI* en las carnes colectadas en la ciudad de Chachapoyas, pueden apreciarse en la Figura 15. Las letras A-E corresponden a cinco muestras de compradas como carne de bovino, las cuales generaron fragmentos de 359 pb y 97 pb. Las letras F y G corresponden a dos muestras compradas como carne de porcino cuyos fragmentos de restricción fueron entre 160 pb y 280 pb aproximadamente (estos resultados se obtuvieron al usar el software: “gelanalyzer2010” pero al realizar distintas repeticiones los resultados mostrados, siempre variaron entre dos y cinco pares de bases). Las letras H e I corresponden a muestras compradas como carne de Ovino los cuales dieron fragmentos de 246 pb y 210pb.

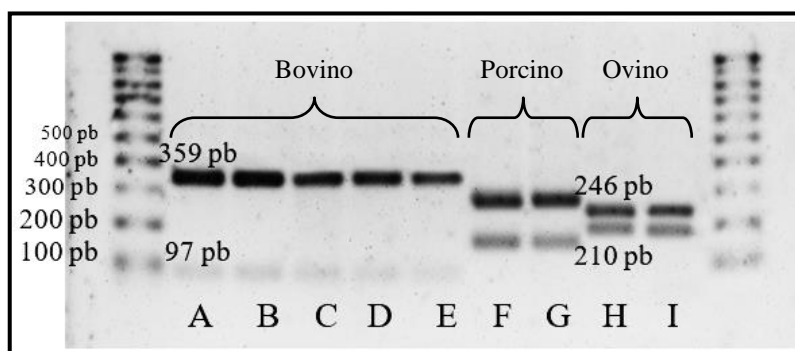


Figura 15. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Chachapoyas: A-E: carne bovina, F-G: carne porcina, H-I: carne ovina.

3.1.2. Bagua

Los patrones de bandas formadas por la enzima *AluI* en las carnes colectadas en la ciudad de Bagua, pueden observarse en la Figura 16 y Figura 17. Las letras A- E corresponden a cinco muestras de compradas como carne de bovino, las cuales generaron fragmentos de 359 pb y 97pb. Las letras F y G corresponden a dos muestras compradas como carne de

porcino cuyos fragmentos de restricción fueron entre 160 pb y 280 pb aproximadamente (estos resultados se obtuvieron al usar el software: gelanalyzer2010). Las letras H-K corresponden a muestras compradas como carne de Ovino los cuales dieron fragmentos de 246 pb y 210 pb y las letras L-N a muestras compradas como carne de caprino los cuales también mostraron fragmentos de 246 pb y 210pb.

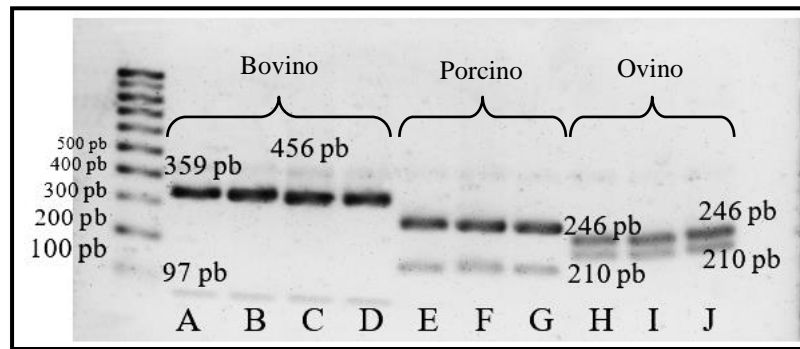


Figura 16. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Bagua: A-E: carne bovina, F-G: carne porcina, H-J: carne ovina

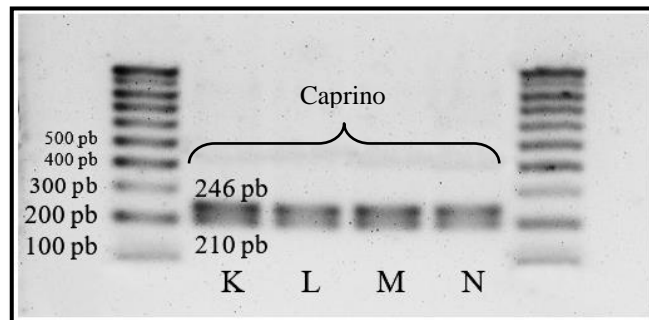


Figura 17. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Bagua: K: carne ovina, L-N: carne caprina

3.1.3. Bagua Grande

La enzima *AluI* generó patrones de bandas en las carnes colectadas en la ciudad de Bagua Grande, los cuales pueden observarse en la Figura 18. Las letras A-B corresponden a dos muestras compradas como carne de porcino cuyos fragmentos de restricción fueron entre 160 pb y 280 pb aproximadamente (estos resultados se obtuvieron al usar el software: gelanalyzer2010). Las letras C-G representan a cinco muestras compradas como carne de bovino, quienes generaron fragmentos de 359 pb y 97pb y las letras H-I corresponden a muestras compradas como carne de ovino los cuales dieron fragmentos de 246 pb y 210 pb.

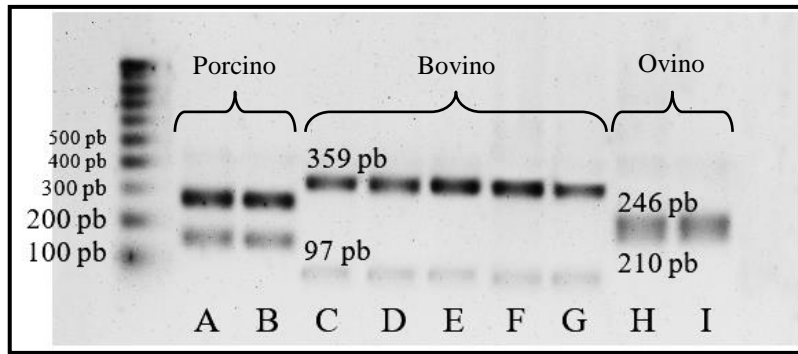


Figura 18. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Bagua Grande: A-B: carne porcina, C-G: carne bovina, H-I: carne ovina

3.1.4. Luya

La enzima *AluI* mostró patrones de bandas en todas las carnes colectadas en la ciudad de Luya, (Figura 19). Las letras A- E corresponden a cinco muestras compradas como carne de bovino cuyo patrón de restricción dio fragmentos de 359 y 97pb. Las bandas F-G corresponde a porcino quienes mostraron bandas entre 160 pb y 280 pb aproximadamente (estos resultados se obtuvieron al usar el software: gelanalyzer2010). H-I corresponden a muestras compradas como carne de Ovino los cuales dieron fragmentos de 246 pb y 210 pb.

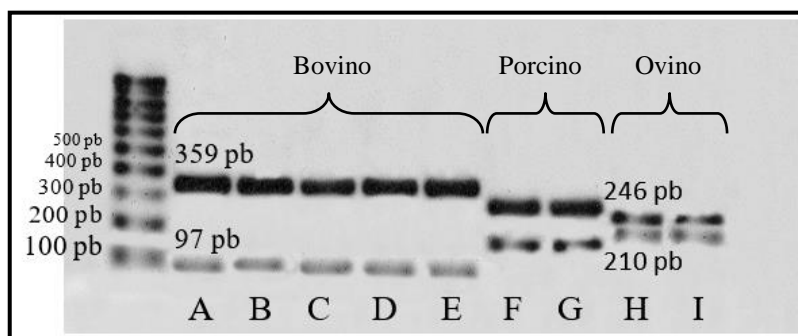


Figura 19. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Luya: A-E: carne bovina, F-G: carne porcina, H-I: carne ovina

3.1.5. Pedro Ruiz

La enzima *AluI* mostró patrones de bandas en todas las carnes colectadas en la ciudad de Pedro Ruiz, (Figura 20). Las letras A-E corresponden a cinco muestras compradas como carne de bovino cuyo patrón de restricción dio fragmentos de 359 y 97pb. F-G corresponde

a porcino quienes mostraron bandas entre 160 pb y 280 pb aproximadamente (estos resultados se obtuvieron al usar el software: gelanalyzer2010). H-I corresponden a muestras compradas como carne de Ovino los cuales dieron fragmentos de 246 pb y 210 pb.

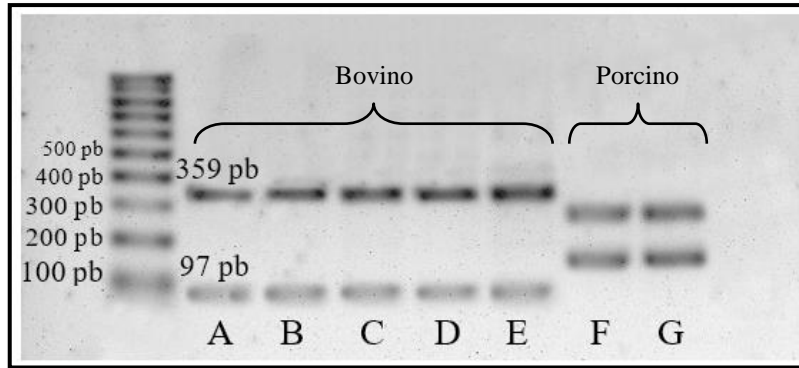


Figura 20. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Pedro Ruiz A-E: carne bovina, F-G: carne porcina

3.1.6. Rodríguez de Mendoza

La enzima *AluI* generó patrones de bandas en las carnes colectadas en la ciudad de Rodríguez de Mendoza (Figura 21). Las letras A-E corresponden a cinco muestras compradas como carne de bovino cuyo patrón de restricción se encuentra entre los 359 pb y 97 pb. Las letras F-G representan a dos muestras compradas como carne de porcino, quienes generaron fragmentos de entre 160 pb y 280 pb aproximadamente (estos resultados se obtuvieron al usar el software: gelanalyzer2010). Y las letras H-I corresponden a muestras compradas como carne de Ovino los cuales dieron fragmentos de 246 pb y 210 pb.

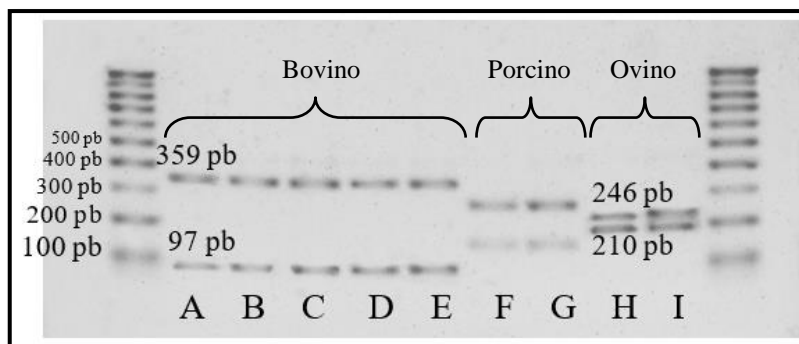


Figura 21. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carnes colectadas en la ciudad de Rodríguez de Mendoza: A-E: carne bovina, F-G: carne porcina, H-I: carne ovina

3.1.7. Muestras de carne molida

Los patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carne molida colectadas en las ciudades de Bagua: A, Bagua Grande: B, Chachapoyas: C, Luya: D, Pedro Ruiz: E y Rodríguez de Mendoza: F, generó bandas de 359 y 97 pb lo cual indica que todas son carne de bovino.

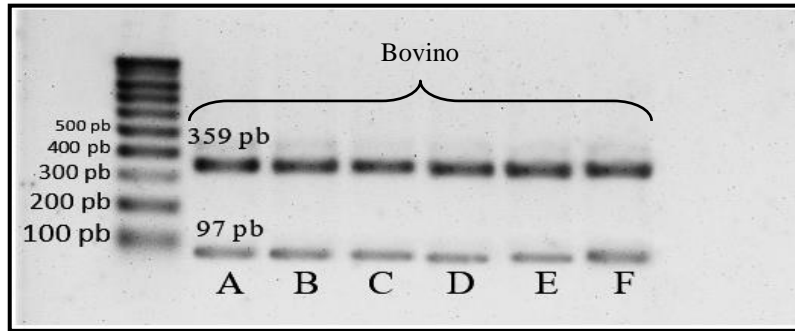


Figura 22. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de carne molida colectadas en las ciudades de Bagua: A, Bagua Grande: B, Chachapoyas: C, Luya: D, Pedro Ruiz: E y Rodríguez de Mendoza: F

3.1.8. Embutidos

Las ocho muestras de embutidos de la marca Razzeto (Jamonada de pollo (dos muestras), Mortadela (dos muestras), Hot Dog de carne (dos muestras), Hot Dog de pollo (dos muestras)). Mostraron patrones no conocidos para el gen 12S rRNA al ser sometido a la enzima *AluI*. Se realizó dos repeticiones, en la primera no se analizó Jamonada de Pollo (dos muestras). Las dos repeticiones mostraron patrones distintos, como se puede ver en las Figura 23 y Figura 24.

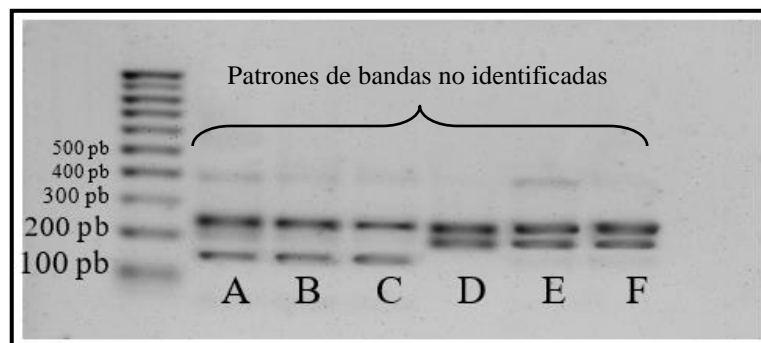


Figura 23. Primera repetición Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de embutidos en la ciudad de Chachapoyas: A-B: Mortadela, C-D: Hot Dog de carne, E-F: Hot Dog de pollo

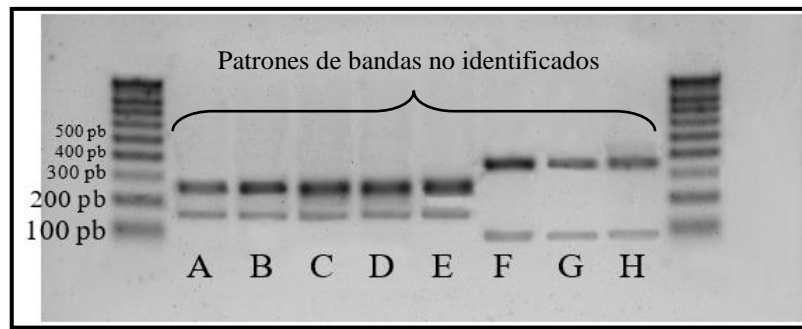


Figura 24. Segunda Repetición Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI* para muestras de embutidos en la ciudad de Chachapoyas: A-B: Jamonada de pollo, C-D: Mortadela, E-F: Hot Dog de carne, G-H: Hot Dog de pollo

3.2. Enzima de restricción *ApoI*

Se analizó con esta enzima todas las muestras correspondientes a todas las muestras que se compraron como carne de ovino e incluso a las muestras compradas como carne de caprino (G-I), los resultados mostraron patrones de bandas de 329 y 127 pb en todas las muestras. El orden de las muestras es como sigue: A-B: Chachapoyas, C-I: Bagua, J-K: Bagua Grande, L-M: Luya, N-Ñ: Rodríguez de Mendoza.

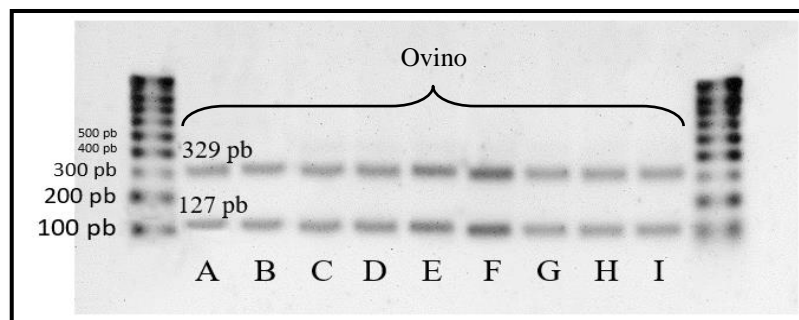


Figura 25. Patrones de bandas generadas por la enzima *AluI*: A-B: Chachapoyas, C-I: Bagua

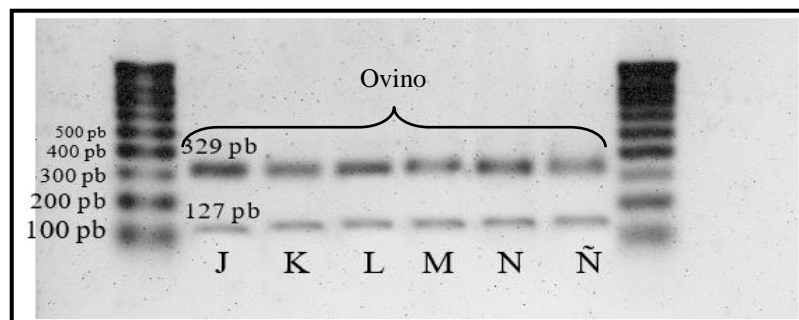


Figura 26. Patrones de bandas generadas por la enzima *ApoI*: J-K: Bagua Grande, L-M: Luya, N-Ñ: Rodríguez de Mendoza

3.3. Primers Específicos

Los primers específicos fueron usados para validar los resultados obtenidos con las enzimas de restricción. Se usaron primers específicos para carne de bovino, porcino, ovino y caprino. Los primers específicos validaron las carnes de 65 muestras, provenientes de las seis ciudades de Amazonas.

3.3.1. 12S Bovino

La PCR con el primer específico para Bovino dio como resultado bandas de 221 pb con lo que se confirma que las muestras compradas como carne de bovino si corresponden a esta especie.



Figura 27. Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Bovino: A-E: Chachapoyas, F-J: Bagua Grande

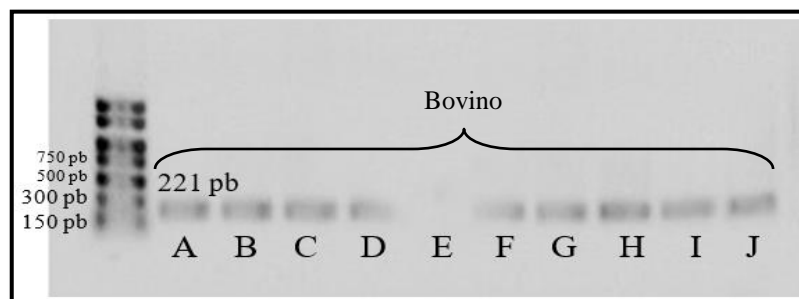


Figura 28. Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Bovino: A-E: Bagua, F-J: Pedro Ruiz

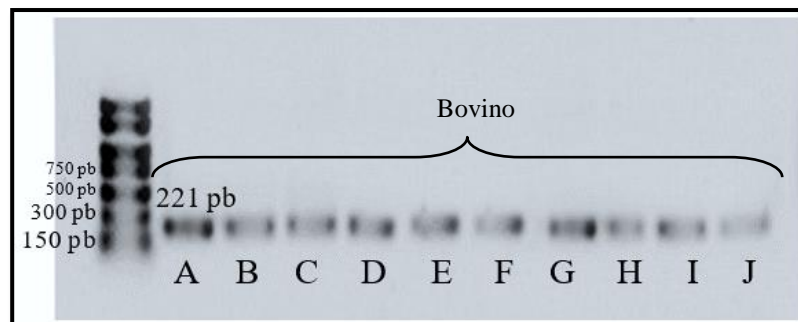
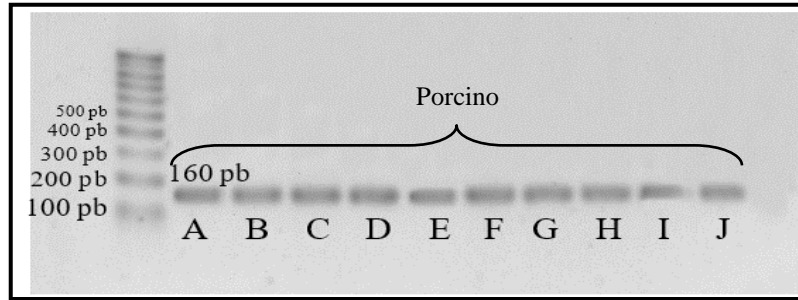


Figura 29. Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Bovino: A-E: Luya, F-J: Rodríguez de Mendoza

3.3.2. 12S Porcino

La PCR con el primer específico para Porcino dio como resultado bandas de 160 pb como demostró con lo que se confirma que las muestras compradas como carne de porcino si corresponden a esta especie.



Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Porcino: A-B: Chachapoyas, C-D: Bagua, E-F: Bagua Grande, G-H: Luya, I-J: Pedro Ruiz

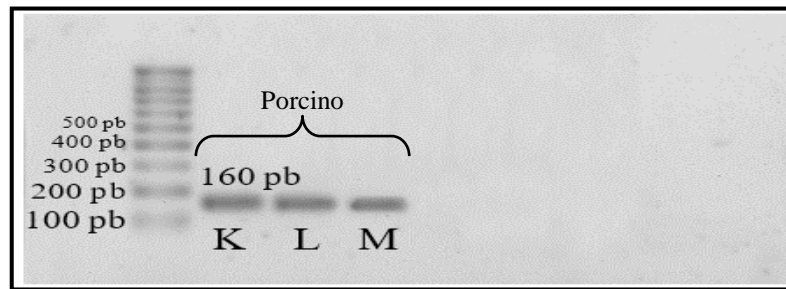


Figura 30. Patrones de bandas generadas por el primer específico 12S Porcino: K-L: Rodríguez de Mendoza

3.3.3. 12S Ovino

El primer específico para ovino mostró bandas de 364 pb en todas las muestras compradas como carne de ovino; incluso mostro bandas en muestras colectadas como carne de caprino (G-I) con lo que se confirma que las muestras compradas como carne de ovino si corresponden a esta especie.

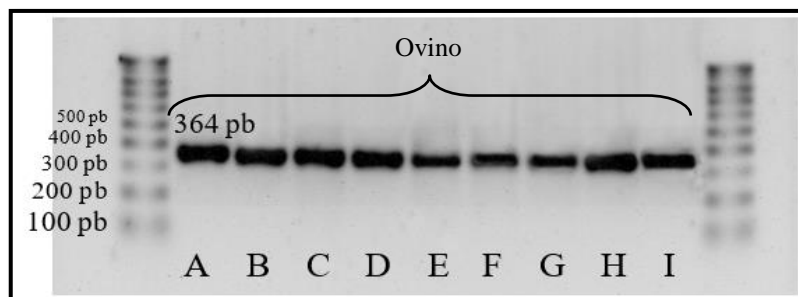


Figura 31. Bandas generadas por el primer específico 12S Ovino: A-B: Chachapoyas, C-I: Bagua

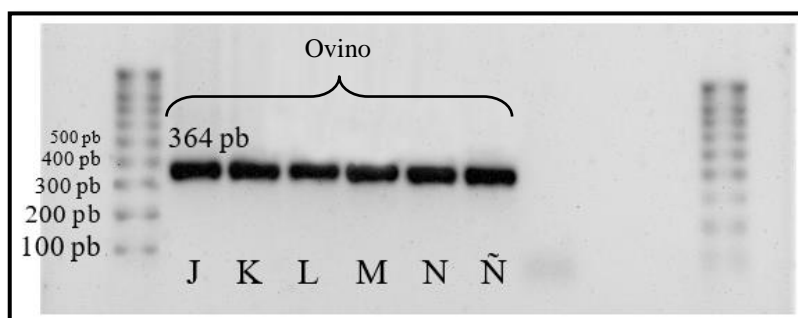


Figura 32. Bandas generadas por el primer específico 12S Ovino J-K: Bagua Grande, L-M: Luya, N-Ñ: Rodríguez de Mendoza

3.3.4. 12S Caprino

El primer específico para caprino mostró bandas de 150 pb en todas las muestras compradas como carne de ovino y como carne de caprino (G-I).

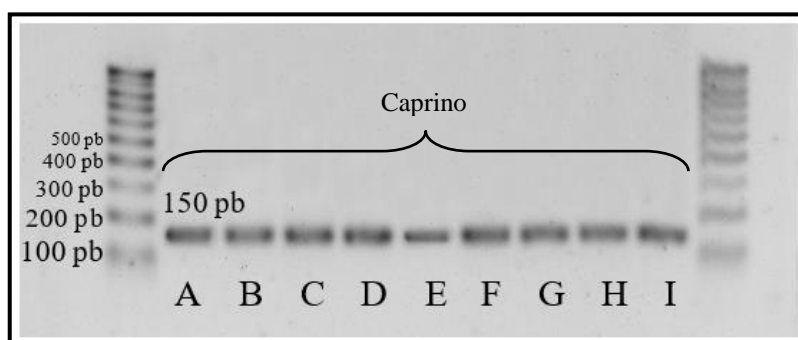


Figura 33. Bandas generadas por el primer específico 12S Caprino: A-B: Chachapoyas, C-I: Bagua

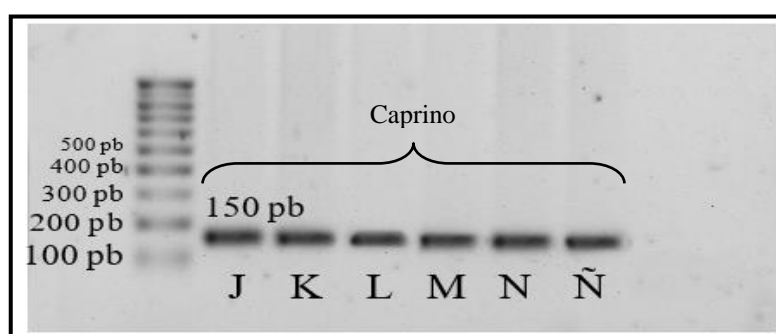


Figura 34. Bandas generadas por el primer específico 12S Caprino: J-K: Bagua Grande, L-M: Luya, N-Ñ: Rodríguez de Mendoza

IV. DISCUSIÓN

Es evidente la necesidad de actualizar y mejorar de forma constante las metodologías analíticas para determinar la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados (Hernández *et al.*, 2017). Así, Aranguren *et al.*, (2009), propone el uso de herramientas sensibles y exactas como la PCR con esta técnica, las especies estudiadas pueden ser confirmadas en el laboratorio para lo cual se hace uso del ADN mitocondrial (mtDNA). La ventaja de trabajar con mtDNA y especialmente con el gen 12S se debe a que es bastante estable y presenta mayor integridad que el ADN nuclear (Aranguren *et al.*, 2009).

Girish *et al.*, (2005) diseñó primers para el gen mitocondrial 12S rRNA y luego utilizó las enzimas *AluI*, *HhaI*, *ApoI* y *BspTI* para la identificación de carne de bovino, búfalo, ovino y caprino, respectivamente. Luego Doosti, Ghasemi y Rahimi (2011) utilizaron como marcadores segmentos de ADN mitocondrial (gen del citocromo-b) para poder distinguir a varias especies y cuando las muestras tenían el mismo tamaño de amplificado (por ejemplo, burro y caballo) digirieron los amplificados con la enzima *AluI* para distinguirlos según su patrón de restricción.

Para tal fin en la presente investigación se amplificó y digirió enzimáticamente amplificados del gen mitocondrial 12S rRNA con la técnica de PCR - RFLP para evaluar la sustitución de especies cárnicas de interés comercial en la región de Amazonas.

Los amplificados mediante el primer universal 12S rRNA generó bandas de 456 pb como fue descrito por Girish *et al.*, (2005), mientras que los primers específicos generaron bandas de 221 pb para bovino, 160 pb para porcino, 364 pb para ovino y 150 pb para caprino como fue descrito por Aranguren *et al.*, (2009). Por otro lado, la enzima *AluI* generó fragmentos de 359 y 97 pb para bovino, de 246 y 210 pb para ovino y caprino; mientras la enzima *ApoI* generó fragmentos de 329 y 127 pb para muestras procedentes de ovino, y ningún patrón para muestras procedentes de caprino como fue descrito por (Girish *et al.*, 2005).

Luego de los análisis mediante digestión enzimática y amplificación con primers específicos para bovino, de las 35 muestras de carne etiquetadas como bovino, 34 se confirmaron como tales; mientras que una muestra proveniente de la ciudad de Bagua fue identificada como carne de porcino; sin embargo, estos resultados podrían ser consecuencia de una errónea manipulación o etiquetado de las carnes, ya que la carne de

porcino y bovino se pueden diferenciar fácilmente por sus atributos morfológicos. En el presente estudio no se reportó ningún tipo de sustitución para carnes de tipo bovino en las 6 ciudades evaluadas. Sugiriendo que la comercialización de carne bovina en la región Amazonas no presente rastros de fraude alimentario.

Con respecto a 12 muestras etiquetadas como carne porcina luego de los análisis de digestión enzimática y amplificación mediante primers específicos para porcino dieron como resultado ausencia de fraude alimentario y sustitución de esta carne. Esto se justifica por la fácil identificación de la carne porcina en comparación con otro tipo de carnes.

En relación a las 12 muestras etiquetadas como carne de ovino luego de los análisis de digestión enzimática y amplificación mediante primer específicos también dieron como resultado ausencia de fraude y sustitución de este tipo de carne. Algo interesante de resaltar fue la ausencia de carne ovina en Pedro Ruiz. Esto se debe a que la población en este lugar consume muy poca carne ovina, lo cual hace que disminuya la producción del mismo con fines comerciales.

Con respecto a las muestras etiquetadas como carne de caprino, solo tres fueron colectadas para toda la región Amazonas, específicamente en la ciudad de Bagua. Sin embargo, al ser analizadas con la enzima de restricción *ApoI* (esta enzima solo forma patrones en carne de ovino y no en caprino (Girish *et al.*, (2005)) los patrones electroforéticos resultaron ser carne ovina. Estos resultados confirman la sustitución o fraude alimentario de productos caprinos para la región Amazonas. Esto se puede justificar por los precios elevados de carne caprina y la crianza limitada del mismo (Arroyo, 2007). Este panorama es común en el Perú, ya que la carne caprina ocupa uno de los últimos lugares por su limitada producción (MINAGRI 2013). Otro motivo de confusión en la identificación entre las carnes ovinas y caprinas se debe a que los comerciantes de carnes ofrecían carne de caprino de la raza "Pelibuey"; siendo el Pelibuey una raza de ovino con gran capacidad de adaptación en zonas cálidas (Aguilar, C., Berruecos, J., Espinoza, B., Segura, J., Valencia J., y Roldán, A, 2017).

Las seis muestras de carne molida (una muestra por cada provincia) resultaron ser carne de bovino, ninguna mostró mezcla con otras especies. Por lo que se descarta la mezcla de carnes en esta región.

Respecto a los embutidos todas las muestras analizadas con el primer 12S rRNA y con la enzima *AluI*, no se pudieron confirmar el tipo de carne presente en los mismos. Es

importante mencionar que análisis repetidos dieron patrones electroforéticos distintos. Esto se puede entender como una mezcla de carnes de distinto tipo para la fabricación de estos embutidos. Así estos análisis no pudieron determinar los tipos de carne que se usaron en estas mezclas. Finalmente estos resultados servirían como base para el desarrollo de futuros estudios que confirmen la procedencia y tipo de carne empleada en la fabricación de estos embutidos.

V. CONCLUSIONES

- Se identificó con precisión las especies cárnicas comerciales: bovino, porcino y ovino con el uso de PCR-RFLP, técnica rápida y relativo bajo costo, en las principales ciudades de Amazonas.
- El presente estudio confirma que no existe sustitución de especies por otras de menor costo comercial en las ciudades de Chachapoyas, Bagua Grande, Luya, Pedro Ruiz y Rodríguez de Mendoza excepto en la ciudad de Bagua donde se identificó sustitución de ovino por caprino. Sin embargo, la carne de ovino y caprino tiene el mismo precio en el mercado de dicho lugar por lo cual especies de menor costo comercial no sustituirían a otras de mayor costo.
- La sustitución de especies puede verse fomentada por la obtención de beneficios económicos o por desconocimiento de los comerciantes respecto a la pertenencia de una raza dentro de una especie; con lo que se estaría atentando contra la salud de los consumidores principalmente en la población más vulnerable: niños, mujeres embarazadas y ancianos; ocasionando pérdidas económicas y vulnerando principios éticos y religiosos en consumidores que por ciertas costumbres se abstienen de consumir algunos alimentos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que futuras investigaciones apunten a incrementar el conocimiento en productores y comerciantes de ganado ovino y caprino para evitar la confusión de ganado caprino por ovinos de la raza Pelibuey.
- El uso de técnicas moleculares para la identificación de especies cárnicas es recomendable debido a que es un procedimiento rápido y de bajo costo cuya especificidad podría ayudar a evitar el etiquetado erróneo o sustitución de especies cárnicas al ser usado en programas de inspección sanitaria.
- Para generar más información en la identificación de especies cárnicas se recomienda usar otros genes como el gen 16S o el gen del *Citocromo b* que han demostrado especificidad en otros estudios.
- Se recomienda el uso de PCR-RFLP no solo en la identificación de especies cárnicas para prevenir la sustitución de especies, sino también en otros rubros, por ejemplo en la identificación de especies amenazadas o en peligro de extinción que se sospeche que se están comercializando ilegalmente.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, A., Alonso, G., y Barrero, M. (2012). Identificación de especies de atún (*Thunnus* spp) en Venezuela utilizando la técnica de PCR. *Revista Científica*, 22(4), 368-375.
- Aguilar, C., Berruecos, J., Espinoza, B., Segura, J., Valencia J., y Roldán, A. (2017). Origen, historia y situación actual de la oveja pelibey en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20 (2017), 429 - 439.
- Arroyo, O. (2007). Situación actual y proyecciones de la crianza de caprinos en el Perú. *APPA*, 15 (1), 290–293.
- Ali, M., Razzak, M., Hamid, S., Rahman, M., Amin, M., Rashid, N., y Asing, S. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, 1(77), 214–224. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.098
- Aranguren, J., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil, Y., Yáñez, L., Borjas, L., y Zabala, W. (2009). Identificación de especies en productos de origen animal mediante PCR. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 19(2), 159–164.
- Delgado de la Torre, R. (2006). Genética y Probabilidad: pruebas de paternidad y portadores de enfermedades. *Materiales Matemàtics*, 11(13), 1887–1097.
- Doosti, A., Ghasemi, P., y Rahimi, E. (2011). Molecular assay to fraud identification of meat products. *Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 148–152. doi.org/10.1007/s13197-011-0456-3
- Eaqub, A., Ahamad, M., Asing, Hossain, M., y Sultana, S. (2017). Multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay discriminates of rabbit, rat and squirrel meat in frankfurter products. *Food Control*, 1(84), 148–158. doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.030
- Espinoza, T., Mesa, F., Valencia, E., y Quevedo, R. (2015). Types of fraud in meat and meat products: a review. *Scientia Agropecuaria*, 6(3), 223–233. doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.09
- FAO/OMS (2016). *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento* (Vigésima quinta edición). Roma, Italia 1–275.
- Galal, A., Mohammed, K., Osman, A., Abouel, K., Borrell, Y., y Garcia, E. (2016). SNP-

- based PCR-RFLP, T-RFLP and FINS methodologies for the identification of commercial fish species in Egypt. *Fisheries Research*, 185(112), 34–42. doi.org/10.1016/j.fishres.2016.09.031
- Gana, P., y Abalaka, M. (2011). The principle and application of restriction enzyme in genetic engineering, *Journal of Research and Opinion*. 12(9), 158–162.
- García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida : fundamentos , actualidad e importancia. *Universo Diagnostico*, 1(2), 31–41.
- Girish, P., Anjaneyulu, A., Viswas, K., Shivakumar, B., Anand, M., Patel, M., y Sharma, B. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70(1), 107–112. doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.004
- Jimenez, M. (2009). *Los conceptos de población y de especie en la enseñanza de la biología: concepciones, dificultades y perspectivas* (tesis doctoral), Universidad de Granada, Andalucía, España.
- Jimenez, P., y Collada, C. (2008). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Forest Systems*, 9(4), 237–248.
- López, M., Mallorquín, P., y Vega, M. (2003). *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria*. Madrid. España: Spainfo.
- Murugaiah, C., Noor, Z., Mastakim, M., Bilung, L. M., Selamat, J., y Radu, S. (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. *Meat Science*, 83(1), 57–61. doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.015
- Ortiz, S. (2017). *Desarrollo de un sistema preventivo para reducir el riesgo de contaminación cruzada entre carnes de diferentes especies en una planta de procesados cárnicos* (tesis de maestría). Universidad Autonoma de Barcelona, España.
- Peral, P., Giovambattista, G., y Verónica, M. (2015). *Genética forense no humana*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Rojas, M., y García, T. (2007). Autenticación de carnes procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa por PCR-RFLP. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 215–225.

- Rojas , M., Gonzales, I., Martín de Santos, R. (2008). Autenticación de carne y productos carnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz y pintada mediante una técnica de PCR con cebadores-especie específicos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(2), 199-206
- Romero, A. (2017). *Genotipado para MSUD, osteopetrosis y sindactilia en bovinos de carne de la región este de Uruguay* (tesis de maestría). Universidad de la República, Uruguay.
- Sánchez, L. (2016). *Identificación y caracterización de hongos de interés para su uso industrial y, en especial, en la industria alimentaria mediante el uso de métodos moleculares* (tesis de pregrado), Universidad pública de Navarra, España.
- Sobrado, S. (2017). *La contaminación o adulteración de alimentos y su afectación a la salud pública en la ciudad de Huanuco, 2017* (tesis de pregrado). Universidad de Huánuco, Perú.
- Spink, J., Moyer, D., Park, H., Wu, Y., Fersht, V., Shao, B., y Edelev, D. (2015). Introducing Food Fraud. *Food Chemistry*, 3(189), 102–107. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.106
- Sumathi, G., Jeyasekaran, G., Jeya Shakila, R., Sivaraman, B., Arunkumar, G., Manimaran, U., y Sukumar, D. (2015). Molecular identification of grouper species using PCR-RFLP technique. *Food Control*, 51(2015) , 300–306.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 2(5), 70–78. doi.org/10.1157/13059826
- Yang, L., Tan, Z., Wang, D., Xue, L., Guan, M., Huang, T., y Li, R. (2014). Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific Reports*, 4(4089), 1–11. doi.org/10.1038/srep04089

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de PCR para amplificación del gen 12S rRNA utilizando el primer específico para bovino

FASES	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Pre desnaturalización	94 °C	1 Minuto	1
Desnaturalización	94 °C	1 Minuto	
Alineamiento	52 °C	1 Minuto	40
Extensión	72 °C	1 Minuto	
Extensión	72 °C	5 Minutos	1

Anexo 2. Protocolo 2 de PCR para amplificación del gen 12S rRNA utilizando el primer específico para bovino

FASES	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Pre desnaturalización	94 °C	1 Minuto	1
Desnaturalización	94 °C	1 Minuto	
Alineamiento	52 °C	1 Minuto	40
Extensión	72 °C	1 Minuto	
Extensión	68 °C	2 Minutos	1

Anexo 3. Protocolo de PCR para el Primer 12S Porcino

FASES	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Pre desnaturalización	94 °C	1 Minuto	1
Desnaturalización	94 °C	1 Minuto	40

Alineamiento	5 °C	1 Minuto	
Extensión	72 °C	1 Minuto	
Extensión	68 °C	2 Minutos	1

Anexo 4. Protocolo de PCR para el Primer 12S Ovino

FASES	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Pre desnaturalización	94 °C	1 Minuto	1
Desnaturalización	94 °C	1 Minuto	
Alineamiento	56 °C	1 Minuto	40
Extensión	72 °C	1 Minuto	
Extensión	68 °C	2 Minutos	1

Anexo 5. Protocolo de PCR para el Primer 12S Caprino

FASES	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Pre desnaturalización	94 °C	1 Minuto	1
Desnaturalización	94 °C	1 Minuto	
Alineamiento	56 °C	1 Minuto	40
Extensión	72 °C	1 Minuto	
Extensión	68 °C	2 Minutos	1