**Evaluación *in sílico* de curvas *high resolution melting* sobre secuencias de ADN mitocondrial para determinar autenticidad de alimentos HALAL**

Gallardo J (1), Neira M (2), Vélez P (2)

(1) Unidad Alimentos - (2) Unidad Biología Molecular - Centro de Excelencia en Procesos y Productos Córdoba (CEPROCOR) - Gobierno de Córdoba. Complejo Hospitalario Santa María de Punilla, Argentina.

Jesica.Gallardo@cba.gov.ar,melanie.neira@mi.unc.edu.ar, pablosebastianvelez@gmail.com

RESUMEN

Las pruebas de autenticidad de una matriz alimentaria tienen como objetivo demostrar y documentar que un alimento o ingrediente alimentario corresponde con su descripción. Los productos especiales designados como Halal tienen sus propios desafíos de autenticidad. Se entiende por alimentos Halal a aquellos permitidos por la ley islámica, los cuales deben satisfacer los requisitos del Centro Islámico de la República Argentina según los requerimientos descritos en el Codex Alimentarius CAC/GL 24-1997. El desarrollo de técnicas basadas en el ADN demuestra la evolución de la tecnología al servicio de la prevención del fraude alimentario. Se pretende evaluar entonces la factibilidad de discriminar diferentes especies en productos alimenticios, basados en las demandas religiosas Halal, mediante la amplificación específica por PCR (*in silico*) seguido de curvas de disociación de alta resolución (*high resolution melting* - HRM) buscando diferencias mayores a 0,5 grados, a los fines de comprobar su legitimidad. Como estrategia analítica se propuso el estudio de cuatro genes del ADN mitocondrial: citocromo b, citocromo oxidasa subunidad 1, ARN ribosomal 12S y 16S. Para ello se descargaron 68 secuencias de diferentes especies en formato FASTA desde la base de datos NCBI. El análisis se enfocó en aquellas de interés regional, tomando como referencia los datos del Sistema de Información de Biodiversidad Argentina. Finalmente se trabajó con 23 secuencias de genoma parcial (17 vertebrados, 6 invertebrados) realizando alineamientos por ClustalW para definir zonas candidatas y extraer cebadores. De los genes 12S y 16S se eligieron cebadores óptimos con la herramienta web Primer3. El subgrupo de 17 especies (mamíferos, aves, anfibios y reptiles) amplificó exitosamente las 17 secuencias, usando el paquete DECIPHER de R, con eficiencias calculadas para el gen 12S entre 21,7% - 99,9%, y para el gen 16S entre 7,6% - 93,5%. De los amplicones 12S y 16S obtenidos se realizaron curvas de disociación con la herramienta web Umelt Batch, logrando separar a las 17 especies según su temperatura de disociación en 9 grupos (12S) y 6 grupos (16S), y finalmente 13 grupos combinando ambos genes. Por otro lado, se evaluó un subgrupo de 50 secuencias (genoma mitocondrial completo) presentando una amplificación exitosa en 46 y 47 de ellas (12S y 16S respectivamente), demostrando que las zonas elegidas son conservadas. En un ensayo *in vitro* las curvas de disociación dependerán de factores cómo la aparición de SNPs, grado de pureza del ADN extraído, de la complejidad de la muestra, etc. Sin embargo, la evaluación *in silico* motiva el uso de los cebadores diseñados, y si bien de las 17 secuencias no todas fueron discriminadas, el número de especies consideradas ilícitas por la ley islámica presentes en una muestra no necesariamente es grande. Los cebadores diseñados por Primer3 a partir de los alineamientos y luego corroborados por DECIPHER como amplicones válidos para 17 especies, permitieron separarlas exitosamente en 13 grupos por combinación de los genes de ARN ribosomal 12S y 16S, mediante curvas de disociación de alta resolución simuladas con Umelt Batch.

Palabras claves: HRM, Umelt, PCR, matriz alimentaria, legitimidad