RAPA Revista Argentina de Producción Animal

COMUNICACIÓN

ANÁLISIS Y TIPIFICACIÓN DE CARNE DE BÚFALO (*Bubalus bubalis*) MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN POR qPCR

Analysis and typification of Buffalo meat (Bubalus bubalis) by means of qPCR amplification

Guidi S[1,2,3*], Ambrosi V[1,2,3,4], Diaz G[1,2,4], Cadoppi A[5], Nanni M[6], Cunzolo S[1,2,3,7]

[1]Instituto Tecnología de Alimentos (ITA), CIA, INTA, Hurlingham, Argentina. [2] Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables (ICyTeSAS) INTA CONICET. [3]ESIICA, UM, Bs As, Argentina. [4]FFyB, UBA, Bs As, Argentina. [5]Fuska S.A. La Filiberta, Entre Ríos, Argentina. [6]Centro de Investigación de Agroindustria (CIA), INTA, Hurlingham, Argentina. [7]Healthy Meat. Red CYTED 119RT0568.

*E-mail de contacto: guidi.silvina@inta.gob.ar

RESUMEN

La producción de carne de búfalo es una alternativa sustentable en nuestro país, especialmente en zonas marginales (*e.g*. noreste argentino y Delta del Paraná). Nutricionalmente, presenta mayor contenido de hierro, y menor porcentaje de grasa y calorías, respecto de la vacuna. Debido a que ambas carnes se faenan, procesan y comercializan en los mismos canales, su diferenciación resulta de interés como herramienta de control de calidad y trazabilidad. Para ello, se utilizó la metodología de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*Real-time quantitative polymerase chain reaction*, qPCR), con el objetivo de analizar y diferenciar molecularmente carne vacuna y bubalina, utilizando los cebadores diseñados para la amplificación de una región conservada del gen mitocondrial subunidad I de citocromo oxidasa (COI) de *Bos taurus*. Se extrajo el material genético (ADN) de las carnes y se amplificó por qPCR con posterior análisis de la curva de disociación. Para ADN bovino se obtuvo una temperatura de desnaturalización (Tm) de 78,6 °C y un ciclo umbral (Ct) de 21,5 en contraste con la muestra bubalina con una Tm=79,9 °C y Ct=27,25. Así, utilizando los cebadores diseñados para la especie vacuna, se tipificaron ambas especies, a través de las diferencias encontradas entre las temperaturas de fusión para los productos de amplificación por qPCR de ADN bovino y bubalino, respectivamente. La metodología de qPCR desarrollada en este estudio, podría ser un antecedente fiable para el desarrollo como herramienta de trazabilidad y autenticidad, para diferenciar ambas especies cárnicas, en establecimientos de faena e industrialización que lo requieran.

Palabras clave. carne bubalina, Ácido desoxirribonucleico (ADN), genuinidad, calidad, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

ABSTRACT

Buffalo meat production is a sustainable alternative in our country, especially in marginal areas (*e.g.*, northeastern Argentina and the Paraná Delta). Nutritionally, it has a higher iron content and a lower percentage of fat and calories than beef. Since both meats are slaughtered, processed, and marketed through the same channels, their differentiation is of interest as a tool for quality control and traceability. To this end, the real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) methodology was used to analyze and molecularly differentiate beef and buffalo meat, using primers designed to amplify a conserved region of the mitochondrial gene of cytochrome oxidase subunit I (COI) of *Bos taurus*. Genetic material (DNA) was extracted from the meat samples and amplified by qPCR with subsequent analysis of the dissociation curve. For bovine DNA, a denaturation temperature (Tm) of 78.6 °C and a threshold cycle (Ct) of 21.5 were obtained, in contrast to the buffalo sample with a Tm=79.9 °C and Ct=27.25. Thus, using primers designed for bovine species, both species were successfully typed based on the differences found between the melting temperatures for the qPCR amplification products of bovine and buffalo DNA, respectively. Therefore, the qPCR methodology developed in this study could be a reliable basis for the development of a traceability and authenticity tool to differentiate between both meat species in slaughterhouses and industrial processing plants that require it.

Key words. bufalo meat, deoxyribonucleic acid (DNA), genuineness, quality, real-time polymerase chain reaction

Recibido: mayo 2025
Aceptado: octubre 2025

Introducción

La carne es una de las principales fuentes de nutrientes en la alimentación humana por su aporte de proteínas de alto valor biológico. A escala mundial, se prevé que la demanda de proteínas de origen animal se duplique para el año 2050, que se traducirá en un mayor consumo de carne (FAO 2019). En los últimos años, debido al contexto de la producción agropecuaria, la diversificación de especies destinadas al consumo humano ha cobrado una importancia creciente. Es así como los consumidores han presentado mayor interés en fuentes alternativas a la carne vacuna, porcina y aviar, como ser de avestruz, buey de Kobe, búfalo, etc., tanto para el consumo a nivel nacional como internacional (Vanegas Azuero y Gutiérrez 2017; Huerta Leidenz y Moreno 2025).

Según diversas evaluaciones de las características clave del riesgo cardiovascular, el consumo de carne de *Bubalus bubalis*, conocida comúnmente como búfalo, parece estar asociado con diversos efectos beneficiosos en el perfil de riesgo cardiovascular, incluyendo una menor carga aterosclerótica en las carótidas y una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo (Giordano *et al.* 2010). Por estas razones, la carne y los productos cárnicos de búfalo son prometedores y están en aumento en los mercados internacionales de alimentos (por ejemplo, en muchas regiones como Asia, el sur de Europa, Sudamérica y el norte de África), según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2017).

En este contexto de expansión global, la producción de carne de búfalo se ha consolidado como una alternativa ganadera sostenible y se encuentra en desarrollo en nuestro país, especialmente en regiones marginales para la ganadería bovina, como el noreste argentino y los humedales (Delta del Paraná). Su aprovechamiento, basado en pasturas naturales y con baja intervención tecnológica, permite una producción cárnica ambientalmente amigable, además de atender la demanda de consumidores que desean consumir carnes de fuentes exóticas. Cabe mencionar que la carne bubalina se destaca por presentar mayor contenido de hierro y menor porcentaje de grasa y calorías, características que responden a una demanda creciente de productos cárnicos más saludables y sostenibles, respecto de la carne vacuna (Chamorro *et al*. 2022).

Los registros del año 2021 indican 150.000 cabezas de ganado, con un incremento sostenido durante los últimos años (Crudeli *et al.* 2021). El aumento en la producción se debe no sólo a las ventajas productivas y de calidad que se han registrado en este tipo de producción, sino también a una producción cárnica ambientalmente amigable, con mayor rentabilidad dado que el engorde de búfalos es superior al del ganado vacuno, con un crecimiento anual del 8% al 12% superior, debido a su adaptación a las condiciones climáticas, su capacidad para aprovechar forrajes de baja calidad y su resistencia a enfermedades y parásitos (Crudeli *et al.* 2014).

Teniendo en cuenta que tanto el ganado vacuno como el bubalino se faenan, procesan y comercializan en los mismos canales, resulta de interés poder diferenciar objetiva y analíticamente dichas carnes, como herramienta de calidad y trazabilidad. En este contexto, la implementación de estrategias de control y seguimiento basadas en metodologías analíticas que permitan la autenticación de especies de los alimentos no solo contribuye a fortalecer la confianza del consumidor, sino que permite también optimizar los procesos productivos y facilitar el acceso a nuevos mercados.

En los últimos años, se han desarrollado diversos métodos moleculares como herramientas útiles para el análisis de alimentos. En el caso de la carne la técnica más utilizada, dada su especificidad, sensibilidad, simplicidad y velocidad, es el análisis por qPCR el cual ha sido probado en diferentes matrices cárnicas (Mafra *et al.* 2008; Amaral *et al.* 2017). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la aptitud de la metodología de PCR en tiempo real (qPCR), para caracterizar molecularmente y diferenciar carnes de especies (vacuna y bubalina), a través de la amplificación de ADN, utilizando los cebadores diseñados en nuestro laboratorio para la especie *Bos taurus*.

Materiales y Métodos

Muestras biológicas

Seis muestras de carne vacuna (*Bos taurus*), fueron obtenidas de productores locales, con los cuales se trabaja con protocolos estandarizados y bajo convenios de vinculación de establecimientos productivos; y seis muestras de carne bubalina (*Bubalus bubalis*), fueron cedidas por Fuska S.A. La Filiberta (Entre Ríos, Argentina). Los músculos utilizados en ambos casos fueron de peceto (*semitendinosus*) y cuadril (*bíceps femoral*). La extracción de ADN se realizó a partir de 25 mg de tejido muscular refrigerado. Como control positivo de ADN vacuno, se utilizó material de referencia certificado de INTI (carne vacuna molida homogeneizada, INTI-MRC 014 C001).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante metodología de resina grado biología molecular (Chelex, BioRad®). Cada muestra de tejido se homogeneizó con 500 µl de reactivo Chelex®100 al 10% en vórtex durante 15 s, y posteriormente se incubó durante 20 min a 95 °C en un baño termostatizado. Luego las muestras se agitaron en vórtex durante 15 seg y se centrifugaron 3 min a 10.000 x g a TA. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo y se mantuvo a - 20 °C hasta su análisis. La concentración del ADN extraído se determinó por fluorimetría utilizando el sistema con Qubit™ 2.0 (Qubit™ dsDNA BR Kit; ThermoFisher Scientific). La integridad del ADN extraído fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% preparado en tampón TAE 1X. Para la visualización de las bandas se empleó el agente intercalante GelRed™ (Biotium). Como marcadores de peso molecular se utilizó DNA Ladder 1 kpb y Lambda Hind lll (PB-L) (dato no mostrado).

Amplificación qPCR

Los cebadores fueron diseñados para amplificar una región conservada de 61 pares de bases (pb) del gen mitocondrial que codifica la subunidad I del citocromo oxidasa (COI) de *Bos taurus* (Acceso GenBank: HM102289.1). La secuencia génica fue obtenida de la base de datos GenBank del NCBI y utilizada como plantilla en el software Primer Express™ (Applied Biosystems™) para el diseño de los oligonucleótidos.

La especificidad de los cebadores fue evaluada mediante análisis de reactividad cruzada utilizando AutoDimer Software (http://www.cstl.nist.gov), mientras que la autocomplementariedad y la formación de estructuras

secundarias fueron verificadas con NetPrimer Sofware (http://www.premierbiosoft.com) y DINAmelt Software (http://unafold.rna.albany.edu). La síntesis de los oligonucleótidos fue realizada por Eurofins Genomics MWG Operon (Ebersberg, Alemania).

La amplificación de ADN mediante qPCR se llevó a cabo en el equipo StepOnePlus™ System (Applied Biosystems™), utilizando 5 µl de 1x de Sso Fast EvaGreen Supermix low Rox (BioRad®) y 0.3 µl (300 nM con. final) de los cebadores diseñados (*forward* "F" y *reverse* "R"). Cada reacción consistió en 2 µl (10-20 ng) de ADN por muestra, en un volumen final de 10 µl y bajo las siguientes condiciones de amplificación: 3' a 98 °C, 40 ciclos a 98 °C por 5'' y 30'' a 60 °C y posterior curva de disociación (*melting*) de los productos de amplificación (60 a 90 °C; 0,3 °C 2-5''/ciclo). Las muestras fueron analizadas por triplicado, utilizando material genético puro de ambas especies. Como control negativo de la amplificación, se incluyó una reacción con la mezcla de todos los reactivos excepto el ADN templado con el objetivo de descartar la presencia de contaminación o la formación de productos inespecíficos. Los datos fueron analizados con el software del StepOnePlus™.

Rango dinámico

Para la realización de la curva de calibración (rango dinámico), el ADN extraído de la muestra de referencia (vacuna) se diluyó en serie 1:10 (10^{-1} a 10^{-7}) y posteriormente se amplificó mediante las condiciones indicadas anteriormente. Luego se graficaron los valores de dilución del ADN (en escala log 10) en función de los valores medios del ciclo umbral (Ct) obtenidos a partir del promedio de tres replicas técnicas de cada punto.

Resultados y Discusión

Los indicadores económicos y productivos de la carne de búfalo en Argentina evidencian un crecimiento sostenido en los últimos años, consolidándose como una alternativa ganadera con alto potencial. Con una proyección de 300.000 cabezas en producción para 2030 y una rentabilidad estimada un 12% superior a la de la ganadería bovina, esta especie está siendo incorporada por un número creciente de establecimientos, destacándose además por su adaptabilidad a zonas productivas marginales. Teniendo en cuenta esta proyección económica respecto de la carne bubalina y la coincidencia en los canales de faena, procesamiento y distribución utilizados para ambas especies en la industria frigorífica, el objetivo de nuestro trabajo fue desarrollar una metodología molecular con alta fiabilidad, como la amplificación por qPCR, que permita a los establecimientos ganaderos dedicados a la faena y exportación, disponer de los primeros antecedentes del análisis y tipificación de carne bubalina, dando lugar al futuro desarrollo como herramienta de autenticidad de carnes, pudiéndoles diferenciar de manera analítica.

De este modo, en la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para la curva de calibración o curva estándar de las diluciones seriadas 1/10 de los extractos de ADN vacunos, realizada con los cebadores diseñados para *Bos taurus* "F" y "R". En la parte inferior se observa la la eficiencia de la amplificación (rango dinámico), siendo del 94,2% con un R^2 de 0.996, y una pendiente de -3,41. Estos resultados indican la fiabilidad en la detección, y la eficiencia del método de amplificación de qPCR, donde la cantidad de ADN inicial es duplicada en cada ciclo, logrando amplificar el ADN hasta la dilución de 10^{-5} en forma precisa y que puede ser además cuantificada. A partir de estos resultados se definió el límite de detección (LOD) como la mínima dilución de ADN en la que todas las réplicas pueden detectarse, siendo de 1 ng ADN/Kg carne; mientras que el límite de cuantificación (LOQ) fue de 10 ng ADN/Kg carne, que indica la concentración más baja de ADN que se puede medir con la precisión y fiabilidad, previamente descripta.

Respecto a la especificidad de la reacción de qPCR realizada con los cebadores sintetizados, se llevó a cabo por medio de la visualización de la curva de disociación de los productos de amplificación (Figura 2). En esta etapa, los productos de amplificación generados fueron sometidos a una gradiente de temperatura (de 60 °C a 95 °C). La curva de

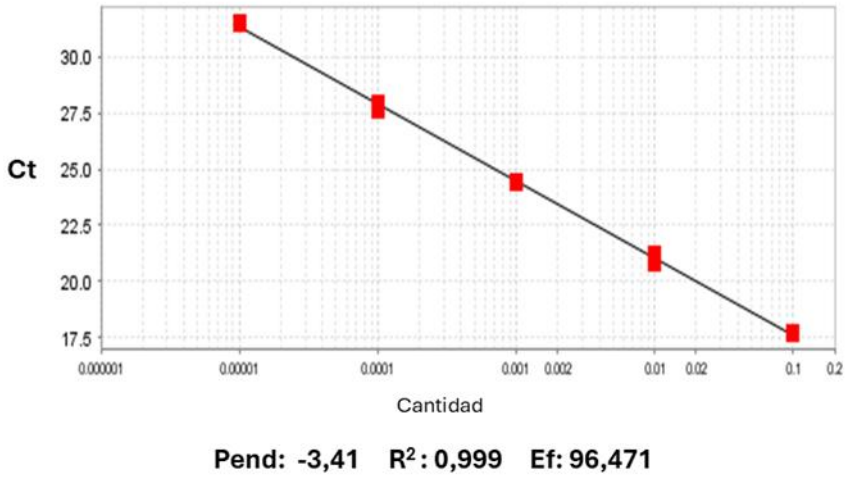

Figura 1. Curva de calibración o curva estándar realizada con los cebadores diseñados para *Bos taurus* "F" (forward) y "R" (reverse). En la parte inferior se observan los valores obtenidos para la pendiente (Pend), el R^2 y la eficiencia de la amplificación (Ef).

Figure 1. *Calibration curve or standard curve created with the primers designed for Bos taurus "F" (forward) and "R" (reverse). The values obtained for the slope (Pend), R^2, and amplification efficiency (Ef) are shown below.*

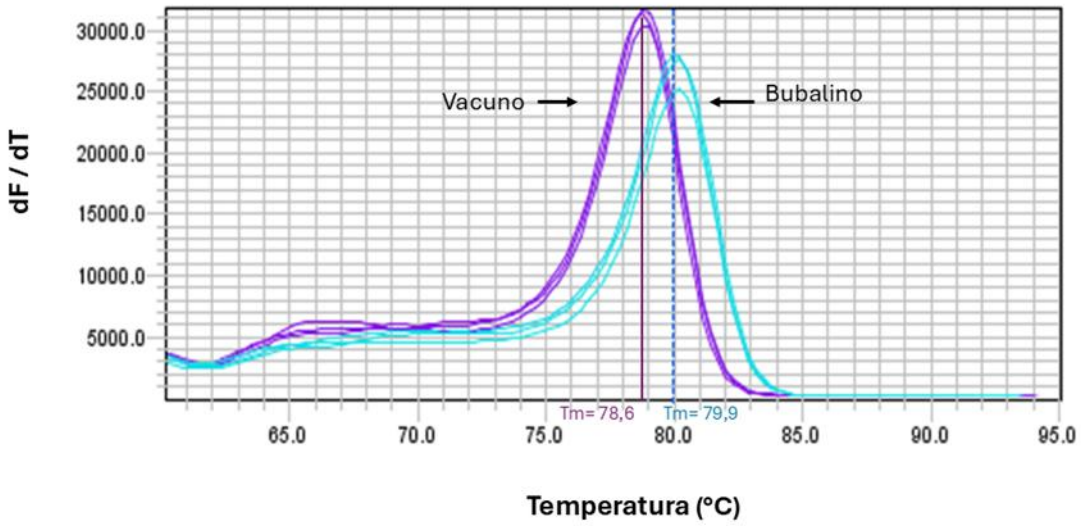

Figura 2. Curva de disociación de los productos amplificados por qPCR. La curva en color violeta (izquierda) corresponde a la curva de disociación del ADN amplificado bovino, analizada por triplicado técnico. La curva en color celeste (derecha) representa la curva de disociación del producto de amplificación del ADN de búfalo. dF/dT = es la tasa de cambio de la fluorescencia (F) con respecto a un cambio en la temperatura (T), calculado durante el análisis de la curva de fusión.

Figure 2. *Dissociation curve of the amplified products by qPCR. The violet curve (left) corresponds to amplified DNA biological replicate of bovine sample, analyzed in technical triplicate. The light blue curve (right) represents the equivalent biological replicate for buffalo DNA. dF/dT= is the rate of change of fluorescence (F) with respect to a change in temperature (T), calculated during melt curve analysis.*

disociación en qPCR, muestra cómo cambia la fluorescencia amedida que la temperatura aumenta durante la disociación (fusión) de la doble cadena del ADN del producto de amplificado, determinando la especificidad del amplificado, dada la presencia un pico único (con su Tm específica), que corresponde al cambio de fluorescencia existente entre el punto de máxima fluorescencia y el descenso de esta.

La Figura 2 presenta las curvas de disociación obtenidas mediante qPCR, correspondientes a una muestra biológica por especie (bovina y bubalina), cada una con su triplicado técnico. Para la muestra de ADN vacuno pura, la Tm fue de 78,6 °C con un Ct de 21,5, mientras que para la muestra de ADN bubalina la Tm fue de 79,9 °C con un Ct de 27,25. La homogeneidad en las curvas de amplificación y la disparidad en las Tm entre ambas especies se reprodujeron consistentemente en el conjunto total de muestras. Se analizaron seis muestras biológicas de las especies bovina y bubalina, cada una de ellas amplificada mediante réplicas técnicas por triplicado.

La Tm obtenido de la amplificación de todas las muestras de ADN bovino fue idéntica a la del material de referencia certificado (carne vacuna molida homogeneizada, INTI-MRC 014 C001), registrando un valor de 78.6 °C (dato no mostrado). Estos resultados muestran la repetitividad del ensayo de qPCR para la amplificación de ADN, utilizando muestras biológicas de diferentes animales por especie, y habiendo sido procesadas cada una independientemente. Asimismo, cabe señalar además que, en todas las muestras analizadas no se observaron presencia de dímeros formados para ambas especies, dada la ausencia de señal de fluorescencia a temperatura menores de los 70 °C.

Debido a los diferentes resultados obtenidos en la Tm para las secuencias amplificadas de las dos especies, y considerando la especificidad y eficiencia de la metodología qPCR desarrollada, se procedió a realizar un análisis *in silico*. El propósito fue establecer si el contenido de bases GC de las secuencias amplificadas era el factor determinante de la diferencia de Tm observada entre ambas especies.

Los resultados del alineamiento de las secuencias, realizado mediante el software Clustal W, mostraron que la región amplificada de 99 pb, correspondiente a la subunidad I de Citocromo Oxidasa de *Bos taurus* (HM102289.1) presenta ocho bases diferentes con respecto al gen homólogo de *Bubalus bubalis* (OP835886.1) (Figura 3). Si bien estas diferencias no afectaron la eficiencia de amplificación por qPCR entre las especies, es posible inferir que la variación observada en la Tm de los amplificados estaría directamente asociada a la disparidad en el contenido de bases GC entre los productos bovino y bubalino.

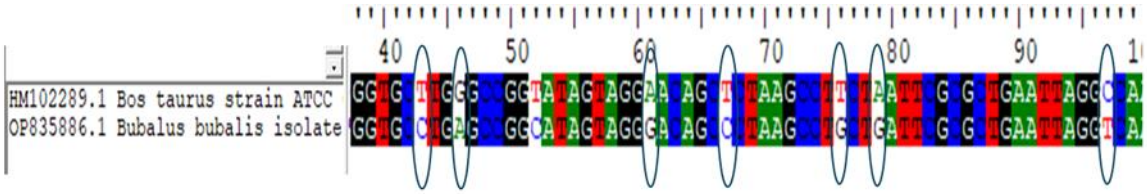

Figura 3. Análisis *in silico* de secuencia de ADN de la subunidad I de Citocromo Oxidasa de *Bos taurus y Bubalus bubalis* (n° acceso HM102289.1 y OP835886.1, respectivamente), mediante Clustal W-BioEdit ©. Los círculos abiertos indican las diferencias de bases entre especies.

Figure 3. *n silico DNA sequence analysis of Cytochrome Oxidase subunit I from Bos taurus and Bubalus bubalis (accession numbers HM102289.1 and OP835886.1, respectively) using Clustal W-BioEdit ©. Open circles indicate base differences between species.*

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron establecer que muestras de ADN obtenidas de músculos para ambas especies (bovino y bubalino), pueden ser diferenciadas molecularmente, utilizando los cebadores diseñados en nuestro laboratorio, a partir de una región conservada para *Bos taurus*. Si bien existe similitud de secuencias que presentan ambas especies de la subfamilia bovinae, fue posible, a partir de las Tm obtenidos para ambas muestras, diferenciar las carnes de manera analítica utilizando la técnica de qPCR. Esta metodología podría implementarse como una herramienta potencial para garantizar la autenticidad y genuinidad en los establecimientos de faena o de industrialización cárnica.

Contribuciones

Todos los autores participaron de igual manera en el trabajo Intelectual y técnico-experimental.

Agradecimientos

Financiamiento INTA, Cartera Proyectos 2019-2022. Fuska SA.

Bibliografía

Amaral J, Meira l, Oliveira MBPP, Mafra I (2017) Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. *Food Control* **72**, 53-61.

Chamorro V, Pazos A, Piguín D, Cadoppi A, Cunzolo S (2022) Caracterización de la composición nutricional de carne de Búfalo (*Bubalus bubalis*) como herramienta para su divulgación y comercialización. VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba, Córdoba, Argentina. Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba. p. 99.

Crudeli GA, Patiño EM, Maldonado Vargas P, Konrad, JL (2014) Pasado, presente y futuro del búfalo en Argentina. *Revista Veterinaria* **25**, 140-145.

Crudeli GA, Patiño EM, Maldonado Vargas P, Konrad, JL (2021) Los búfalos en Argentina. *Revista Veterinaria* **32**, 169-173.

Giordano G, Guarini P, Ferrari P. Biondi-Zoccai G, Schiavone B, Giordano A (2010) Beneficial impact on cardiovascular risk profile of water buffalo meat consumption. *European Journal of Clinical Nutrition*, **64**, 1000-1006.

Huerta Leidenz N, Moreno LA (2025) Water buffalo (*Bubalus bubalis*) meat produced in Latin America I: A review of the literature on production suitability, meat yield, textural and sensorial characteristics. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* **33 (3)**, 137 152.

Mafra I, Silva SA, Moreira EJMO, Ferreira da Silva CS, Beatriz M, Oliveira PP (2008) Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control* **19**, 1183–1190.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - FAO (2019) El futuro de la inocuidad alimentaria. Primera conferencia internacional FAO / OMS / UA sobre inocuidad alimentaria. Addis Abeba 12-13 de febrero 2019.