

## IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES ANIMALES PRESENTES EN GELATINAS COMERCIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA PCR. <sup>a</sup>

### IDENTIFICATION OF ANIMAL SPECIES PRESENT IN COMMERCIAL GELATINS, BY MEANS OF THE PCR TECHNIQUE

Cedillo-Nieto, J.T.<sup>1</sup>; Montiel-Sosa, J. F.<sup>1</sup>; Sánchez-Mendoza, A.E.<sup>1</sup>; Moreno-Lara, J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán, Campo 4, UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, C.P.  
54740. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

\* E-mail: [jesusmate4euclides@gmail.com](mailto:jesusmate4euclides@gmail.com)

Fecha de envío: 05, enero, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

#### Resumen:

El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia de especies de las materias empleadas para la elaboración de grenetinas y gelatinas comerciales, mediante pruebas de PCR (Reacción en cadena de polimerasa), para identificar las especies constituyentes del producto y así poder garantizar al consumidor la información necesaria para que su adquisición y consumo sean seguros y confiables. Se utilizaron 16 marcas de gelatinas y 5 grenetinas diferentes, que se encuentran presentes en el mercado, a las cuales se les extrajo ADN para su posterior análisis por PCR punto final empleando primers específicos. En las muestras analizadas fue identificada la presencia de la especie con la que fue elaborada la muestra, siendo estos importantes porque se comprobó que algunas de ellas contienen una o más especies diferentes, es importante conocer la especie o especies que contienen las gelatinas, debido a que el consumidor puede ser alérgico a alguna de ellas.

**Palabras clave:** grenetina, PCR, autenticación, alergia, etiquetado.

#### Abstract:

The objective of this investigation was to identify the presence of species of the materials used for the elaboration of commercial gelatins and gelatins, through PCR (Polymerase Chain Reaction) tests, to identify the constituent species of the product and thus be able to guarantee the consumer the information necessary for your purchase and consumption to be safe and reliable. 16 brands of gelatins and 5 different gelatins were used, which are on the market, from which DNA was extracted for subsequent analysis by end-point PCR using specific primers. In the samples analyzed, the presence of the species with which the sample was made was identified, these being important because it was verified that some of them contain one or more different species, it is important to know the species or species that the jellies contain, because the consumer may be allergic to any of them.

**Keywords:** grenetin, PCR, authentication, allergy, labelled.

---

<sup>a</sup> Cedillo Nieto, J. T. (2022) Identificación de ADN de especies de bovino, porcino, pollo y pescado en gelatinas comerciales, mediante la técnica Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Tesis para obtener el título de Ingeniero en alimentos, Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los productos más importantes proveniente de ganado bovino, porcino y hasta de pollo es la gnetina. Químicamente, la gelatina es una mezcla de polipéptidos compuesto por hidrólisis parcial del colágeno de las pieles y cueros de especies bovina y porcina (Karim & Bhat, 2018). Tiene múltiples usos como gelatinas, dulces, gomitas de frutas, caramelos, yogurt, postre espumado de leche, malvaviscos, carne, salchichas y en la industria farmacéutica se utiliza en la elaboración de capsulas (Schrieber & Gareis, 2007).

Los materiales originales y el proceso utilizado para la gelatina deben estar aprobados o certificados (Shabani, 2015). Es importante mencionar que el impacto que se tiene en la República mexicana, en particular el Estado de México es enorme debido al alto porcentaje de consumo de gelatina por los habitantes de esta región, además, algunos consumidores son alérgicos a los alimentos que contienen gelatina de mamíferos, aves o pescado (Kuehn, 2009). En la actualidad, hay muchas restricciones a productos de esta índole, por cuestiones de ideología, creencias religiosas hasta por salud (Sultana, 2020). Derivado de esto es crucial conocer el origen y procedencia de la gnetina utilizada en la elaboración de estos productos, para brindar la confianza y certeza al cliente al adquirir y consumir el producto.

Haciendo una revisión bibliográfica de trabajos de autenticación por técnicas de biología molecular en diferentes herramientas de búsqueda, se apreció que no hay publicados estudios de esta naturaleza y sobre todo de gelatina y gnetina en el país.

Es fundamental que se coloque en la etiqueta el origen de las materias primas que conforman el producto según la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 (Secretaría de Economía, 2010). para dar a conocer al cliente lo que consume y tenga la confianza de que no infringe alguna norma socio-cultural o religiosa, o que no afectará su salud, en el caso de las personas alérgicas. En Europa el Reglamento (UE) No 1169/2011 (Diario oficial de la Unión Europea, 2018) pide especificar la presencia de sustancias o productos con un efecto alérgico o de intolerancia científicamente probado para que los consumidores.

Este estudio se enfocó a determinar el ADN de la especie presente en gernetinas y gelatinas comercializadas en México, como por ejemplo ADN de ganado porcino (*Sus scrofa domesticus*), ganado bovino (*Bos taurus*), pescado (*Oreochromis niloticus*) y pollo (*Gallus gallus domesticus*) mediante técnicas de biología molecular como PCR para identificar las especies constituyentes del producto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación cualitativa se llevó a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), en laboratorio número 18. Durante un periodo comprendido entre el 18 de noviembre del 2021 y el 28 de julio. Las muestras totales utilizadas fueron 25; cuatro muestras de tejido de las especies de interés (tres réplicas para cada una), las cuales fungieron como muestras control, 16 gelatinas (Cuadro 1) y 5 gernetinas de diferentes marcas comerciales.

**Cuadro 1.** Codificación, declaración nutrimental y numero de lote de las 16 gelatinas utilizadas.

**Table 1.** Coding, nutritional declaration and batch number of the 16 gelatines used.

No de muestra	Código	Declaración nutrimental por envase	Lote
1	GG1	Proteínas 1.7g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 8.7g, Fibra dietética 0g, sodio 12mg. Contenido energético por envase 465.9 kcal (1980.2 kJ).	L2443
2	GMK1	Proteínas 2.3g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 1.4g, Fibra dietética 0g, sodio 10mg. Vitamina A, B1, B6, D, Hierro, Zinc, 5% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 14.8 cal (62.9 kJ).	LOT M9080
3	GJo1	Proteínas 1.6g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 0.2g, Fibra dietética 0g, sodio 53mg. Vitamina C, 6mg = 10% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 73.8 kcal (313.5 kJ).	8 19:11
4	GA1	Proteínas 1.8g, Grasas 0.5g, Hidratos de carbono disponibles 8.4g, Fibra dietética 0.7g, sodio 7 mg. Contenido energético por envase 463.90 kcal (62.9 kJ).	LOT 257A

Continuacion cuadro 1

5	GPO1	Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 6g, Fibra dietética 0g, sodio 80mg. Vitamina C, 15% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 32 kcal (136 kJ).	LT: 21H31
6	GB1	Proteínas 1.45g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 13.02g, Fibra dietética 0g, sodio 4.85mg. Contenido energético por envase 578.80 kcal (2459.90 kJ).	LOT 263A
7	GSP1	Proteínas 1.45g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 8.86g, Fibra dietética 0g, sodio 30mg. Contenido energético por envase 412.4 kcal (1752.7 kJ).	LOT 279A
8	GPR1	Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 4mg. Contenido energético por envase 500 kcal (200 kJ).	LOT 2081
9	GM1	Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 4mg. Vitamina C, 10% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 480 kcal (2040 kJ).	LOT 2082
10	GD1	Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 65mg. Contiene Fenilalanina, Tartrazina, TBHQ y sulfitos, Contenido energético por envase 500 kcal (2040 kJ).	Sin Lote
11	GFr1	Proteínas 1.94g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 0.15g, Fibra dietética 0g, sodio 2mg. Contenido energético por envase 9 kcal (35 kJ).	L160T1
12	GCo1	Proteínas 2g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas Trans 0g, Hidratos de Carbono Disponibles 15.62g, Azúcares 15.62g, Azúcares añadidos 15.62g, Fibra dietética 0g, Sodio 6mg. Contenido energético por envase 624 kcal (261 kJ).	250
13	GSa1	Proteínas 2g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas Trans 0 mg, Hidratos de Carbono disponibles 9g, Azúcares 7g, Azúcares añadidos 4.22g, Fibra dietética 0g, Sodio 10 mg. Contenido energético por envase 440 kcal (1870 kJ).	LC270522
14	GCH1	Proteínas 1.7g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas trans 0mg, Grasas monoinsaturadas 0g, Grasas poliinsaturadas 0g, Colesterol 0mg, Hidratos de carbono disponibles 9.5 g, Azúcares 9.5g, Azúcares añadidos 9.5g, Fibra dietética 0g, Sodio 17.8mg. Contenido energético por envase 492.8 kcal (2094.4 kJ).	LOT03
15	GJa1	Proteínas 1.85g, Grasas Totales 0g, Grasas Saturadas 0g, Grasas Trans 0mg, Hidratos de carbono disponibles 9.7g, Azucares 9.7g, Azucares añadidos 9.7g, Fibra dietética 0g, Sodio 10 mg. Contenido energético por bolsa de 140g 375 kcal (1595 kJ).	1312D 200403
16	GCay1	Proteína 8.4g, Grasas Totales 0g, Grasas Saturadas 0g, Grasas Trans 0mg, Hidratos de carbono 87.8g, Azúcares 83.6g, Azúcares añadidos 83.6g, Fibra dietética 0.0 mg, Sodio 21mg, contenido energético por envase de 100g 385 kcal (1635 kJ).	Sin Lote

El diseño de primers se realizó con el programa Primer Quest Tool el cual permitió obtener los siguientes pares de primers (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Primers empleados durante la investigación para la identificación de especies.

**Table 2.** Primers used during the research for species identification.

Especie	Primer	Secuencia	Tamaño del amplificado
Bovino <sup>2</sup>	Frontal	CGCCGGACTCTATTTCTATTC	461 pb
	Reverso	TAACGAGTGCTATGTGGCTTAC	
Porcino <sup>3</sup>	Frontal	GCCTAAATCTCCCCTCAA	210 pb
	Reverso	GAAAGAGGCAAATAGATTT	
Pescado	Frontal	TCTCGGAGACGACCAAATCTA	209 pb
	Reverso	CAGATGAGGCGAGAAGAAGAAG	
Pollo <sup>3</sup>	Frontal	GGAGCTAACCACAGCTACATAC	235pb
	Reverso	GGTTGGATAAGCAGAGAGAAG	

### Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras control se realizó por medio del método de sambrook (2001), el cual se basa en desintegrar el producto o tejido con 1250 µL de solución de lisis y 7 µL de proteinasa k, seguido de la extracción de proteínas y polisacáridos con 250 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y finalmente la precipitación de ADN con 1000 µL de etanol frío (Sánchez Mendoza, 2021).

Para extraer el ADN de las muestras de gelatina, se procedió a centrifugar las muestras tres veces, la primera se centrifugo a 12,000 rpm durante 5 min, la segunda a 14,000 rpm durante 5 min y la tercera a 14,000 rpm durante 5 min, después de esto se retiró la fase acuosa de cada uno y se agregaron 1500 µL de agua libre de nucleasas y se sometieron a temperatura constante de 40°C por un tiempo de 5 min y por último se centrifugaron tres veces, a las mismas condiciones de revoluciones y tiempo anteriormente mencionadas, se retiró la fase acuosa y se añadieron 30 µL de agua libre de nucleasas.

<sup>2</sup> Cesar Ponce J.H. (2017). Detección de especies animales no reportadas en la etiqueta de salchichas comerciales por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tesis para obtener el título de ingeniero en alimentos, Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>3</sup> Roblero Domínguez A. (2019). Determinación de aculturación con especies *Gallus gallus domesticus*, *Sus scrofa domesticus* y *Bos taurus* en embutidos de pavo mediante PCR. Tesis para obtener el título de ingeniero en alimentos, Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.

## **Cuantificación de ADN**

Se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop se colocó 2µL de la muestra a cuantificar, esto se repitió con cada una de las muestras posteriormente se registraron los valores, en la bitácora, de: Relación 260/280, y ng/µL. Esto se realizó para saber la calidad y cantidad de ADN contenido en las muestras, con la finalidad de usarlas posteriormente en la PCR.

## **PCR**

La técnica de PCR para las muestras control se llevó a cabo con la ayuda de un kit DNeasy Blood & Tissue para PCR compuesta por: Taq ADN polimerasa, dNTP's y MgCl<sub>2</sub>. Para la reacción se ocuparon las siguientes cantidades Master Mix 12.5 µL, Primer Frontal 0.5 µL, Primer Reverso 0.5 µL, Agua libre de nucleasas 10.5 µL, ADN 1 µL.

Para el caso de las muestras de gelatina y grenetina respectivamente la técnica de PCR DIRECTA se realizó con la ayuda del kit Phire Animal Tissue Direct para PCR compuesta por: ADN polimerasa Phire Hot Start II, dNTP's y MgCl<sub>2</sub>. Para la reacción se ocuparon las siguientes cantidades Buffer 2x Phire 5 µL, Enzima Polimerasa 0.2 µL, Primer Frontal 0.25 µL, Primer Reverso 0.25 µL, Agua libre de nucleasas 3.3 µL, ADN 1 µL.

## **Electroforesis en muestras y visualización de ADN**

Para analizar los resultados se llevó a cabo una electroforesis horizontal con geles de agarosa al 1.5% y 3%. Una vez realizado lo anterior se procedió a cargar 10-12 µL de las muestras en el gel y el marcador de peso molecular. Para poder visualizar el ADN se colocó el gel dentro del transiluminador, centrado y encendió el transiluminador al mismo tiempo que la cámara y se fotografió el gel.



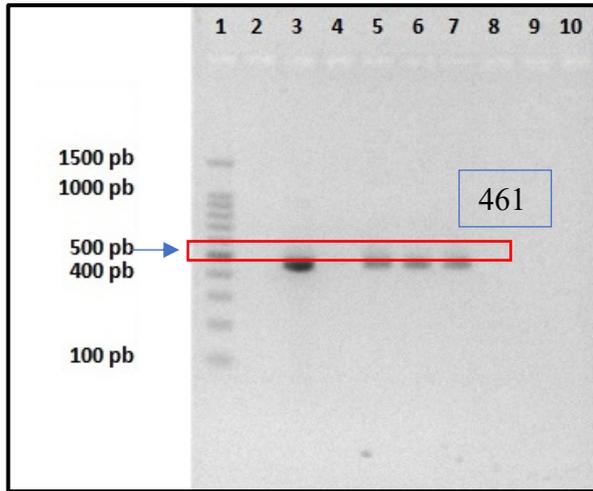
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para poder desarrollar la PCR se extrajo el ADN por el método de sambrook (2001), donde se obtuvieron valores de relación 260/280 y concentración de ADN, para la relación 260/280 el rango de los valores osciló entre 1.45 y 1.6. Para la concentración el rango de valores osciló entre 54.2 y 106.8.

Después de corroborar que la especificidad de los primers diseñados y que las muestras cumplían con las características necesarias para su uso, se inició la búsqueda de las especies *Bos taurus* (Figura 1), *Sus scrofa domesticus* (Figura 2), *Gallus gallus domesticus* (Figura 3) y *Oreochromis niloticus* (Figura 4) para lo cual se realizaron pruebas de PCR punto final o directas a cada una de las 16 muestras de ADN diluidas pertenecientes a gelatinas comerciales.

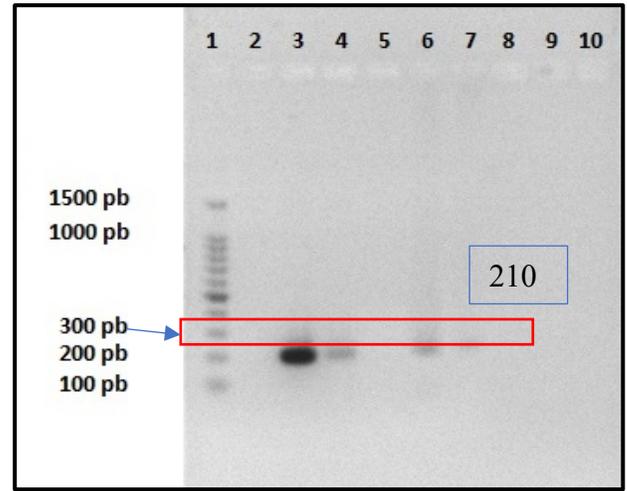
De las 16 muestras analizadas se identificó presencia de gelatina de ganado bovino en 7 de ellas, de ganado porcino en 5, de pescado en 2 y de pollo no se detectó presencia en ninguna, de ninguna de las especies esto puede explicarse porque durante el proceso de elaboración de la gelatina y gelatina, las pieles o huesos de los diferentes mamíferos de los cuales se elaboran se someten a diferentes tratamientos ácidos, muchas veces esos tratamientos ocasionan la desnaturalización del ADN, debido a que esta puede ocurrir por exposición de los ácidos nucleicos a agentes químicos o físicos, cambios de pH y enzimas (Salazar Montes, 2013). También es importante resaltar que en algunas muestras se registró la presencia de dos o más especies.





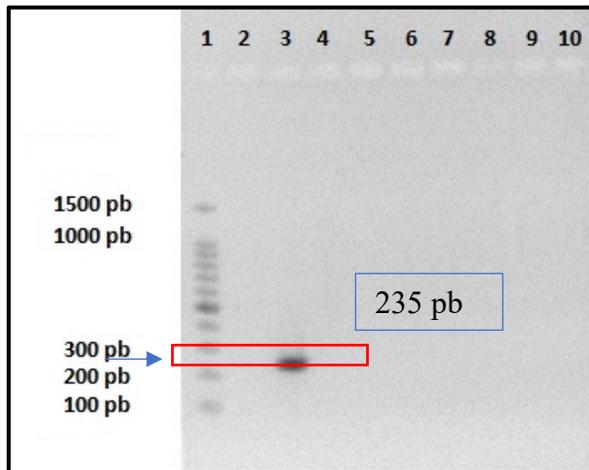
**Figura 1.** Gel de agarosa al 1.5%, para identificar *B. taurus* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *B. taurus*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

**Figure 1.** 1.5% agarose gel, to identify the *B. taurus* in different commercial gelatins 1) Molecular weight marker, 2) Blank, 3) *B. taurus*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.



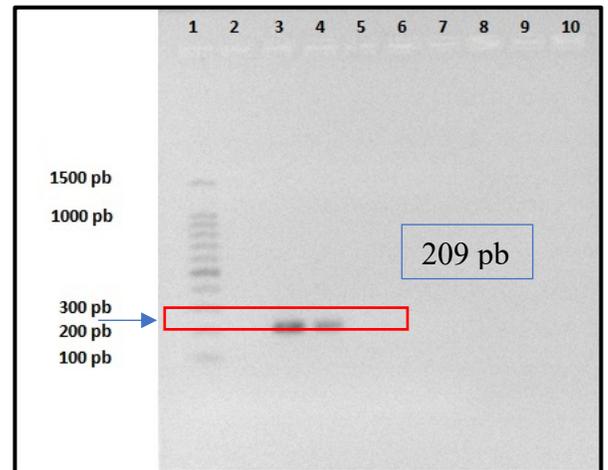
**Figura 2.** Gel de agarosa al 1.5%, para identificar *S. scrofa domestica* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *S. scrofa domestica*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

**Figure 2.** 1.5% agarose gel, to identify the *S. scrofa domestica* in different commercial gelatins 1) Molecular weight marker, 2) Blank, 3) *S. scrofa domestica*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.



**Figura 3.** Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de *G. gallus domestica* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *G. gallus domestica*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1 y 7) GA1.

**Figure 2.** 1.5% agarose gel, for identification of the *G. gallus domestica* species in different commercial gelatins 1) Molecular weight marker, 2) Blank, 3) *G. gallus domestica*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1 and 7) GA1.



**Figura 4.** Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de *O. niloticus* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *O. niloticus*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

**Figure 3.** 1.5% agarose gel, for the identification of the *O. niloticus* species in different commercial gelatins 1) Molecular weight marker, 2) Blank, 3) *O. niloticus*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) AG1.

Una de las normas que puede ser aplicada es la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. La cual contiene las especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria. Esta norma nos indica que la información contenida en las etiquetas de los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados debe ser veraz y describirse y presentarse de forma tal que no induzca a error al consumidor con respecto a la naturaleza y características del producto. Y al analizar las etiquetas de cada una de las muestras no se encontró que se infringiera alguna ley o norma debido a que siguen al pie de la letra la norma al solo mencionar “grenetina” y no especificar el tipo, aunque también esto puede traer consigo algunas complicaciones a la hora de que el consumidor elija el producto debido a que el origen del producto puede generar problemas de índole de salud (alergias) o socioculturales (Religión).

Las Normas Mexicanas: NMX-F-041-1983 y NMX-F-043- 1970 que hacen referencia a los postres de gelatina y a la grenetina pura respectivamente no incluyen alguna indicación o nota sobre el origen de la especie que se debe usar como ingrediente, pero son específicas al detallar de donde se puede obtener, de huesos y pieles, lo que define un marco de uso de proteína animal y no vegetal.

## CONCLUSIÓN

En este estudio, se identificó una o más de una especie (*Sus scrofa domesticus*, *Bos taurus* y *Oreochromis niloticus*), lo más interesante es que algunas contienen ADN de la especie *Oreochromis niloticus* y es importante decir que la obtención de esta grenetina suele ser más costosa en comparación de las otras especies además de que la incorporación de esta puede identificarse como innovación tecnológica introducida recientemente al mercado. La especie *Bos taurus* predomina en la mayoría de las muestras analizadas. Solo en cuatro muestras no fue posible la identificación de alguna especie debido a que durante el proceso de elaboración de gelatinas las moléculas de ADN pudieron degradarse. No se detectó la presencia de la especie *Gallus gallus domesticus* en las muestras analizadas.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) en el laboratorio 18, de la FES-Cuautitlán bajo la supervisión del Dr. José Francisco Montiel Sosa y la Dra. Ana Elvia Sánchez Mendoza.

## LITERATURA CITADA

- Benjakul, S. (2019). *Enciclopedia de química alimentaria*. Hat Yai: Elsevier.
- Diario oficial de la Unión Europea. (2018). Reglamento (UE) No 1169/2011 del parlamento europeo y del consejo sobre el suministro de información alimentaria a los consumidores. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea.
- Hassan, N., Ahmad, T., & Zain, h. M. (2018). Métodos químicos y quimiométricos para la autenticación halal de gelatina: una descripción general. *Journal of Food Science*, 2903 - 2911.
- Karim, A., & Bhat, R. (2018). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 644–656.
- Kuehn, A. (2009). Anaphylaxis provoked by ingestion of marshmallows containing fish gelatin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 708-709.
- Salazar Montes, A. (2013). *Biología Molecular*. México D.F: Mc Graw Hill education.
- Sánchez Mendoza, A. E. (2021). *Estudio de la influencia de polimorfismos sobre fenotipos asociados a la ternera de carne en las subespecies Bos taurus, Bos indicus Y Bos taurus x Bos indicus*. CUAUTITLÁN IZCALLI: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Secretaría de Economía. (2010). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-051-SCFI/SSA1-2010, especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-información comercial y sanitaria*. México: Dirección General de Normas.
- Shabani, H. (2015). Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. *Food Chemistry*, 203-206.
- Sultana, S. (2020). TaqMan probe based multiplex quantitative PCR assay for determination of bovine, porcine and fish DNA in gelatin admixture, food products and dietary supplements. *Food chemistry*, 1-7.