



Artículo

Estandarización del método de extracción de ácidos nucleicos en muestras comerciales enlatadas de atún (*Thunnus* sp.)

Standardization of nucleic acids extraction methods in commercial samples of canned tuna (*Thunnus* sp.)

Amarys **Aguilar**^{1,2}, Guillermina **Alonso**¹, Marinela **Barrero**^{2*}

¹Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos, Instituto de Biología Experimental, UCV

²Laboratorio de Productos Pesqueros, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, UCV
Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). A. P. 47114, Caracas 1041A,
Venezuela.

*Autora para correspondencia: marinela.barrero@ciens.ucv.ve

Aceptado 09-Mayo-2011

Resumen

Tradicionalmente, los países consumían productos pesqueros capturados por su propia flota en sus aguas territoriales. Hoy en día, el proceso de industrialización y la globalización de los mercados dificultan controlar el procesamiento de los alimentos, facilitando la posible sustitución fraudulenta de especies de pescado por otras de características similares. La genética molecular ofrece herramientas que permiten solventar estas dificultades, de manera confiable y rápida, permitiendo identificar especies pesqueras y sus productos, utilizando el ADN y no por un etiquetado. El objetivo del presente estudio fue estandarizar una metodología para la efectiva extracción de material genómico en muestras de atunes, frescos y enlatados, comercializados en Venezuela. Se ensayaron diferentes metodologías de lisis celular y aislamiento y purificación de ácidos nucleicos, y los resultados indicaron que las modificaciones realizadas a métodos previamente informados permitieron un aislamiento exitoso del material genético, aún cuando se observó material degradado en algunos de los productos analizados. El uso de estas metodologías se está extendiendo rápidamente en otros países y los resultados del

presente trabajo representan el primer informe nacional para la estandarización de los métodos moleculares para la futura trazabilidad molecular en Venezuela.

Palabras claves: aislamiento de ADN, alimento enlatado, atún, estandarización de metodología.

Abstract

Traditionally, countries get seafood caught by its own fleet in their own territorial waters. Today, the process of industrialization and globalization of commerce make it practice difficult to control the processing of food, making fraud or possible substitution of other fish species with similar characteristics. Molecular genetics provides tools to overcome these difficulties, reliably and quickly, allowing us to identify fish species and their products, using DNA and not by labeling. The aim of this study was to standardize a methodology for the effective extraction of genomic material in samples of tuna, fresh and canned, sold in Venezuela markets. Different methods of cell lysis and isolation and purification of nucleic acids were probed. The results indicated that the modifications of methods previously reported allowed successful purification of genetic material, even when degraded material was observed in some of the products analyzed. The use of these methodologies is spreading rapidly in other countries and the results of this study represent the first national report for the standardization of molecular methods for future molecular traceability in Venezuela.

Key words: canned food, DNA isolation, methodology standardization, tuna.

INTRODUCCIÓN

El atún (*Thunnus* sp.) representa una especie de gran importancia comercial a nivel mundial, siendo consumido fresco en productos como el sushi y el ceviche, o procesado para productos como las conservas. Diversas especies se pueden localizar en aguas templadas, como el “atún aleta azul” (*Thunnus thynnus*) y la albacora o “atún blanco” (*Thunnus alalunga*), mientras que en aguas cálidas se ubican el “atún aleta amarilla” o rabil (*Thunnus albacares*) y el barrilete (*Katsuwonus pelamis*). Las tendencias actuales demuestran que la demanda de los productos pesqueros a nivel mundial está en aumento, aportando más del 15 % de las proteínas de origen animal destinadas a consumo humano. Sin embargo, en Venezuela, se conoce muy poco acerca de las especies de túnidos que están siendo empleadas en el proceso de enlatado de este rubro alimenticio (Kunjachan, 2005).

Entre los diversos grupos de especies pesqueras que se capturan y comercializan en todo el mundo se destacan, tanto por su valor comercial como por su alto consumo, los gádidos (bacalao), los túnidos (albacora, atún), los merlúcidos (merluza europea, chilena, austral), los salmónidos (salmón, trucha), entre otros. Estos productos aparecen en los mercados en presentaciones que suponen un cierto grado de elaboración y/o transformación de la materia prima, que hace muy difícil, por no decir imposible, la correcta identificación de la especie o especies empleadas en su preparación (Pérez-Martín y González-Sotelo, 2005). Para los grupos de alimentos pesqueros, existen estudios sobre productos procesados dirigidos a la identificación de especies de atún o salmón, considerando que al menos otros 17 tipos de pescado presentan una carne de textura, sabor y color similar a estas especies, y puede ser relativamente fácil sustituir fraudulentamente las variedades más valoradas

de pescado por otras de textura similar (Estonba y Manzano, 2006).

La pesca comercial de túnidos se inicia con los palangreros japoneses en la zona del Pacífico, pero adquiere una alta significación en el Pacífico Oriental Tropical, después de la Segunda Guerra Mundial. Venezuela se incorpora en la actividad atunera a mediados de la década de los cincuenta, cuando se acondicionan algunas naves, y se inicia un proceso exploratorio y comercial con las operaciones de la nave Bosso-Marú, barco contratado por la empresa venezolana Productos Mar. En 1959 se constituye una empresa mixta venezolano-japonesa para la explotación de atunes en el área del Caribe y zonas adyacentes conformada, entre otras embarcaciones, por los palangreros Shoyo-Marú y Altamar III. Años más tarde, en 1975, se dan los primeros pasos para un cambio importante en la estructura de la flota atunera al incorporarse algunas unidades nacionales del tipo cerquero en el Océano Pacífico Oriental, y algunos cañeros en la zona del Caribe y Atlántico Occidental (Giménez, 2009). Su utilización varía en función del mercado al cual va dirigido el producto; el palangre se emplea para el mercado de producto crudo (sashimi y sushi), la vara para el atún fresco o enlatado y la red de cerco para el enlatado (Catarci, 2003).

En Venezuela se han realizado diversas investigaciones sobre la pesquería de túnidos, entre las que se pueden señalar las relacionadas con los índices de abundancia, ponderado y no ponderado, para el “atún aleta amarilla” (*T. albacares*) y la albacora (*T. alalunga*) (Griffiths y Nemoto, 1967), siendo la mayor distribución espacial de éstas especies de atún el Norte de Venezuela (Mar Caribe) y también en el Norte de Guayana (Océano Atlántico) en conjunto con las especies *Thunnus obesus* y *Thunnus atlanticus* (Marcano *et al.*, 2002).

Varios grupos de investigación han seguido el desarrollo de diferentes métodos de identificación para proporcionar a las autoridades, las industrias y los consumidores,

unas herramientas de control útiles y que permitan la aplicación y cumplimiento de las normas de etiquetado y la garantía de la lealtad de las transacciones comerciales con estas especies y sus productos (Chapela *et al.*, 2007). En el pasado, los criterios para la identificación de las especies se basaron en el análisis de las proteínas de los productos procesados (Dalvit *et al.*, 2007). Recientemente, la investigación se ha centrado en el análisis del ADN, permitiendo identificar los pescados y sus productos con base a su material genético, y no a una etiqueta asociados a ellos (Estonba y Manzano, 2006). Las muestras de ADN pueden ser aisladas de cualquier tejido biológico. En la práctica, y a los fines de implementar y masificar su uso en actividades comerciales, la toma de muestras debe ser de bajo costo y de fácil ejecución. La metodología para la identificación debe producirse con protocolos adecuados para el análisis de laboratorio. La metodología consta de varias etapas, siendo la primera de ellas el aislamiento del material genético presente en la muestra, seguida, la mayoría de las veces, por una amplificación por PCR de los fragmentos de ADN que se quieren identificar (Pardo y Pérez-Villareal, 2004). Uno de los problemas principales para ejecutar exitosamente estos métodos de identificación en la industria del atún, es la cantidad y la calidad del ADN extraído de las muestras procesadas para el enlatado, ya que los ácidos nucleicos pueden sufrir algún proceso de degradación debido a los tratamientos térmicos a los que está sometido el músculo durante el proceso de enlatado (cocción y esterilización), y también puede influir el tipo de líquido que se agrega para la presentación final del producto (Chapela *et al.*, 2007).

En Venezuela, en los últimos años se ha comenzado a utilizar la biotecnología como herramienta para diversas aplicaciones industriales, en particular en el mundo del comercio alimenticio. En este trabajo se evaluaron diversos métodos de aislamiento del material genético de productos alimenticios

enlatados, con la finalidad de crear un método factible que pueda ser aplicado en el mundo industrial, e incluso a nivel gubernamental, como técnicas de control en la calidad de los alimentos empleados a nivel comercial. Los resultados permitieron proponer las modificaciones adecuadas a métodos previamente informados, para lograr un aislamiento exitoso del material genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se utilizaron muestras de músculo provenientes de atún fresco (control) y de diversas latas de atún comercial, obtenidos en supermercados y mercados populares de la ciudad capital (Caracas, Venezuela), de lotes diferentes, bajo distintas presentaciones, tales como atún al limón, en aceite de oliva, al natural y ahumado. Adicionalmente se extrajo material genético del bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*).

Aislamiento del ADN

Se inició la estandarización del método de extracción de ácidos nucleicos, empleando tres técnicas diferentes, como procesos iniciales de prueba, basadas en el uso de homogeneizado celular, detergentes iónicos, tratamiento con fenol/cloroformo y precipitación con etanol.

Método 1

Este procedimiento es una modificación del descrito por Hsieh *et al.* (2007). Se homogenizó 1,8 g de cada muestra con 3 mL del buffer 1 (Tris-HCl 50 mM; pH 8,0; EDTA 0,1 M; SDS al 1 % y NaCl 0,2 M) empleando un Mixer Homogenizer (Omni International, Kennesaw, GA, USA). Una alícuota de 500 μ L se trató con 50 μ L de proteinasa K 5 mg/mL (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Se incubó la mezcla a 55 °C toda la noche con

agitación constante en un baño agitador orbital, modelo G76 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). La muestra se colocó en hielo 30 min y se centrifugó a 13.400 x g/10 min en un equipo Mastercycler® personal (Eppendorf, A. G., Hamburg, Germany). El sobrenadante se trató una vez con un volumen igual de fenol saturado en Tris-HCl, pH 8,0 y dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo en proporción 1:1. Luego se añadió 1 mL de etanol 100 % y se centrifugó a 13.400 x g/10 min. Se resuspendió el sedimento en 50 μ L de agua destilada esterilizada.

Método 2

Este procedimiento es una modificación del descrito por Sebatio *et al.* (2001). Se homogenizó 1,8 g de cada muestra con 3 mL del buffer 2 (Tris-HCl 0,01 M; pH 8,0; EDTA 0,01 M; SDS al 1 % y NaCl 0,01 M) empleando el Mixer Homogenizer (Omni International). Una alícuota de 500 μ L se trató con 10 μ L de proteinasa K 20 mg/mL (Promega Corporation). Se incubó la mezcla a 37 °C toda la noche en un Dri-Bath Thermolyne, Tipo 17600 (Barnstead International, Dubuque, IA, USA). Se trató dos veces con un volumen igual de fenol saturado con Tris-HCl, pH 8,0; y una vez con un volumen igual de cloroformo. Se precipitó con la adición de 1/10 del volumen de acetato de sodio (3,0 M), pH 5,3 y 2,5 de volumen de etanol 100 % helado, centrifugando a 13.400 x g/10 min entre cada tratamiento con el Mastercycler® personal (Eppendorf, A. G.). Se resuspendió el sedimento en 500 μ L de agua destilada esterilizada.

Método 3

Este procedimiento es una modificación del descrito por Ramella *et al.* (2005). Se homogeneizó 1,8 g de cada muestra con 3 mL del buffer 3 (Tris-HCl 10 mM; pH 8,0; EDTA 10 mM; SDS al 0,5 %; NaCl 125 mM y Urea 4

M) empleando el Mixer Homogenizer (Omni International). Una alícuota de 500 μL se trató con 3,5 μL de proteinasa K 10 mg/ml (Promega Corporation). Se incubó la mezcla a 37 °C toda la noche en el Dri-Bath Thermolyne, Tipo 17600 (Barnstead International). Se trató dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo en proporción 1:1; una vez con 1/100 del volumen de ARNasa, se precipitó el ADN con 1/10 del volumen de acetato de sodio (pH 5,3) y con el doble de volumen etanol 100 % helado. Se lavaron con etanol 70 %, centrifugando a 13.400 x g/10 min entre cada tratamiento con el Mastercycler® personal (Eppendorf, A. G.). Se resuspendió el sedimento en 100 μL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y EDTA 1 mM, pH 8,0).

En función de los resultados obtenidos se implementaron variaciones al método, resultando la metodología que se describe.

Metodología modificada desarrollada

Se homogeneizó 2 g de tejido muscular fresco en 5 mL de buffer 1 (Tris-HCl 50 mM; pH 8,0; EDTA 0,1 M; SDS al 1 % y NaCl 0,2 M) empleando el Mixer Homogenizer (Omni International). Se trató con 200 μL de proteinasa K 5 mg/mL (Promega Corporation) a 55 °C por toda una noche en agitación constante, en el baño agitador orbital modelo G76 (New Brunswick Scientific). A la mañana siguiente se incubó 30 minutos en hielo y se centrifugó a 13.400 x g/1 min con el equipo Mastercycler® personal (Eppendorf, A. G.). El sobrenadante se trató 2 veces con un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1; v:v), centrifugando a 13.400 x g/5 minutos en cada tratamiento. Se precipitaron los ácidos nucleicos con 2 volúmenes de etanol puro y centrifugando a 13.400 x g/10 min. Finalmente se resuspendió el sedimento en 100 μL de agua destilada estéril.

Electroforesis y registro del ADN aislado

Los ácidos nucleicos aislados de cada muestra de atún, con las respectivas metodologías aplicadas, fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0,6 % (p/v) en buffer TBE 1X (10X: Tris Base 0,89 M; ácido bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M), en las cámaras de electroforesis horizontal (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Se mezclaron 10 μL de las muestras con el buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0,25 %; xileno cianol 0,25 %; glicerol 30 %) (Promega Corporation). En los geles se cargó un marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III o Lambda DNA/EcoRI + Hind III (Promega Corporation). La electroforesis se realizó a voltajes entre 80 a 100 V. Posteriormente se trató el gel con una solución de bromuro de etidio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$), a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, durante 15 min. Se observó el ADN, empleando el equipo Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), mediante el programa Multi-Analyst®/PC (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se estimó la concentración y pureza con un Biofotómetro (Eppendorf, A. G.) a 260 nm y 280 nm de absorbancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para una exitosa extracción de los ácidos nucleicos, estos deben separarse de cualquier otro compuesto proveniente de las células o del ambiente del cual se tomaron las muestras. El espectro de absorción característico de los ácidos nucleicos presenta un máximo a $\lambda \sim 260 \text{ nm}$; si bien su coeficiente de extinción depende de la secuencia de nucleótidos, algunas reglas empíricas permiten estimar la concentración a partir del valor de A_{260} (Sambrook y Russel, 2001). Así, una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde aproximadamente a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN doble hebra. En las preparacio-

nes de los ácidos nucleicos son frecuentes las impurezas de naturaleza proteica, pero es posible estimar el grado de impurezas de origen proteico a partir del cociente A_{260}/A_{280} , dado que el máximo de absorbancia de las proteínas se encuentra en $\lambda \sim 280$ nm. La presencia de proteínas en la muestra hará que el cociente A_{260}/A_{280} sea menor que el esperado para ácidos nucleicos puros (valor esperado < 2). Además, los contaminantes como carbohidratos, compuestos fenólicos y aromáticos, así como la turbidez, absorben a 230 nm y 320 nm; por lo que se estima la relación A_{260}/A_{230} (valor ideal > 2) y el valor de A_{320} (valor óptimo 0) para garantizar la pureza

de la muestra (Sambrook y Russel, 2001; Falcón y Valera, 2007). Cuando los valores no cumplen estos estándares estipulados se considera que no entran en el intervalo de aceptabilidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo utilizando los tres métodos de purificación de ADN se muestran en el Cuadro 1. Los tres métodos permitieron aislar material genético con valores de absorbancia aceptables, a pesar de detectarse cierto grado de impureza. Los resultados demostraron que el método 1 fue el más efectivo para estos ensayos, obteniéndose un rendimiento mayor que con los otros 2 métodos.

Cuadro 1.- Resultados de las estimaciones de calidad y pureza de los aislamientos del ADN.

Muestra	Concentración de ADN* ($\mu\text{g}/\mu\text{L} \pm D. S.$)	(Valores de absorbancia obtenidos) Aceptabilidad
F1	$1,1447 \pm 0,04$	($A_{260}/A_{280} < 2. A_{260}/A_{230} > 2. A_{320} \neq 0$) Valores en el intervalo de aceptabilidad, excepto en la lectura a 230 nm
F2	$0,0439 \pm 0,01$	($A_{260}/A_{280} < 2. A_{260}/A_{230} < 2. A_{320} = 0$) Valores en el intervalo de aceptabilidad, excepto en la relación 260/230 nm
F3	$0,5486 \pm 0,12$	($A_{260}/A_{280} > 2. A_{260}/A_{230} < 2. A_{320} = 0$) Valores en el intervalo de aceptabilidad, excepto en las relaciones 260/230 nm y 260/280 nm
L1	$1,2272 \pm 0,06$	($A_{260}/A_{280} < 2. A_{260}/A_{230} < 2. A_{320} = 0$) Valores en el intervalo de aceptabilidad, excepto en la relación 260/230 nm
L2	$0,0599 \pm 0,02$	($A_{260}/A_{280} < 2. A_{260}/A_{230} > 2. A_{320} = 0$) Valores en el intervalo de aceptabilidad
L3	$0,4192 \pm 0,08$	($A_{260}/A_{280} > 2. A_{260}/A_{230} < 2. A_{320} = 0$) Valores en el intervalo de aceptabilidad, excepto en las relaciones 260/230nm y 260/280nm

* Los valores son promedios de tres repeticiones. *D. S.*: desviación estándar. F: muestras de atún fresco según métodos 1, 2 y 3. L: muestras de atún enlatado al limón, según métodos 1, 2 y 3.

El material aislado con los diferentes métodos se analizó mediante electroforesis, no detectándose material purificado o en muy poca cantidad (resultados no mostrados). Dado que estos resultados pudieran deberse a deficiencias en los métodos utilizados, se realizaron algunas modificaciones. Las muestras fueron tratadas inicialmente con una solución de cloroformo/metanol/agua (1:2:0,8; v:v:v) durante toda una noche a temperatura ambiental, con el objeto de remover los lípidos y aceites naturales del producto. Además, se aumentó la cantidad de tejido a tratar hasta 0,6 g de tejido muscular, tanto de las muestras del producto fresco como de los diferentes tipos de enlatados. Siguiendo el procedimiento del método 1, el material se homogeneizó con 3 mL del buffer 1. Los resultados fueron visualizados por electroforesis y se muestran en la Fig. 1. El rendimiento aumentó significativamente, en particular para el aislamiento de la muestra de atún fresco. Estos resultados pudieran ser debidos a degradación del material durante el procedimiento al cual se somete el alimento. Brevemente, este procedimiento incluye lavado, corte y eviscerado, lavado, cocción a 100 °C por aproximadamente 4 horas, limpieza, envasado, dosificación de líquido de cobertura a 80 °C, (agua, aceite, otros), sellado y lavado, esterilización a 117 °C, escurrido y secado, y etiquetado y embalaje.

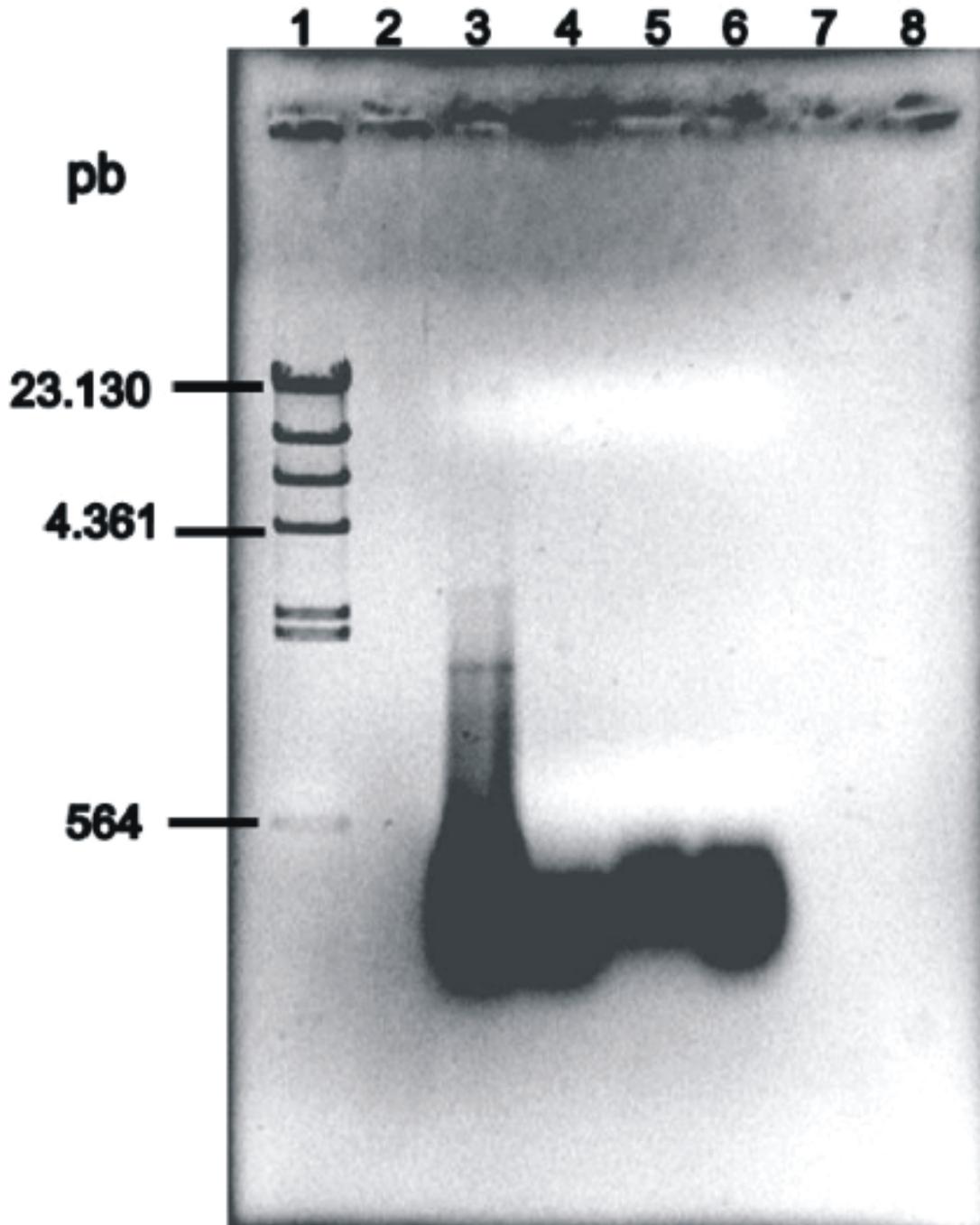
Estos resultados permiten sugerir que durante el proceso de enlatado y/o por los aditivos empleados para este fin, el material genético del producto alimenticio se encuentra en menor concentración o ha sufrido algún proceso de degradación (Fig. 1, carril 3 vs. carriles 4, 5 y 6).

Considerando los resultados obtenidos se realizó una nueva extracción empleando la metodología modificada descrita en la sección de materiales y métodos, y se realizó una corrida electroforética en geles de agarosa con 10 µL de muestra aislada tratada y no tratada con RNAsa. (Fig. 2).

Se realizaron extracciones de ADN de diferentes muestras de atunes frescos comercializados en la región capital. Se recolectaron muestras de atún en mercados populares, supermercados, pescaderías y camiones de pescados, así como tejido de bagre rayado (*Pseudoplatystoma tigrinum*) como control experimental. El método permitió el aislamiento de los diversos tejidos musculares de pescados analizados (resultados no mostrados).

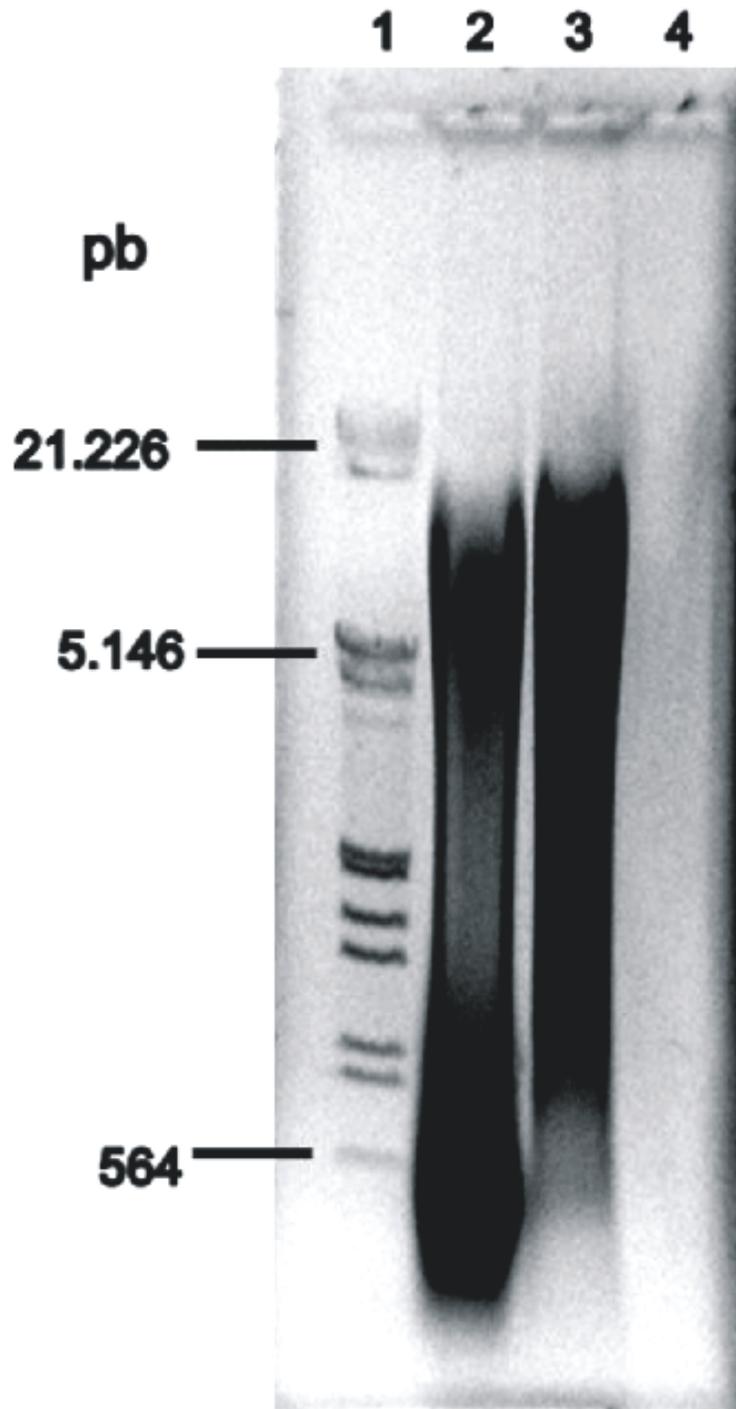
En base a los resultados satisfactorios, que se obtuvieron con la muestra control de atún fresco (Fig. 2), se empleó esta técnica modificada para aislar el material a partir de 4 tipos diferentes del producto enlatado, al limón, al natural, en aceite de oliva y ahumado. Alícuotas de todas las muestras fueron también tratadas con RNAsa. Los resultados mostraron que el material genético se encontró severamente degradado, ya que solo fue posible observar fragmentos de tamaño pequeño, no mayores de 1000 pares de bases. Estos resultados nos permiten sugerir que el procesamiento de las muestras para el enlatado y comercialización y/o la acción de diversos aditivos estaría afectando la calidad de los ácidos nucleicos presentes en el tejido del producto (Fig. 3).

Considerando que siempre se partió de la misma cantidad de tejido, tanto fresco como enlatado, los resultados obtenidos pudieran ser explicados por cambios en el material genético debido a los tratamientos realizados a la materia prima, tales como calentamiento y/o adición de diversas sustancias no siempre indicadas en la etiqueta del producto y que pueden infiltrarse en el tejido, heterogeneizando al producto, conllevando a un bajo rendimiento en el aislamiento de los ácidos nucleicos. Esta posibilidad debe confirmarse, ya que podría sugerir algún tipo de engaño a nivel comercial, ya que se altera la calidad del material que se está comercializando, y además puede dificultar la correcta identificación de la materia prima empleada, no permitiendo un control de calidad



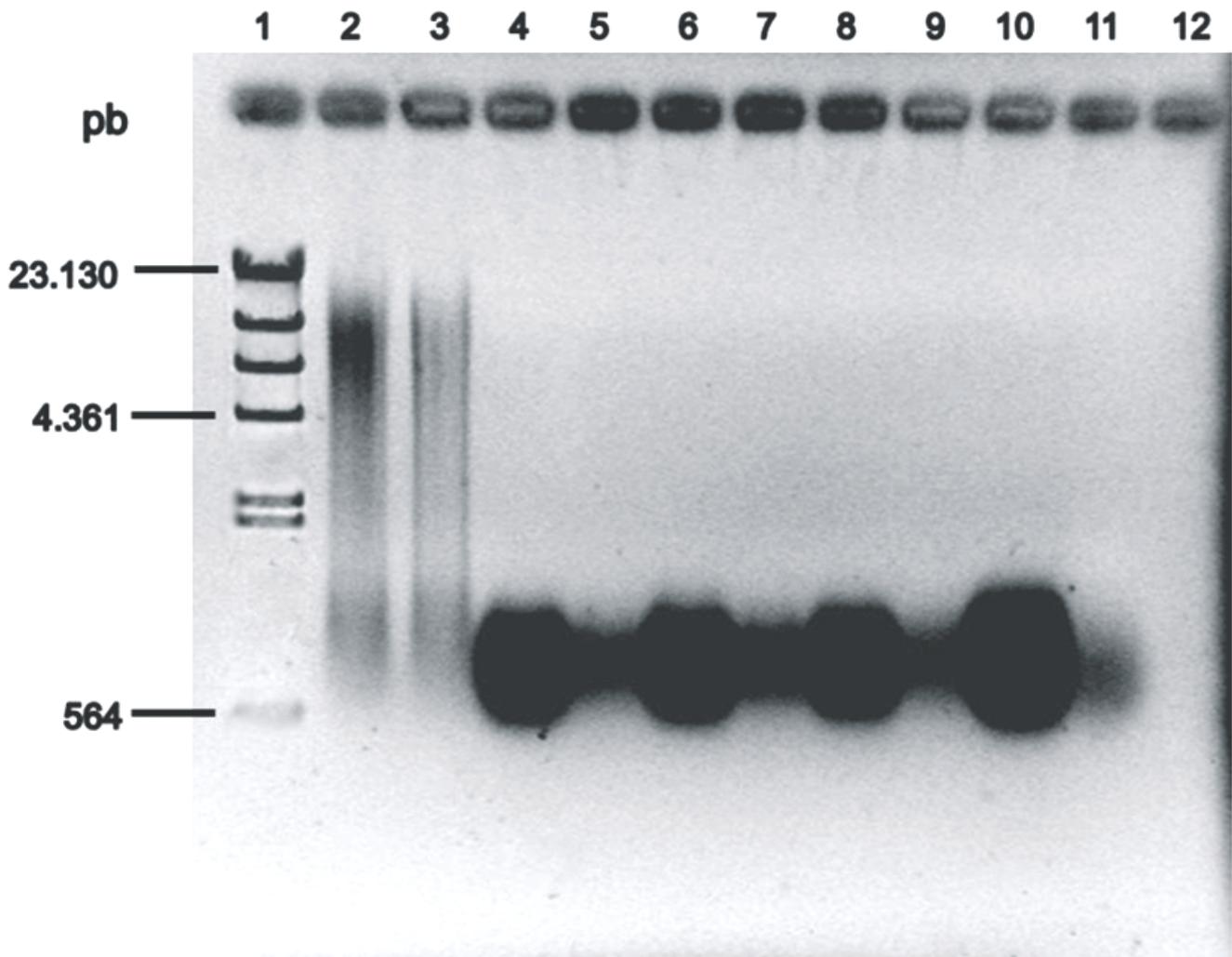
Carril 1: marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III. Carril 3: muestra atún fresco. Carril 4: muestra atún enlatado al limón. Carril 5: muestra atún enlatado ahumado. Carril 6: muestra atún enlatado al natural.

Figura 1.- Registro fotográfico de una corrida electroforética de las diferentes muestras obtenidas en el proceso de aislamiento y purificación de ADN.



Carril 1: marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + Hind III. Carril 2: muestra atún fresco. Carril 3: muestra atún fresco tratado con RNAsa.

Figura 2.- Registro fotográfico de una corrida electroforética de la muestra de atún fresco obtenida en el proceso modificado de aislamiento y purificación de ADN.



Carril 1: marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III. Carril 2, 4, 6, 8 y 10: muestras de atún fresco y enlatados (en aceite de oliva, ahumado, al natural y al limón). Carril 3, 5, 7, 9 y 11: mismas muestras de atún fresco y enlatados tratados con RNAsa, respectivamente.

Figura 3.- Registro fotográfico de una corrida electroforética de muestras de alimentos enlatados.

adecuado, bien sea de iniciativa privada o gubernamental. Para confirmar estas posibilidades se debe implementar, a nivel comercial y gubernamental, distintas normativas de regulación, en la cuales se involucren las técnicas moleculares, y que permitan medir los atributos de calidad en los productos destinados al comercio, tal que le

garanticen al consumidor que sus alimentos sean seguros y confiables.

Como una alternativa al método de análisis de proteínas para la identificación taxonómica de productos alimenticios en las últimas décadas se han desarrollado métodos basados en el ADN, que además presentan varias ventajas sobre los métodos basados en

proteínas. La aplicación de estas técnicas de Biología Molecular en el campo de la tecnología de alimentos y la trazabilidad depende, en gran medida, de la facilidad y reproducibilidad para extraer el ADN de las muestras a analizar. Este trabajo permitió estandarizar el método más adecuado para la purificación del material genético de muestras de atún, para su posterior utilización con fines de identificación. El análisis de los resultados permite proponer que el método modificado experimentalmente produce resultados satisfactorios para cualquier material biológico fresco, el cual podrá ser utilizado en pruebas moleculares posteriores para la identificación taxonómica del producto. Para los productos procesados, aún cuando el ADN puede verse alterado por los diversos procesamientos a los cuales es sometido el producto (calentamiento, adición de sustancias, enlatado), es todavía factible el poder amplificar pequeños fragmentos utilizando PCR, los cuales aportarán la información suficiente para su correcta identificación. Estas pruebas se están comenzando a estandarizar en nuestro laboratorio.

CONCLUSIONES

Para autentificar las especies presentes en un determinado producto pesquero, primero se debe contar con la disponibilidad de técnicas de análisis que revelen la identidad del producto. El método estandarizado en este trabajo para la extracción y purificación del material genómico generó resultados satisfactorios en las muestras de tejido muscular fresco en productos pesqueros de importancia comercial como el atún. El ADN purificado a partir de muestras tomadas en cualquier punto a lo largo de la cadena de producción puede ser confrontado con la historia del organismo, estableciendo, de este modo, las bases para un sistema individualizado de control. Así, el trazado mediante el análisis del ADN puede ligar el producto final (atún enlatado, fileteado,

ahumado, entre otros) hasta su origen, a través de todos los pasos del proceso.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela (Proyectos No. CDCH PG 03.6506.2006/2).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Catarci, Camillo. 2003. El mercado mundial del atún. Sinopsis y actualidad. INFOPECA Internacional. N° 15:1-9.
- Chapela, María José; Sotelo, Carmen G.; Pérez-Martín, Ricardo, I.; Pardo, Miguel Ángel; Pérez-Villareal, Begoña; Gilardi, Patricia and Riese, Juan. 2007. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*. 18(10):1211-1215.
- Dalvit, C.; De Marchi, M. and Cassandro, M. 2007. Genetic traceability of livestock products: a review. *Meat Science*. 77(4):437-449.
- Estonba, Andone y Manzano, Carmen. 2006. Aplicación de la tecnología del ADN en la seguridad y calidad agroalimentaria. Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Lejona, Vizcaya, España. 16 p. http://www.enpresa.ehu.es/p223content/es/contenidos/informacion/vri_encuentos/es_vri_encu/adjuntos/3_Eztonba_L.pdf
- Falcón, Luisa I. y Valera, Aldo. 2007. Extracción de ácidos nucleicos (Capítulo 16). Las herramientas moleculares (Quinta parte). En *Ecología Molecular*. (pp. 499-516). México, D. F., México: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales – Instituto Nacional de Ecología – Universidad Nacional Autónoma de México – Comisión Nacional para el Co-

- nocimiento y uso de la Biodiversidad.
- Giménez, Carlos. 2009. El atún: la actividad atunera en el contexto de la pesca mundial y venezolana. Caracas, Venezuela: Fundación para la Pesca Sostenida y Responsable de Túnidos (FUNDATUN).
- Griffiths, R.C. y Nemoto, T. 1967. Un estudio preliminar de la pesquería para atún aleta amarilla y albacora en el Mar Caribe y Océano Atlántico occidental por palangreros de Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría de Venezuela (MAC)-Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD)-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Serie Recursos y Explotación Pesqueros. 1(6):209-273.
- Hsieh, Hung Sheng; Chai, Tuu Jyi and Hwang, Deng Fwu. 2007. Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. Food Control. 18(4):369-374.
- Kunjachan, Thomas. 2005. Comparando tecnologías de congelación. INFOPECA Internacional. N° 21.
- Marcano, Jesús, S; Lárez, Asdrúbal; Gutiérrez, Xiomara; Salazar, Hebel; Márquez, María y Sayegh, Jorge. 2002. Pesquería de túnidos por pequeños palangreros en el Mar Caribe y el Océano Atlántico durante el período 1986-2000. Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela. 41(1 & 2):73-82.
- Pardo, Miguel A. and Pérez-Villareal, Begoña. 2004. Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. Food Chemistry. 86(1):143-150.
- Pérez-Martín, Ricardo Isaac y González-Sotelo, Carmen. 2005. Identificación de especies pesqueras mediante ADN. CTC Alimentación. N° 23:45-49.
- Ramella, Micheline S.; Kroth, Mariela A.; Tagliari, Caroline e Arisi, Ana Carolina M. 2005. Optimization of random amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophysus*. Ciência e Tecnologia de Alimentos (Brazil). 25(4):733-735.
- Sambrook, Joseph and Russell, David William. 2001. Spectrophotometry of DNA or RNA. In Molecular Cloning. A laboratory manual. Volume 3. (3rd. ed.). (pp. A8.20-A8.21). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sebatio, Paola; Zanelli, Paola and Neri, Tauro Maria. 2001. Identification of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semi preserves. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(3):1194-1199.