



TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

**Trabajo bibliográfico y experimental sobre nuevos aditivos con capacidad
humectante en productos cárnicos: guisante y zanahoria**

**Traballo bibliográfico e experimental sobre novos aditivos con capacidade
humectante en produtos cárnicos: chícharo e cenoria**

Bibliographic and experimental work on new wettability additives in meat products:
pea and carrot

Noemi González González

Enero, 2016



Facultade de Bioloxía

Trabajo bibliográfico y experimental sobre nuevos aditivos con capacidad humectante en productos cárnicos: guisante y zanahoria

Traballo bibliográfico e experimental sobre novos aditivos con capacidade humectante en produtos cárnicos: chícharo e cenoria

Bibliographic and experimental work on new wettability additives in meat products:
pea and carrot

Noemi González González

Dra. Montserrat Espiñeira Fernández y Dr. Manuel Becerra Fernández en calidad de tutores de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En Coruña, Enero del 2016

Firma tutores:

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	5
1.1. Agentes humectantes.....	10
1.2. Guisante: <i>Pisum sativum</i>.....	12
1.3. Zanahoria: <i>Daucus carota</i>.....	13
1.4. Técnicas analíticas para la detección de adulteraciones en productos cárnicos.....	14
1.5. Referencias bibliográficas sobre la detección de guisante y zanahoria.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
3.1. Detección de zanahoria.....	20
3.1.1. ADN.....	20
3.1.2. Cebadores.....	20
3.1.3. Sonda.....	20
3.1.4. Taq Polimerasa.....	21
3.1.5. Validación de las condiciones de RT-PCR.....	21
3.1.6. RT-PCR para comprobar la especificidad del método.....	21
3.1.7. RT-PCR para comprobar la sensibilidad del método.....	22
3.2. Detección de guisante.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Detección de zanahoria	
4.1.1 Validación de las condiciones de RT-PCR.....	25
4.1.2. Especificidad del método.....	25
4.1.3. Sensibilidad del método.....	28
4.2. Detección de guisante.....	28
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	29
6. BIBLIOGRAFÍA.....	31

ABREVIATURAS

%, porcentaje; μL , microlitros; μM , micromolar; $^{\circ}\text{C}$, grados Celsius; ADN, ácido desoxirribonucleico; ARN, ácido ribonucleico; ARNr, ácido ribonucleico ribosómico; Ct, cycle threshold; h, horas; kg, kilogramos; FAM, 6'-carboxyfluorescein; F, forward; g, gramos; FRET, fluorescent resonance energy transfer; LOD, limit of detection; mg, miligramos; ng, nanogramos; nm, nanómetros; pb, par de bases; PCR, polymerase chain reaction; pg, picogramos; RT-PCR, real time polymerase chain reaction; R, reverse; spp., especies; s, segundos; Ta, temperatura de anillamiento; TAMRA, tetramethylcarboxyrhodamine; UE, Unión Europea.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El uso de aditivos es una práctica que se remonta a muchos años de antigüedad. Se emplea desde que el hombre aprendió a conservar los alimentos de las cosechas de año en año y conservar la carne y el pescado con técnicas de salazón y ahumado (Ibáñez *et al.* 2003). Su uso en la industria alimentaria se ha intensificado junto con el desarrollo de la industria química, que puso al alcance de los fabricantes sustancias capaces de cumplir prácticamente cualquier función (Rebollar *et al.* 1991).

De acuerdo con el Real Decreto 3177/1983 del 16 de noviembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico sanitaria de aditivos alimentarios, un aditivo alimentario se considera: “cualquier sustancia que, normalmente no se consuma como alimento en sí, ni se use como ingrediente característico en la alimentación, independientemente de que tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada a los productos alimenticios, con un propósito tecnológico en la fase de su fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envase, transporte o almacenamiento tenga o pueda esperarse razonablemente que tenga, directa o indirectamente, como resultado que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan en un componente de dichos productos alimenticios”.

Es decir, un aditivo sería aquella sustancia o mezcla de sustancias añadidas intencionadamente a los alimentos que directa o indirectamente modifican las características físicas, químicas o biológicas, pero no aquellas añadidas con el objetivo de aumentar su valor nutritivo.

En la práctica, los aditivos de uso alimentario pueden proceder de dos orígenes distintos:

- Naturales: sustancias que han sido extraídas de materias primas alimenticias o de algún otro producto natural.

- Artificiales: sustancias que corresponden a estructuras químicas sintetizadas *de novo* en el laboratorio y carecen de equivalentes entre las que proceden del ámbito natural.

Las naturales equivalen a sustancias que siempre han formado parte de la alimentación humana, aunque en la actualidad sus estructuras sean obtenidas mediante síntesis en el laboratorio (Durán 2001). En cambio, las artificiales son sustancias que siempre tienen un origen sintético y, por lo general, suelen ser más económicas y eficientes, con resultados reproducibles y muy uniformes (Gutiérrez *et al.* 2002).

La variedad existente de aditivos alimentarios es muy extensa, así como las propiedades que le aportan a los alimentos (García Jiménez *et al.* 2008; Carrión *et al.* 2013). En la Directiva 89/107/CEE se establece una relación de categorías que fijan cada una de las posibles funciones a llevar a cabo y los productos que pertenecen a cada categoría. Según las funciones que pueden desarrollar los aditivos se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- Sustancias que modifican los caracteres organolépticos de los alimentos. Afectan a las cualidades que se perciben por medio de los sentidos de la vista, el olfato, el gusto y el tacto: colorantes, edulcorantes y potenciadores del sabor.
- Sustancias que estabilizan el aspecto y las características físicas de los alimentos, con lo que permiten mantener íntegras todas las propiedades físicas del producto hasta su consumo: emulsionantes, espesantes, estabilizantes y humectantes.
- Sustancias que impiden que se produzcan en un alimento alteraciones de tipo químico o biológico. Permiten prolongar la vida comercial de los productos elaborados: antioxidantes y conservantes.
- Sustancias correctoras de las cualidades plásticas, capaces de coadyuvar a la consecución de la textura más conveniente: endurecedores y gelificantes.
- Sustancias con otras funciones: agentes de recubrimiento, correctores de la acidez, enzimas, gases de envase...etc.

Las normativas relativas a los aditivos y al etiquetado exigen que éstos, como ingredientes alimentarios, figuren en las etiquetas de los envases de los alimentos y bebidas que los contienen (Directiva 2000/13/CE). Se debe identificar tanto la función del aditivo, por ejemplo, si se trata de un colorante, conservante, etc., como la sustancia específica utilizada. Esto se designa con el número E, que se compone de una letra E seguida de 3 o 4 dígitos.

El primer dígito indica la categoría a la cual pertenece el aditivo, el segundo hace referencia a la familia del aditivo (en el caso de los colorantes indica el color, en el de los antioxidantes el grupo químico al que pertenecen) y el resto de dígitos se refieren a la especie en concreto y sirve para identificar la sustancia.

El hecho de que tenga un número E asignado es la garantía de que el aditivo ha pasado controles de seguridad y ha sido aprobado para su uso en la Unión Europea (UE). Además, este se utiliza como una manera práctica y sencilla de etiquetar los aditivos autorizados en todos los idiomas de la UE (Figura 1).



Figura 1. Ejemplo de etiquetado de los ingredientes alimentarios en un envase de pechuga cocida de pavo. Dentro de los aditivos destacan el carragenano y trifosfato pentasódico como estabilizantes (E-407, E-451i), el ascorbato de sodio como antioxidante (E-301) y el nitrito de sodio como conservante (E-250).

La clasificación general de los números E según sus funciones, es la siguiente:

- E-1XX: colorantes
- E-2XX: conservantes
- E-3XX: antioxidantes y reguladores de pH
- E-4XX: estabilizantes, espesantes, humectantes, gelificantes y emulsionantes
- E-5XX: acidulantes, correctores de acidez y antiaglomerantes
- E-6XX: potenciadores del sabor
- E-9XX: otros aditivos (agentes de recubrimiento, gases de envasado, edulcorantes...etc.)

El 90% de los alimentos contiene uno o más aditivos, por lo tanto resulta indispensable tener muy clara su procedencia, las dosis utilizadas y sus posibles efectos en la salud. Es indudable que algunos de estos aditivos son esenciales para mantener las propiedades de los alimentos (como los conservantes), pero por otra parte existe una gran cantidad que son utilizados con fines meramente estéticos para conseguir la aceptación del producto por parte del consumidor, llegando a suponer una adulteración del alimento (colorantes, saborizantes, humectantes, aromatizantes...etc.). Se entiende por alimento adulterado aquel al que se le haya adicionado o sustraído cualquier sustancia para variar su composición, peso o volumen, con fines fraudulentos o para encubrir o corregir cualquier defecto (Espinoza *et al.* 2015).

La adulteración de los alimentos no sólo causa perjuicios en los consumidores, sino que también afecta severamente al sector productivo ocasionando una competencia desleal. Esto significa que la industria procesadora tiene la posibilidad de comprar materia prima de inferior calidad y transformarla posteriormente en un producto con mejores características y mucho más rentable que la materia original.

Por otro lado, las alergias alimentarias representan un importante problema de salud en los países industrializados (Poms *et al.* 2004; Esteban *et al.* 2007). Llegan a afectar hasta en un 2% de la población adulta y un 8% en niños (Woods *et al.* 2002). Por ejemplo, la proteína de soja es uno de los aditivos naturales que más se emplea en la industria alimentaria y está reconocido como un alérgeno potencial por el *Codex Alimentarius* (Españera *et al.* 2009). El guisante y la zanahoria, a pesar de no estar incluidos en esa lista, también presentan alergenicidad (Yman *et al.* 1988; Ballmer-

Weber *et al.* 2001; Sanchez-Monge *et al.* 2004). Es decir, su uso como aditivos alimentarios puede causar un serio problema de seguridad alimentaria.

Es por ello, que el consumidor depende totalmente de la veracidad de la lista de ingredientes en el etiquetado, siendo responsabilidad de los productores y agencias reguladores el verificar y asegurar que los productos contengan solamente los ingredientes indicados en sus etiquetas. Siendo conscientes de la relación que existe entre la dieta y los problemas de salud que ésta puede conllevar se requieren métodos que permitan detectar adulteraciones y abordar el problema de una forma eficaz y específica.

Dirigiendo nuestra atención a la industria cárnica, muchos de los aditivos que se añaden para adulterar estos productos son proteínas de origen vegetal, siendo la soja una de las más estudiadas en la literatura sobre este sector (Belloque *et al.* 2002; Pearson *et al.* 2002; Hoogenkamp *et al.* 2005; Freixanet 2010). Actualmente, el guisante y la zanahoria también se están introduciendo como nuevos aditivos en la industria cárnica (Chocano *et al.* 2002). Estas proteínas tienen características y funciones específicas, destacando entre ellas la capacidad de emulsificación y retención de agua aportando a los productos alimenticios una mayor consistencia. Generalmente se agregan a los productos cárnicos porque mejoran el ligado del agua en los productos de músculo entero, de carne molida y/o emulsificada. También ayudan a sostener la red de proteínas en el producto cárnico y a mejorar la formación y estabilidad de la emulsión. La adulteración de la carne puede realizarse tanto en el producto fresco como en el procesado. Esta acción genera un aumento del rendimiento del proceso de una forma fraudulenta, ya que partiendo de la misma cantidad de materia prima, obtenemos un producto final con mayor peso escurrido (engordamos el producto).

Por tanto, la detección de estos aditivos alimentarios en los productos cárnicos se centra en garantizar la calidad y seguridad alimentaria ya que la adulteración de los alimentos no solo causa perjuicios en los consumidores, sino que también ocasiona una competencia desleal entre las industrias del sector alimenticio.

1.1. Agentes humectantes

Los humectantes o agentes de retención de agua son sustancias higroscópicas que mediante la retención de agua estabilizan el aspecto y las características físicas de los alimentos impidiendo su desecación y manteniendo su humedad (contrarrestando el efecto de sequedad en la atmosfera). Es decir, estas sustancias evitan la pérdida de agua en los alimentos alargando la vida comercial del producto y provocan un aumento en el peso del mismo de una manera fraudulenta. También se les atribuye la capacidad de favorecer la disolución de una sustancia en polvo en un medio acuoso (Barros *et al.* 2009).

Dentro de los aditivos alimentarios se encuentran clasificados junto con los compuestos que estabilizan el aspecto y las características físicas de los alimentos (estabilizantes, espesantes, emulsionantes...etc.). Conforman un grupo de gran importancia, ya que aportan al alimento propiedades tales como textura, cuerpo, consistencia y estabilidad. Permiten que el alimento se presente como recién preparado en el momento de su consumo y facilitan muchos procesos de fabricación de alimentos reduciendo el coste final del producto para el beneficio del fabricante (Chocano *et al.* 2002).

En concreto, su uso en productos cárnicos está autorizado para incrementar la consistencia y jugosidad durante la preparación, prevenir la pérdida de agua, además de reducir la pérdida de jugos de la carne en el embalaje y durante su transformación posterior, en particular cuando se ha inyectado salmuera (Reglamento (UE) nº 601/2014).

Dentro de los humectantes más importantes en la industria cárnica autorizados por el Reglamento (UE) nº 601/2014 podemos destacar:

- El uso de ácido fosfórico, fosfatos, di-, tri- y polifosfatos (E 338-452) como humectante para prevenir la pérdida de jugos de la carne durante su transformación posterior, en particular cuando se ha inyectado salmuera.
- Empleo de alginatos (E 401-404), carragenanos (E-407), algas *Eucheuma* transformadas (E-407a), goma garrofín (E-410), goma guar (E-412), goma de tragacanto (E-413), goma xantana (E-415), fosfato de dialmidónacetilado (E-

1414) y fosfato de dialmidónhidroxipropilado (E-1442) como humectantes o estabilizadores para reducir la pérdida de agua en el embalaje y para prevenir la pérdida de jugos de la carne durante su transformación posterior.

- El uso de carbonatos de sodio (E-500) como humectantes en preparados de carne de aves de corral a fin de mantener la consistencia y la jugosidad durante la preparación posterior.
- Empleo de fosfato de dialmidónacetilado (E-1414) y de fosfato de dialmidónhidroxipropilado (E-1442) para disminuir la pérdida de agua en preparados de carne en los cuales se han inyectado ingredientes y en preparados de carne compuestos por partes de carne tratadas de forma diferente (picadas, cortadas en filetes o transformadas y combinadas entre sí, por ejemplo rollos que contengan carne picada) y con objeto de mantener la jugosidad durante la preparación.

En torno a este grupo de aditivos se están desarrollando nuevas tendencias y/o líneas de investigación utilizando como humectantes nuevos ingredientes funcionales (sin número E). Presentan propiedades de textura (espesantes, gelificantes, estabilizantes, humectantes, reemplazantes de grasa, emulsionantes...etc.) que se pueden aplicar en una gran variedad de alimentos. Son ingredientes naturales que han sido tratados para que al incorporarlos cumplan ciertas propiedades funcionales o nutricionales (Chocano *et al.* 2002). Dentro de este grupo destacan como ingredientes funcionales las fibras y proteínas vegetales de la soja, guisante, zanahoria, trigo, etc.

Los ingredientes sin número E son compuestos que no obligan a indicar en la etiqueta la adulteración del alimento procesado. Son aditivos de origen natural, con propiedades que permiten sustituir a los aditivos químicos y que posibilitan la etiqueta limpia de número E (Figura 2).



Figura 2. Etiquetas de preparados de carne. Una de ellas indica la presencia de fibra vegetal de guisante y otra simplemente aporta la información de fibra vegetal sin indicar su procedencia.

1.2. Guisante: *Pisum sativum*

El guisante (*Pisum sativum*) es una planta herbácea de la familia de las leguminosas, propia de la cuenca mediterránea pero muy extendida en todo el mundo. Debido a su alto contenido en proteínas y su alta productividad en condiciones climáticas templadas es una de las fuentes de proteínas más eficaces para la alimentación humana y animal (Muehlbauer *et al.* 2012).

Actualmente, está considerado como un nuevo ingrediente funcional que presenta excelentes propiedades de textura tanto nutricionales como funcionales y que se puede aplicar en una gran variedad de alimentos (Chocano *et al.* 2002).

La proteína del guisante posee una alta solubilidad y una gran capacidad emulsionante y de formación de espuma para la textura y estabilidad deseadas, lo que posibilita su empleo en productos cárnicos. En este sector se ha aplicado principalmente en

empanadas, hamburguesas, salchichas y patés (Baticz 2001; Besbes *et al.* 2008; Saarela *et al.* 2011).

Sin embargo, el uso del guisante en productos alimenticios puede ser restringido considerablemente por su alergenicidad, que se ha atribuido principalmente a las proteínas vicilina y convicilina (Sanchez-Monge *et al.* 2004; Abrams *et al.* 2015). Las reacciones alérgicas a la familia de las leguminosas son comunes pero su prevalencia varía según la ubicación y el tipo de leguminosa (Verma *et al.* 2013). En España, donde las legumbres se consumen con frecuencia se observó que son la quinta causa más común de alergia alimentaria en niños pequeños (Martínez *et al.* 2008).

1.3. Zanahoria: *Daucus carota*

Otro aditivo natural utilizado en la industria alimentaria es la zanahoria (*Daucus carota*). Se trata de una hortaliza perteneciente a la familia de las apiáceas y considerada la especie más importante y de mayor consumo dentro de esta familia. A pesar de no destacar en la biografía como agente humectante sí existe una amplia información sobre su uso como aditivo en la industria cárnica. Entre sus usos principales destaca su importante condición de colorante, ya que los betacarotenos además de pigmentar son un poderoso antioxidante (Badr *et al.* 2011). Son un compuesto perteneciente al grupo de los carotenoides y se aislaron por primera vez en la zanahoria de donde deriva su nombre (Gallego 2007; Serena 2014).

Además de ser una fuente potencial de fibra para productos cárnicos también lo es de nitritos y nitratos (Zepeda *et al.* 2009). En la industria cárnica el ingrediente principal de los productos cárnicos curados es el nitrito, por lo que el uso de la zanahoria permite a los productores generar productos cárnicos curados con las mismas características sensoriales, sin adicionar nitritos sintéticos (Lugo 2008; Ángel *et al.* 2011; Montiel-Flores *et al.* 2013).

Su uso en la industria alimentaria con fines fraudulentos también supone un problema de seguridad alimentaria debido a su alergenicidad. Los vegetales pertenecientes a la familia *Apiaceae* son causa frecuente de alergias (Santiago *et al.* 2004). La investigación hasta ahora se ha centrado principalmente en el apio (*Apium graveolens*) pero la zanahoria también es un importante alimento alergénico ya que hasta un 25% de

los sujetos con alergia alimentaria en Europa central tienen alergia a la zanahoria (Ballmer-Weber *et al.* 2001; Pafundo *et al.* 2011).

1.4. Técnicas analíticas para la detección de adulteraciones en productos cárnicos

Actualmente existe una gran variedad de técnicas analíticas para la identificación de adulteraciones en carne fresca y procesada, las más usadas son las inmunológicas, electroforéticas y las cromatográficas. El problema de las técnicas electroforéticas e inmunológicas está en la dificultad de detectar especies en productos cárnicos procesados térmicamente ya que la mayoría de las proteínas se desnaturalizan a causa de las altas temperaturas. Esto provoca cambios en la movilidad electroforética y antigenicidad de las mismas con una interpretación equívoca de los resultados. Otra de las principales desventajas de los inmunoensayos como técnicas de análisis es que su precisión puede verse afectada cuando se analizan alimentos procesados, ya que estos son matrices complejas de proteínas y otros componentes. Algunas sustancias presentes en estas matrices son capaces de inhibir las interacciones específicas entre el antígeno y el anticuerpo (Hernández-Chávez *et al.* 2007).

Las técnicas moleculares son consideradas metodologías novedosas para la detección de la adulteración en productos cárnicos procesados. Consisten en el estudio de secuencias específicas de ADN de cada especie, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La principal ventaja de utilizar estas técnicas analíticas basadas en la identificación de ADN es que esta molécula se encuentra en todo tipo de células de un mismo individuo y contiene la misma información genética sin importar el origen de la muestra. La información contenida en el ADN es mayor que la contenida en las proteínas, debido a que esta molécula es termoestable y por tanto menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos. Además, aunque esté degradado parcialmente permite detectar diferencias.

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos, pues permite detectar ADN a partir de pequeñas cantidades y combina amplificación y detección en un mismo paso. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior (Aguilera *et al.*, 2010).

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes o sondas específicas marcadas con fluorocromos (Costa, 2004). Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en RT-PCR es el SYBR Green. Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Sin embargo, presenta varias desventajas, ya que no es posible hacer reacciones *multiplex* (amplificación de varios genes en la misma reacción) y tampoco emite una señal específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN (Lutfalla *et al.*, 2006).

En cambio, las sondas específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas *TaqMan*, las sondas *molecular beacons* y las sondas *scorpions* (Valasek *et al.*, 2005; Somma *et al.* 2007).

La mayoría de estas sondas usan el fenómeno FRET (*fluorescent resonance energy transfer*) que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos que emiten fluorescencia a diferente longitud de onda: un donador (*reported*) y un aceptor (*quencher*). Algunos ejemplos de fluoróforos *reported* son 6-FAM, VIC y NED y entre los *quencher* se encuentran TAMRA, DABCYL y BHQ (Valasek *et al.*, 2005; Aguilera *et al.*, 2010).

Durante la amplificación por la RT-PCR, la sonda adicionada genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de amplificación por la PCR se divide en cuatro fases: inicial, exponencial, lineal y estacionaria (Figura 3). Durante la fase inicial, entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal. Sin embargo, esta fase sirve para delimitar la línea base. En la fase exponencial, los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la PCR tiene una eficiencia cercana al 100%. La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. Y por último, la fase estacionaria muestra una señal saturada donde la amplificación se detiene debido a que los componentes de la reacción se

agotaron. La cantidad de producto obtenida en ésta es constante aunque se incremente el número de ciclos (Rodríguez-Lázaro 2013).

En la Figura 3 también se muestra el ciclo umbral (C_t), el cual equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance el umbral en la señal de fluorescencia. La comparación de los C_t entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas de ADN específico que se desea evaluar, ya que a mayor cantidad de ADN de interés haya en la muestra, menor será el número de ciclos que se requiere para alcanzar este umbral. Es importante establecer un C_t máximo a partir del cual se considera que la amplificación es negativa.

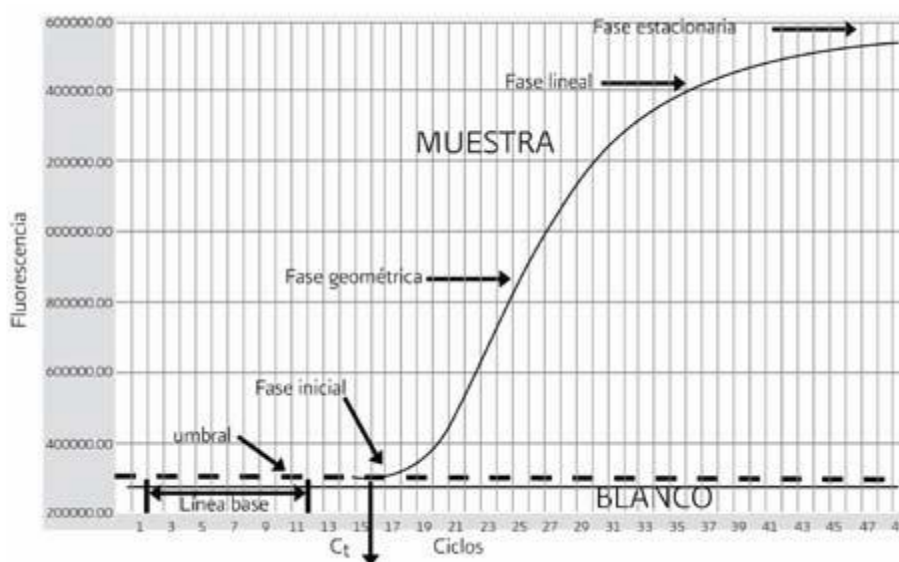


Figura 3. Cinética de amplificación de la RT-PCR (Aguilera *et al.* 2010).

1.5. Referencias bibliográficas sobre la detección de guisante y zanahoria

La mayoría de los estudios publicados sobre detección de especies de vegetales se llevan a cabo mediante PCR, en concreto a tiempo real (RT-PCR) ya que permite la cuantificación y es un método rápido y sensible (Espiñeira *et al.* 2009; López-Calleja *et al.* 2015; Luber *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2015; Garino *et al.* 2016).

En relación a la detección del guisante, Brezna *et al.* (2006) publicaron un método para la detección cualitativa o semicuantitativa del mismo en productos alimenticios

mediante RT-PCR, dicho método está basado en un gen del cloroplasto con un alto número de copias. Consiste en el aislamiento de ADN mediante extracción en fase sólida caotrópica y la posterior PCR con cebadores específicos de guisante y una sonda TaqMan fluorescente. Los cebadores y la sonda se orientan hacia la región intergénica del cloroplasto situada entre los exones *trnL* y *trnF* que codifican para ARNt.

Las siete muestras de guisantes que amplificaron para este ensayo dieron resultados positivos, mientras que en las muestras de los demás vegetales no se observó amplificación o su ciclo umbral fue superior a 29 ciclos ($C_t > 29$). Atribuyeron estas amplificaciones ($C_t > 29$) a la presencia de una diana parcialmente homóloga en estas muestras, lo cual podrían haber evitado mediante un aumento de la temperatura de anillamiento. Finalmente, Brezna *et al.* (2006) consideraron fiable un $C_t = 29$ y aquellas amplificaciones producidas a un $C_t < 29$ serían tratadas como positivas.

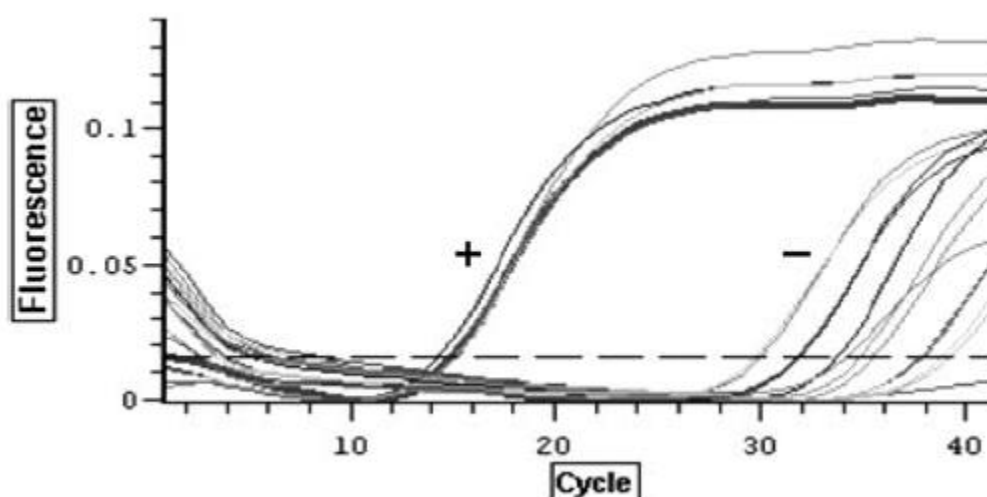


Figura 4. Imagen del trabajo de Brezna *et al.* (2006). En ella podemos observar el resultado de la RT-PCR de guisante y otros vegetales. Nos muestra la diferencia entre los resultados positivos de las muestras de guisante (+) y los resultados negativos de los demás vegetales (-) a partir del ciclo 29.

Dos años después de esta publicación, Ramos-Gómez *et al.* (2008) comprobaron la especificidad de este sistema y encontraron amplificaciones inespecíficas en el ciclo 29 tal y como se había adelantado en el trabajo publicado. El método amplificaba inespecíficamente ADN de algarroba (*Vicia articulata*), por lo tanto, aunque es un

método rápido y sensible no es 100% específico de guisante. Además, al estar basado en un gen con un alto número de copias no se aconseja para la cuantificación ya que el número de copias puede que no sea estable dentro de las diferentes variedades. Por tanto, proponen otro método de RT-PCR con sonda TaqMan para la detección y cuantificación del guisante basado en la amplificación de una región específica del gen *legS* (Ramos-Gómez *et al.* 2008). Este gen codifica para una subunidad de la proteína legumina. Esta proteína hexamérica es una de las principales proteínas del guisante de almacenamiento y fuente de aminoácidos de azufre, codificada por un mínimo de 11 genes. Entre esos genes, *legS* es un buen candidato para desarrollar cebadores específicos para guisante, ya que se ha comprobado que es específico de cada especie y se conserva entre género.

Este método se llevó a cabo con 51 variedades de *Pisum* spp., y otras especies de plantas y variedades taxonómicas. Les permitió la rápida detección y cuantificación de ADN de guisante en muestras de alimentos y piensos procesados demostrando ser sensible, reproducible y 100% específico.

En relación con la zanahoria, uno de los últimos estudios publicados fue el desarrollado por Pafundo *et al.* (2011). Llevaron a cabo dos técnicas para su detección en productos procesados: PCR Duplex y RT-PCR con SYBR Green.

Desarrollaron una PCR con SYBR Green con cebadores específicos de zanahoria (*Dau c1*) que les ayudó a reducir el tiempo de ejecución y costes necesarios para llevar a cabo cada análisis. Por otro lado, la PCR Duplex, donde combinaron cebadores específicos del gen diana de la zanahoria, *Dau c1*, junto cebadores universales. Estos cebadores amplifican un fragmento conservado del gen nuclear ARNr 18S en el ADN de los organismos eucariotas. De esta forma, el gen ARN ribosomal 18S actúa como control interno ayudando a reducir la tasa de falsos negativos.

2. OBJETIVOS

A partir de estos métodos publicados hasta el momento sobre la detección de zanahoria y guisante, determinaremos si son adecuados para esta finalidad, así como su posible aplicación como método de detección de adulteraciones de la industria cárnica que permitirá garantizar la calidad y la transparencia de los productos cárnicos que alcanzan el mercado.

Para llevar a cabo la detección de guisante se seleccionó la metodología publicada por Ramos-Gómez *et al.* (2008). Por otro lado, para zanahoria se seleccionó el método descrito por Pafundo *et al.*, (2011) en el que se optó por modificar previamente su metodología antes de llevar a cabo la parte experimental del trabajo. En lugar de utilizar el fluoróforo SYBR Green se diseñó una sonda Taqman específica para el desarrollo de la técnica y por consiguiente se modificaron las condiciones de RT-PCR.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Detección de zanahoria

3.1.1. ADN

La parte experimental de este trabajo tuvo su origen en las extracciones de ADN de zanahoria suministradas por ANFACO-CECOPECA, que se encontraban almacenadas a -20°C y estandarizadas en torno a los 100 ng/μl. Su concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza mediante el ratio de absorbancias A_{260}/A_{280} , lo cual se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDropTM 1000 de Thermo Scientific.

3.1.2. Cebadores

Los cebadores utilizados se seleccionaron de una forma determinada para la amplificación de la secuencia específica del gen diana: gen *Dau c1* (Tabla 1).

Especie	Gen	Tamaño	Secuencia de los cebadores	Bibliografía
<i>D. carota</i>	<i>Dau c1</i>	81 pb	F: CCA GAGC CAT TCA CTC GAG ATC R: ACT GTA TCA ACA TCA AGG ACA ATG C	Pafundo <i>et al.</i> , 2011

Tabla 1. Cebadores y gen diana utilizados para la detección de zanahoria

3.1.3. Sonda

Para llevar a cabo su ensayo, Pafundo *et al.*, (2011) utilizaron el fluorocromo SYBR Green. Como ya se ha comentado, se trata de un sistema más económico pero presenta varias desventajas. Por tanto, el personal de ANFACO-CECOPECA diseñó una sonda Taqman específica para el desarrollo de una RT-PCR para detectar zanahoria. Su diseño partió de la secuencia del gen *Dau C1* obtenida con los cebadores descritos anteriormente (Tabla 1). Es por ello que la secuencia interna de la sonda no está reflejada en este trabajo, puesto que será publicada posteriormente en un artículo de

investigación si da lugar. La sonda se marcó con dos tipos de fluorocromos: 6-FAM en el extremo 5' (reported) y TAMRA en el extremo 3' (quencher).

3.1.4. Taq polimerasa

Para la amplificación se ha utilizado la polimerasa GoTaq® Probe qPCR Master Mix de Promega. Según las instrucciones facilitadas por el fabricante se han seleccionado las condiciones que permiten un termociclado rápido (Tabla 2).

Activación GoTaq®	1 CICLO	2 minutos a 95°C
Desnaturalización	40 CICLOS	3 segundos a 95°C
Anillamiento/Extensión		30 segundos a 60°C

Tabla 2. Condiciones de termociclado rápido.

3.1.5. Validación de las condiciones de RT-PCR

En todos los casos, las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un volumen de reacción total de 20 µL con 200 ng de ADN, 1x de GoTaq®, 0.5 µM del cebador directo, 0.375 µM del cebador inverso y 0.25 µM de la sonda TaqMan diseñada (Tabla 3).

En cada RT-PCR, además de amplificar el ADN muestra, también se incluye un control negativo y un blanco de reactivos. El control negativo indica que no existe contaminación en el volumen de reacción evitando así los falsos positivos y el blanco de reactivos certifica que ésta no se produjo a lo largo del proceso de extracción del ADN.

Finalmente, se utilizó agua de grado molecular (Promega) para ajustar el volumen final. Las reacciones se realizaron en micro placas de PCR de 96 pocillos (Axygen) y el termociclador utilizado fue Viia 7 de Applied Biosystems.

RT-PCR Zanahoria	V (μL)
Agua	5.75
GoTaq® Probe qPCR Master Mix (2X)	10
Sonda TaqMan (10μM)	0.5
Cebador F (10μM)	0.75
Cebador R (10μM)	1
V total (μL)	18

ADN	2
V total (μL)	20

Tabla 3. Condiciones RT-PCR

3.1.6. RT-PCR para comprobar la especificidad del método

Con el fin de comprobar la especificidad del método se llevaron a cabo dos RT-PCR, la primera con ADN de diferentes vegetales y una segunda con peces y animales terrestres (Tabla 4). De esta forma aseguramos que tanto los cebadores como la polimerasa solo amplifican ADN de zanahoria. Las condiciones de PCR aplicadas fueron las mismas que las que figuran en la Tabla 3 pero en las condiciones de termociclado se probaron diferentes temperaturas de anillamiento (T_a). Es importante tener en cuenta que una T_a demasiado baja puede llevar a eventos de inespecificidad de los cebadores utilizados de tal manera que lleguen a ser anillados en secuencias diferentes a la que queremos amplificar. Por otra parte, una T_a demasiado alta puede llevar a que el rendimiento de la amplificación sea muy bajo ya que se reduce la probabilidad de anillamiento (Rychlik *et al.*, 1990).

Se realizaron varios ensayos donde la temperatura varió entre los 60°C y los 67°C hasta encontrar la temperatura óptima de anillamiento para asegurar una alta especificidad en el método desarrollado.

Nombre común	Especie
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>
Acelga	<i>Beta vulgaris</i>
Ajo	<i>Allium sativum</i>
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>
Brocoli	<i>Brassica oleracea italica</i>
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>
Coles de Bruselas	<i>Brassica oleracea var. gemmifera</i>
Endibia	<i>Cichorium endivia</i>
Espárragos	<i>Asparagus officinalis</i>
Estragón	<i>Artemisia dracunculus</i>
Rabanitos	<i>Raphanus sativus</i>
Guisante	<i>Pisum sativum</i>
Hierba buena	<i>Mentha spicata</i>
Judías	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Menta	<i>Mentha piperita</i>
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>
Pimiento	<i>Capsicum annum</i>
Puerro	<i>Allium ampeloprasum var. porrum</i>
Repollo	<i>Brassica oleracea var. capitata</i>
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>
Cabra	<i>Capra aegagrus</i>
Oveja	<i>Ovis orientalis</i>
Vaca	<i>Bos taurus</i>
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>
Potro	<i>Equus caballus</i>
Pavo	<i>Meleagris gallopavo</i>
Melva	<i>Auxis thazard</i>
Carite estriado	<i>Scomberomorus commerson</i>
Jurel	<i>Decapterus macrosoma</i>
Bonito Atlántico	<i>Sarda Sarda</i>
Caballa	<i>Scomber japonicus</i>
Bacoreta oriental	<i>Euthymus affinis</i>

Tabla 4. Diferentes especies de vegetales, peces y animales terrestres amplificadas en la RT-PCR.

3.1.7. RT-PCR para comprobar la sensibilidad del método

La sensibilidad del método (o límite de detección, LOD) es la cantidad mínima de ADN necesaria para producir una señal de fluorescencia positiva. Se estableció mediante diluciones de ADN. El intervalo de concentraciones se obtuvo a partir de ADN de zanahoria con concentraciones que oscilaban entre los 40 ng y 0.1 pg. Las diluciones seriadas se prepararon mediante la adición de agua de grado molecular (Promega).

3.2. Detección de guisante

Ajustándonos al tiempo establecido para realizar este trabajo no se ha podido desarrollar la validación de la metodología para la detección de guisante. El método seleccionado para la amplificación de guisante sería el descrito por Ramos-Gómez *et al.* (2008). Partiendo de su trabajo se modificaría la técnica cambiando el fluoróforo *reporter* 6-FAM por VIC, para estudiar la posibilidad de hacer una RT-PCR multiplex de guisante y zanahoria.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Detección de zanahoria

4.1.1. Validación de las condiciones de RT-PCR

Utilizando las condiciones establecidas en la Tabla 3 y las indicaciones facilitadas por el fabricante de la polimerasa utilizada (GoTaq® ProbeqPCR Master Mix de Promega), observamos la amplificación positiva de la extracción de ADN de zanahoria en 200 ng/ μ l (Figura 5). Esto determina que los cebadores y la sonda son capaces de amplificar el gen de zanahoria seleccionado de manera eficiente.

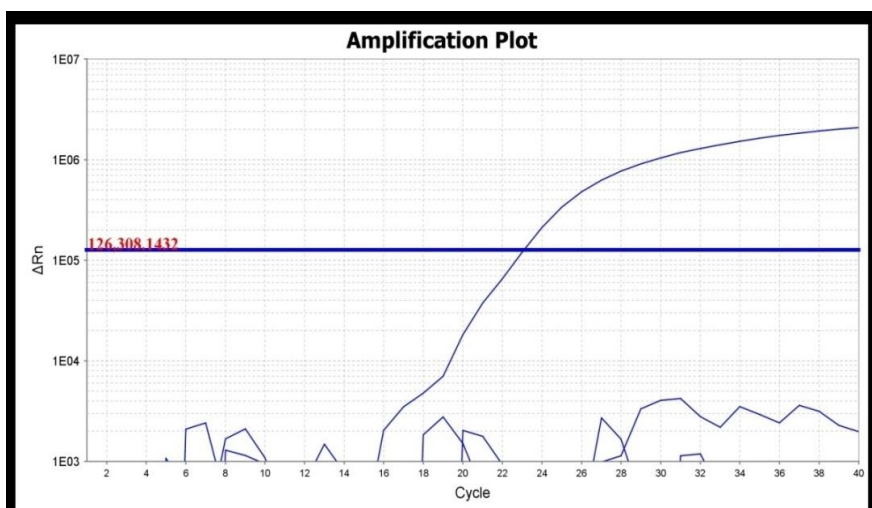


Figura 5. Visualización de la amplificación obtenida en la RT-PCR de zanahoria. Se observa la curva exponencial de emisión de fluorescencia para 200 ng/ μ l de ADN de zanahoria.

4.1.2. Especificidad del método

Mediante las amplificaciones observadas en la RT-PCR de zanahoria junto con otros vegetales podremos comprobar la especificidad del método. Mediante el gráfico (Figura 6) observamos cómo los cebadores y la sonda con una temperatura de anillamiento de 60°C además de amplificar ADN de zanahoria también amplifican inespecíficamente siete vegetales: coles de bruselas, endibia, estragón, judías, menta, pepino y romero.

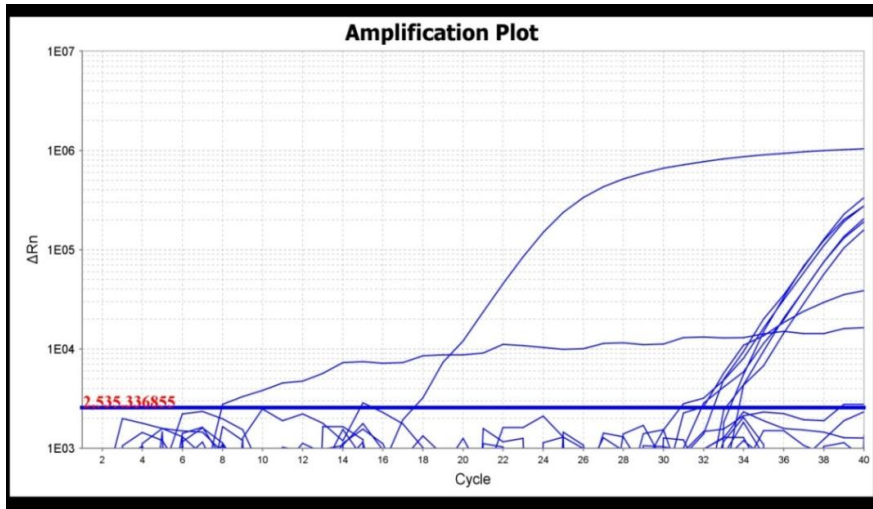


Figura 6. Visualización de la amplificación obtenida en la RT-PCR de vegetales. Se observa la curva exponencial de emisión de fluorescencia en la zanahoria con un ciclo umbral positivo y las amplificaciones inespecíficas de los demás vegetales.

Con el fin de evitar estas amplificaciones inespecíficas se realizaron cinco RT-PCR a diferentes temperaturas de anillamiento (Figura 7). En las figuras se observa cómo hasta los 65°C los vegetales endibia y coles de bruselas siguen amplificando.

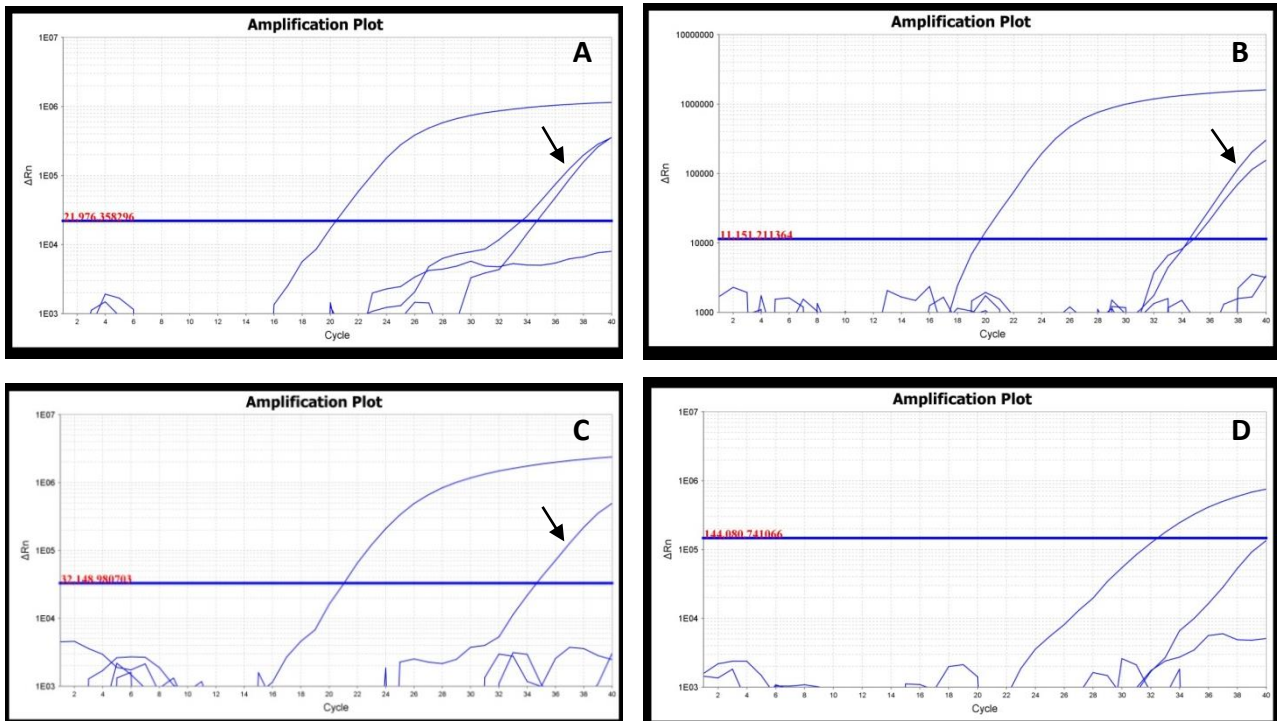


Figura 7. Visualización de las amplificaciones a una temperatura de anillamiento de 63°C (A) 64°C (B) 65°C (C) y 67°C (D) obtenida en la RT-PCR de vegetales. Podemos observar indicadas con una flecha las amplificaciones inespecíficas de endibia y coles de bruselas en las figuras A, B y C. A 67°C (D) ya no se observan amplificaciones inespecíficas pero el ciclo umbral de zanahoria para una concentración de 200 ng/μl es muy alto.

Finalmente, modificando la temperatura de anillamiento a 66°C ya no se observan amplificaciones inespecíficas y el control positivo de ADN de zanahoria muestra un ciclo umbral óptimo (Figura 8).

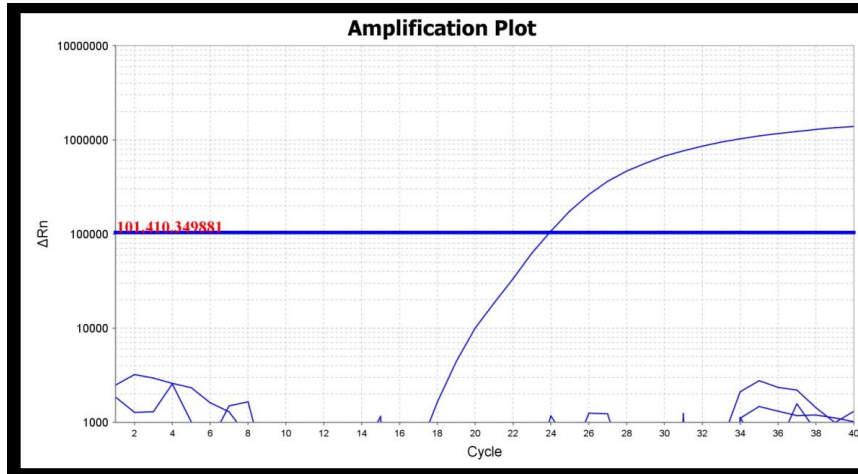


Figura 8. Visualización de la amplificación obtenida en la RT-PCR de zanahoria a 66°C. Se observa la curva exponencial de emisión de fluorescencia de la amplificación positiva de zanahoria.

El resultado del ensayo de especificidad con carnes y pescados también resultó positivo ya que no se observa ningún tipo de reactividad cruzada con ninguna de las muestras testadas. De esta manera comprobamos que la temperatura de anillamiento a 66°C es la óptima y nos asegura una mayor especificidad de la metodología desarrollada.

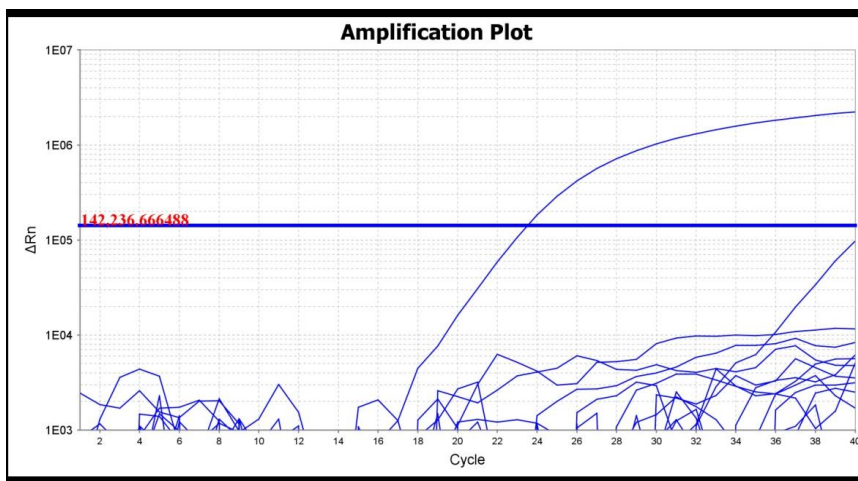


Figura 9. Visualización de la amplificación obtenida en la RT-PCR de zanahoria con carnes y pescados. Se observa la curva exponencial de emisión de fluorescencia del control positivo de zanahoria con un ciclo umbral óptimo.

4.1.3. Sensibilidad del método

El límite de detección (LOD) para extracciones de ADN de zanahoria en RT-PCR es de 64 pg (Figura 10).

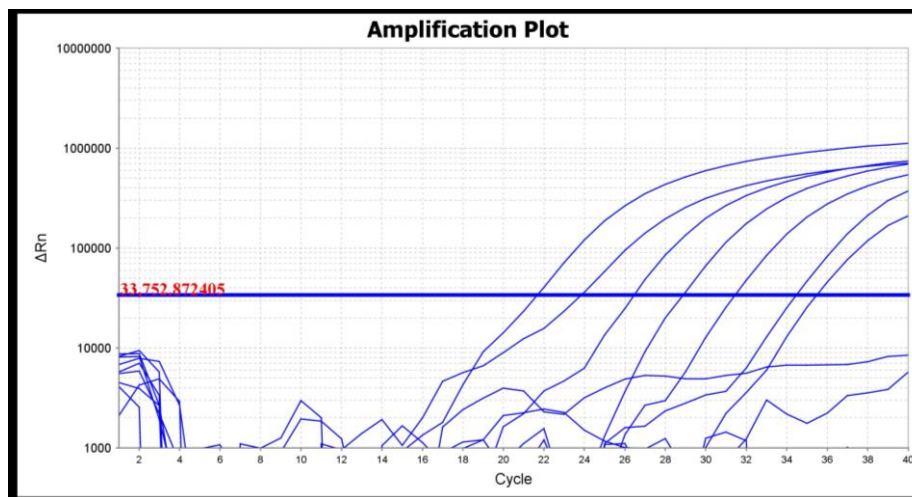


Figura 10. Visualización del ensayo de RT-PCR para establecer el límite de detección de ADN.

En este caso, un parámetro importante que refleja la especificidad y la sensibilidad de esta metodología es el ciclo umbral (C_t). Es necesario encontrar el valor más bajo de C_t que permita el mantenimiento de niveles elevados de fluorescencia junto con LOD más bajos posibles. En todos los casos, los valores positivos varían entre 21 y 38.

Pafundo et al. (2011) establecieron en su ensayo un LOD de 1 mg/kg por lo que modificando la metodología se ha conseguido que la técnica sea más sensible.

4.2. Detección de guisante

No se han obtenido resultados puesto que no se ha desarrollado la metodología para la detección de guisante por RT-PCR.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Actualmente, aunque no existen referencias bibliográficas claras sobre el uso de zanahoria y guisante como aditivos humectantes, sí son varios los estudios publicados acerca de sus propiedades funcionales al ser añadidos en productos cárnicos procesados, y su abundante uso con otros fines en la industria alimentaria.

Los agentes humectantes se encuentran dentro de un grupo de gran importancia ya que estabilizan el aspecto y las características físicas de los alimentos. Esto puede emplearse de forma fraudulenta ya que mediante la retención de agua alargamos la vida comercial del producto y se provoca un aumento en el peso del mismo.

La RT-PCR es una técnica muy sensible para la detección de ácidos nucleicos y la publicación de los trabajos de Ramos-Gómez *et al.* (2008) y Pafundo *et al.* (2011) ha sido un punto clave para seguir desarrollando este trabajo.

Los resultados de las evaluaciones de especificidad y sensibilidad de la metodología desarrollada indican que la RT-PCR es una buena alternativa para la detección de zanahoria. Además de mostrar valores más bajos de LOD con respecto al método publicado por Pafundo *et al.* (2011), es altamente específica, ya que este parámetro es directamente proporcional a la especificidad del conjunto de cebadores y de la sonda. Los resultados de este estudio han demostrado que los cebadores y la sonda desarrollada son capaces de amplificar el gen *Dau c1* de manera eficiente usando un detector de fluorescencia a tiempo real.

Por otra parte, si se modifica la temperatura de anillamiento a 66⁰C con la aplicación del método de RT-PCR con diferentes muestras de vegetales, pescados y animales terrestres, se demuestra la especificidad de la técnica. Se trata de un ensayo rápido puesto que todo el procedimiento puede ser completado en 3 h.

El método desarrollado es específico de especie por lo que sería útil en la detección de trazas de zanahoria en alimentos procesados. Por supuesto, la aplicación de estos resultados a nivel industrial requiere de más estudios y de la necesidad de realizar un trabajo más completo para detectar proteína de zanahoria en productos cárnicos procesados y observar el porcentaje de uso de esta proteína en la industria alimentaria.

En conclusión, este trabajo describe una pequeña búsqueda bibliográfica sobre nuevos aditivos humectantes en la industria cárnica y el desarrollo y validación de un método de RT-PCR enfocado para detectar proteína de zanahoria en una amplia gama de productos cárnicos. Constituye una herramienta rápida, sensible y fiable con el objetivo de garantizar el cumplimiento de las normas de etiquetado y seguridad para proteger los derechos de los consumidores.

Sería interesante en un futuro poder continuar con este ensayo para realizar el mismo proceso con guisante. El tiempo establecido para llevar a cabo este trabajo sólo ha permitido validar la especificidad y sensibilidad de la metodología para la detección de zanahoria.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, E. M., Gerstner, T. V. (2015). *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 11:10.
- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Munive, M. G. R., Olvera, B. P., Cárdenas, M. E. C. (2010). PCR en tiempo real.
- Ángel, Z. C., Molina, D. A. R., Rodríguez, M. C. (2011). Revisión: Productos Vegetales como Fuente de Fibra Dietaria en la Industria de Alimentos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 64(1), 6023-6035.
- Badr, H. M., Mahmoud, K. A. (2011). Antioxidant activity of carrot juice in gamma irradiated beef sausage during refrigerated and frozen storage. *Food chemistry*, 127(3), 1119-1130.
- Barros, C. (2009). Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso. Editorial Visión Libros.
- Ballmer-Weber, B. K., Wüthrich, B., Wangorsch, A., Fötisch, K., Altmann, F., Vieths, S. (2001). Carrot allergy: double-blinded, placebo-controlled food challenge and identification of allergens. *Journal of allergy and clinical immunology*, 108(2), 301-307.
- Baticz, O. (2001). Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung/Food*, 45(6), 399-401.
- Belloque, J., García, M. C., Torre, M., Marina, M. L. (2002). Analysis of soyabean proteins in meat products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(5), 507-532.
- Besbes, S., Attia, H., Deroanne, C., Makni, S., Blecker, C. (2008). Partial replacement of meat by pea fiber and wheat fiber: effect on the chemical composition, cooking characteristics and sensory properties of beef burgers. *Journal of Food Quality*, 31(4), 480-489.
- Brežná, B., Hudecová, L., Kuchta, T. (2006). Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *European Food Research and Technology*, 222(5-6), 600-603.
- Carrión, J. F. S. (2013). Uso de aditivos naturales en la industria alimentaria. Monografía presentada para optar al título profesional de ingeniero en industrias alimentarias. Facultad de Ingeniería Agraria e Industrias Alimentarias y Ambiental. Perú.
- Chocano, A. (2002). Recopilación Tecnológica de Agentes de textura y sus aplicaciones. Extraído el, 15, 3-7.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(5), 299-305.
- Dias-Salman, A. K., Fernanda-Giachetto, P., Malago Jr, W. (2009). Real time PCR: the new age of cellular genetic information. *REDVET*, 10(2).

Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de marzo de 2000, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios (DOUE núm. L 354, 31 de Diciembre de 2000, pág 34).

Directiva 89/107/CEE, del Consejo, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios al consumo humano (DOUE núm. 9 L 40, 11 de febrero de 1989, pág 27)

Durán, L. (2001). Aditivos naturales. *Arbor*, 168(661), 87-107.

Espinoza, T., Mesa, F. R., Valencia, E., Quevedo, R. (2015). Types of fraud in meat and meat products: a review. *Scientia Agropecuaria*, 6(3), 223-233.

Espiñeira, M., Herrero, B., Vieites, J. M., Santaclara, F. J. (2010). Validation of end-point and real-time PCR methods for the rapid detection of soy allergen in processed products. *Food Additives and Contaminants*, 27(4), 426-432.

Esteban, M. M., Navarro, A. A., Canales, E. T. (2007). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre alergias alimentarias. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, (5), 19-76.

Freixanet, L. (2010). Aditivos e ingredientes en la fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero. En: *Metalquimia SA Artículos tecnológicos*. Editado por Metalquimia SA Gerona, España.

Gallego, M. R. (2007). Substitution of colorants in food. *Revista Lasallista de Investigación*, 4(1), 35-39.

García Jiménez, J. L., Alandí Palanca, M., Bergliter García, D., Hernández de Luján, S. (2008). Aditivos alimentarios. *Distribución y consumo*, (102), 80-86.

Garino, C., De Paolis, A., Coïsson, J. D., Bianchi, D. M., Decastelli, L., Arlorio, M. (2016). Sensitive and specific detection of pine nut (*Pinus spp.*) by real-time PCR in complex food products. *Food chemistry*, 194, 980-985.

Gutiérrez, J. B. (2000). *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.

Hernández-Chávez, J. F., Fernández-Cordova, A. F., Torrescano, G. R., Escalante, A. S., Arriola, J. P. C., Vallejo-Cordoba, B. (2007). Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados térmicamente. *Nacameh*, 1(1), 97.

Hoogenkamp, H. W. (2005). *Soy protein and formulated meat products*. CABI.

Ibáñez, F., Torre, P., Irigoyen, A. (2003). *Aditivos alimentarios*. Área de Nutrición y Bromatología, Universidad Pública de Navarra.

- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., Martín, R., González, I., García, T. (2015). Duplex real-time PCR method for the detection of sesame (*Sesamum indicum*) and flaxseed (*Linum usitatissimum*) DNA in processed food products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(11), 1772-1785.
- Luber, F., Demmel, A., Pankofer, K., Busch, U., Engel, K. H. (2015). Simultaneous quantification of the food allergens soy bean, celery, white mustard and brown mustard via combination of tetraplex real-time PCR and standard addition. *Food Control*, 47, 246-253.
- Lugo, E. B. (2008). Nitritos y Nitratos: Su uso, control y alternativas en embutidos cárnicos. *Nacameh*, 2(2), 160-187.
- Lutfalla, G., Uze, G. (2006). Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments. *Methods in enzymology*, 410, 386-400.
- Martínez San Ireneo, M., Ibáñez, M. D., Fernández-Caldas, E., Carnés, J. (2008). In vitro and in vivo cross-reactivity studies of legume allergy in a Mediterranean population. *International archives of allergy and immunology*, 147(3), 222-230.
- Montiel-Flores, E. E., López-Malo, A., Bárcenas-Pozos, M. E. (2013) Vegetales como fuentes de nitritos: una alternativa para el curado de carnes. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 57-67.
- Muehlbauer, F. J., Kaiser, W. J. (Eds.). (2012). Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes: A global perspective of persistent constraints and of opportunities and strategies for further increasing the productivity and use of pea, lentil, faba bean, chickpea and grasspea in different farming systems (Vol. 19). Springer Science & Business Media.
- Pafundo, S., Gullì, M., Marmioli, N. (2011). Comparison of DNA extraction methods and development of duplex PCR and real-time PCR to detect tomato, carrot, and celery in food. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(19), 10414-10424.
- Pearson, A. M. (Ed.). (2012). Processed meats. Springer.
- Poms, R. E., Klein, C. L., Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food additives and contaminants*, 21(1), 1-31.
- Ramos-Gómez, S., López-Enríquez, L., Caminero, C., Hernández, M. (2008). Pea detection in food and feed samples by a real-time PCR method based on a specific legumin gene that allows diversity analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(23), 11098-11104.
- Real Decreto 3177/1983, de la Presidencia del Gobierno, de 16 de noviembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de aditivos alimentarios ("BOE" núm. 310 de 28 de Diciembre de 1983, págs. 34.692 a 34.696).

Rebollar, M. C. (1991). Aditivos alimentarios: propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud: una guía para el consumidor. Mira Editores.

Reglamento (UE) n° 601/2014 de la Comisión, de 4 de junio de 2014, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a las categorías de carnes y a la utilización de aditivos alimentarios en preparados de carne (DOUE núm. 166 de 5 de Junio de 2014, págs. 11-21).

Rodríguez-Lázaro, D. (Ed.). (2013). Real-time PCR in food science: current technology and applications. Horizon Scientific Press.

Rychlik, W. J. S. W., Spencer, W. J., Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409-6412.

Saarela, M. (Ed.). (2011). Functional foods: Concept to product. Elsevier.

Sanchez-Monge, R., Lopez-Torrejón, G., Pascual, C. Y., Varela, J., Martin-Esteban, M., Salcedo, G. (2004). Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(11), 1747-1753.

Santiago, A.L.V., Reyes, C.S. (2004). Alergia alimentaria. *Actividad Dietética*, 21.

Serena, N. C. P. (2014). Papel de los carotenoides en la industria alimentaria. Monografía presentada a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Veracruzana. Xalapa.

Somma, M., Querci, M. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Extracción y purificación de ADN. European Commission JRC.

Valasek, M. A., Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151-159.

Vera, N. G. (2007). Utilización de los derivados de cereales y leguminosas en la elaboración de productos cárnicos. *Nacameh*, 1(1), 110-117.

Verma, A. K., Kumar, S., Das, M., Dwivedi, P. D. (2013). A comprehensive review of legume allergy. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 45(1), 30-46.

Woods, R. K., Stoney, R. M., Raven, J., Walters, E. H., Abramson, M., Thien, F. C. K. (2002). Original Communications-Reported adverse food reactions overestimate true food allergy in the community. *European journal of clinical nutrition*, 56(1), 31-36.

Yman, L., Rolfsen, W., Malmheden Yman, I. (1988). Food additives from the legume family (Leguminosae/Fabaceae): A potential allergy risk. *Allergy*, 81.

Zepeda, L. C., Méndez, G. C., de la Caza, L. G., Vela, J. D., Chabela, M. D. L. P. (2009). Utilización de subproductos agroindustriales como fuente de fibra para productos cárnicos. *Nacameh*, 3(2), 71-82.

Zhang, W. J., Cai, Q., Guan, X., Chen, Q. (2015). Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergen by Real-time PCR method with internal amplification control. *Food chemistry*, 174, 547-552.