

19
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

ADAPTACION DE UN ENSAYO INMUNOENZIMATICO
(EIA) PARA CUANTIFICAR PROTEINA DE SOYA
EN SALCHICHAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JORGE EDUARDO LOYO ROSALES



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Profa. Josefina Viades Trejo
Vocal	Prof. Rodolfo Pastelín Palacios
Secretario	Profa. María del Carmen Wachter Rodarte
1er. suplente	Profa. Lucía Cornejo Barrera
2do. suplente	Prof. Hugo Sousa Rojano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Investigación en Inmunología (I-D).

Departamento de Biología.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: Q.F.B. Rodolfo Pastelín Palacios.

Supervisor técnico: Q.F.B. Ana Esther Aguilar Cárdenas.

Sustentante: Jorge Eduardo Loyo Rosales.

A mis padres, mi hermano y mis abuelos.

A Verónica.

A Sofía.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Rodolfo y la maestra Anita por su amistad, asesorías y confianza.

A José Luis Bañales y el Dr. Nava por compartir desinteresadamente sus conocimientos y experiencia.

A las profesoras Josefina Viades y Carmen Wachter por la revisión de este trabajo.

A Elda Beltrán, Alicia Gamboa y María Elena Mellado por su amistad, apoyo y enseñanzas.

A Lucy por las porras y los microkjeldahls.

A Hugo y Lety por los otros microkjeldahls y por lo mejor de la maestría.

A Gina y Mariana por su amistad e invaluable ayuda.

A la familia Carrillo Rosales por la edición de la tesis, su paciencia y hospitalidad.

A todos los compañeros del laboratorio I-D (Mary, Lety, Mónica, Pili, Adriana, Paco, Don Ber, etc.) por su apoyo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
GENERALIDADES	
Salchichas.....	3
Soya.....	4
Proteínas de la soya.....	5
Derivados de la soya y su uso en productos cárnicos.....	7
Métodos de detección de soya en productos cárnicos.....	11
Ensayos inmunoenzimáticos.....	18
Enzimas utilizadas en EIA.....	25
Fases sólidas utilizadas en EIA.....	27
EIA por inhibición.....	28
OBJETIVOS.....	29
METODOLOGÍA.....	30
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	53
ANEXOS	
I. Obtención de los inmunógenos.....	55
II. Determinación de proteínas según Lowry.....	57
III. Determinación de proteínas según Bradford.....	58
IV. Inmunización del conejo y obtención del suero.....	59
V. Técnica de doble difusión en agar (Ouchterlony).....	60
VI. Titulación de los anticuerpos por EIA.....	61
VII. Reactividad cruzada (por Western-blot).....	63

VIII. EIA por inhibición.....	67
IX. Elaboración de salchichas con concentración conocida de proteína de soya....	73
X. Preparación del polvo de acetona de salchicha.....	75
XI. Aplicación del EIA a salchichas con concentración conocida de soya.....	76
XII. Cálculos para obtener la concentración de proteína de soya en las muestras...	79
XIII. Glosario.....	82
REFERENCIAS.....	83

INTRODUCCIÓN

Aunque en los países orientales la soya tiene una larga historia como fuente importante de grasas y proteínas de la dieta, en Occidente se le utiliza muy poco en la alimentación humana. Sólo del 2 al 3% de la soya producida en los E.U.A. (el principal productor a nivel mundial) se utiliza como fuente directa de proteína³³; no por su valor nutricional, sino por sus excelentes propiedades funcionales (como gelificante, retenedor de agua y emulsificante²⁹). Gracias a ellas, la adición de proteínas de soya a productos cárnicos permite la obtención de un producto terminado de calidad uniforme; pero también hace posible algunas adulteraciones, como el uso de carne de menor calidad como materia prima, la sustitución de la proteína animal por proteína vegetal o una mayor incorporación y retención de agua que las estrictamente necesarias. En consecuencia, algunos países, como Austria¹⁹, han prohibido la utilización de proteínas de soya en estos productos y otros han limitado su uso, como es el caso de los E.U.A.¹⁷.

En nuestro país, a pesar del uso generalizado de productos de soya en salchichas, la Norma Oficial Mexicana vigente²¹ para este producto cárnico no especifica las cantidades máximas permisibles de dichos aditivos; de hecho, ni siquiera los menciona. Sólo establece un contenido mínimo de proteína del 9.5% sin aclarar su origen (animal o vegetal). Sin embargo, en agosto de 1994 se publicó en el Diario Oficial de la Federación²⁵ un proyecto de Norma Oficial Mexicana para productos de la carne. En él se limita el uso de productos de soya a los siguientes porcentajes:

- Proteína aislada de soya 2.0%
- Concentrado de soya 3.5%

valores idénticos a los de la legislación de los E.U.A.¹⁷.

Un grave defecto del proyecto de Norma Oficial es la omisión del método por el que deben cuantificarse dichos productos; porque cada técnica tiene una sensibilidad determinada, así como ventajas y limitaciones diferentes, todo lo cual puede reflejarse en resultados significativamente distintos. Esta omisión se mantuvo en la Norma Oficial, publicada el 13 de diciembre de 1995 ²⁰.

Aunque existen diferentes técnicas para la detección de derivados de soya en productos cárnicos, actualmente se considera que los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) son los más adecuados para este tipo de análisis debido a su alta sensibilidad. De hecho, la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) adoptó oficialmente un EIA por inhibición para la cuantificación de proteína de soya en productos cárnicos, a pesar de ciertas limitaciones¹.

En este trabajo se describe la adaptación de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de proteína de soya en salchichas y la evaluación de su efectividad aplicándolo a muestras con concentraciones conocidas de dicha proteína.

GENERALIDADES

SALCHICHAS

La Norma Oficial Mexicana para salchicha la define como un “producto alimenticio embutido de pasta semifirme de color característico elaborado con la mezcla de carne (60% mínimo) de ternera o res y cerdo y grasas de las especies antes mencionadas, adicionado de condimentos, especias y aditivos para alimentos”²¹. Para las salchichas de Viena, Franckfort (sic) y Cocktail la norma agrega que “cumplen en general con lo señalado anteriormente, elaborados básicamente en su composición con no menos de 60% de carne de res y cerdo; mezclado con grasa de cerdo y emulsificados, sometidos a curación pudiendo ser ahumados o no, sometidos a cocción y enfriamiento, empacados en material adecuado para su distribución y conservación en refrigeración”.

Como curación se define “la aplicación de la mezcla de sal, nitrito de sodio, adicionado o no con aditivos a los ingredientes mencionados en 3.1.1. (la sección que define a las salchichas de Viena, Franckfort (sic) y Cocktail)”. Las proteínas de soya no se mencionan en la norma, ni siquiera en la sección de aditivos.

Por otro lado, la NOM-122-SSA1-1994²⁰ clasifica a las salchichas entre los productos cárnicos curados, emulsionados y cocidos; a los cuales define como “los elaborados con carne de una o más especies, vísceras y otros subproductos comestibles de los animales autorizados, los que además pueden ser sazonados, ahumados o no”.

SOYA ^{3, 30, 33}

La soya (*Glycine max*) pertenece a la familia de las Leguminosae y la subfamilia Papilionoideae, aunque también se incluye entre las oleaginosas por su alto contenido de aceite. Es un cultivo anual de verano cuya planta varía en altura de menos de 30cm a más de 2m; tiene hojas alternadas y trifoliadas, excepto en los dos primeros nodos; produce flores de 6-7mm de largo, moradas o blancas (las primeras dominan); la semilla es casi esférica, pesa en promedio de 120-180mg y se produce en vainas que crecen en racimos de tres a cinco; por lo regular, cada vaina contiene dos, tres o más semillas. En muchos países occidentales se utiliza para la extracción de aceite y el residuo o pasta, rico en proteína, se emplea para la alimentación animal; por otra parte, en el Oriente, la soya es fundamental en la dieta de un gran sector de la población.

La composición química de la soya depende de muchos factores, como la variedad, la temperatura, el tipo de suelo y la irrigación, entre otros. En la tabla I se muestra la composición porcentual promedio en base seca de esta leguminosa.

Proteína (N x 6.25)	Grasa	Carbohidratos	Cenizas
40	21	34	4.9

Tabla I Composición promedio de la soya (% en base seca).

En forma general, la soya está constituida por tres fracciones principales: la cascarilla, que representa el 8% del peso total de la semilla; el hipocotilo (2%) y dos cotiledones (90%). En estos últimos, las proteínas están almacenadas en partículas esféricas, de diámetros que varían entre 2 y 20µm, llamadas cuerpos proteicos, los cuales son casi proteína pura. A su vez, el aceite se almacena en pequeñas partículas, también esféricas de 0.3 a 0.5µm de diámetro, llamadas esferosomas.

PROTEÍNAS DE LA SOYA³

Las proteínas de la soya son una mezcla heterogénea de globulinas (60-75% del total) y de albúminas con pesos moleculares muy variados, solubles en soluciones salinas y en agua; precipitan en su punto isoeléctrico, generalmente en el intervalo de 4.2 a 4.8.

Por medio de la ultracentrifugación, las proteínas de soya se separan en cuatro fracciones: 2S, 7S, 11S y 15S. En la tabla 2 se resumen las características de cada una de las fracciones.

Fracción	Proteínas	Total (%)	pl	M _r (K)
2S		22		
	Inhibidores de tripsina		4.5	8, 21.5
	Citocromo c			12
	Globulina 2.3S			18.2
	Globulina 2.8S			32
	Alantoinasa			50
7S		37		
	Hemaglutinina		6.1	110
	Lipoxigenasa		5.4	108
	β-Amilasa		5.8	61.7
	Globulina 7S (β-conglicinina)			186-210
11S		31		
	Globulina 11S (glicinina)		4.8	350
15S		11	4.8	600

Tabla 2 Características de las proteínas de soya.

En general, la proteína de soya presenta una deficiencia de aminoácidos azufrados que se acentúa en los aislados proteicos, ya que la concentración de metionina y cisteína se reduce durante el proceso de elaboración de estos productos.

Las proteínas de la soya tienen la capacidad de formar geles a través de varios mecanismos que implican un ciclo de calentamiento-enfriamiento. Se ha demostrado que el calentamiento causa una ruptura irreversible de la estructura cuaternaria de la globulina 11S y su disociación en subunidades; parece ser que en esta transformación existe un estado intermedio transitorio en forma de un agregado soluble que posteriormente se convierte en gel. Los geles basan su estructura en el fenómeno de asociación-disociación de las proteínas, lo que a su vez está determinado por diversos factores, como son la temperatura, la fuerza iónica y el tipo de sal. Las fuerzas que hacen posible la formación de geles son diversas y algunas influyen más en una cierta fracción proteica; la 11S y la 7S interactúan cuando se calientan y ayudan a producir este estado de dispersión; sin embargo, en forma individual, la 7S establece geles por medio de puentes de hidrógeno, mientras que la 11S lo hace gracias a la formación de uniones electrostáticas y enlaces disulfuro. Además, cuando se elaboran geles con el conjunto total de proteínas de la soya, también influyen las fuerzas hidrofóbicas. Debido a su compleja estructura, estas fracciones proteicas son muy sensibles a muchos agentes desnaturizantes, como pH extremos, temperaturas altas, concentraciones elevadas de disolventes y de sales, etc. De todos estos, el efecto del calor es el más importante ya que los tratamientos térmicos son las operaciones unitarias que más se emplean en la elaboración de alimentos. La consecuencia de esto es, principalmente, la reducción de la solubilidad de las proteínas, lo que puede llegar a inducir la gelificación.

Por otro lado, en lo que se refiere a la determinación de proteína total, existe una controversia en cuanto al valor del factor de conversión de nitrógeno para la proteína de soya³⁰. En 1931 se publicó como 5.71 a partir de un trabajo hecho en 1898 por Osborne y Campbell. Pero su reporte no afirmaba que dicho valor representara el contenido de nitrógeno del frijol entero; por lo tanto, su trabajo no justifica el uso general del factor 5.71. En los sesentas, Tkachuk e Irvine determinaron factores de conversión de nitrógeno

utilizando la composición de aminoácidos como base. Para la harina de soya con cascarilla y nitrógeno no proteico soluble reportaron un factor de 5.69. Pero es necesario hacer una corrección del mismo por la cascarilla, cuyo contenido de nitrógeno varía según la variedad de soya que se tenga. Sin embargo, los agrónomos y otros analistas norteamericanos utilizan el factor 6.25, el cual está reconocido legalmente por la National Soybean Processors Association, la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), la American Soybean Association y otras asociaciones técnicas involucradas en el comercio de la soya y sus derivados.

DERIVADOS DE LA SOYA Y SU USO EN PRODUCTOS CÁRNICOS^{3, 15, 33}

El sistema actual de procesamiento de la soya da como resultado tres productos proteicos principales, clasificados de acuerdo a su contenido de proteína:

Producto	Contenido de proteína (% en base seca)
Harina y Sémola	
Integral	40
Desengrasada	50
Concentrado proteico	70
Aislado proteico	90

Tabla 3 Principales productos proteicos derivados de la soya.

La obtención de los productos anteriores se hace a partir de hojuelas de soya desengrasadas. Éstas, a su vez, se obtienen del frijol de soya por el siguiente proceso: (1) el frijol se limpia, tritura y descascarilla; (2) el frijol descascarillado se transforma en hojuelas; (3) se extrae el aceite con disolventes; (4) se eliminan los residuos de

disolvente. A partir de este paso se siguen procesos diferentes dependiendo del producto final deseado.

Los derivados más sencillos de obtener son la harina y la sémola, pues al proceso anterior sólo sigue una molienda. En el caso de estos dos productos, no siempre se extrae el aceite de las hojuelas; si éste es el caso, el contenido mínimo de proteína debe ser del 40% y si se parte de hojuelas desengrasadas, del 50%. La diferencia entre la harina y la sémola es solamente el tamaño de partícula, si éste es mayor a malla 100 el producto es una sémola y si es menor a 100 recibe el nombre de harina.

Por definición, los concentrados contienen un mínimo de 70% de proteína en base seca; se preparan a partir de harinas u hojuelas desengrasadas, de las cuales se eliminan los azúcares solubles y otros constituyentes menores. Se pueden seguir tres diferentes procesos de extracción; el primero utiliza una disolución de etanol al 60-80% para precipitar a las proteínas, que son insolubles en etanol al igual que los polisacáridos, y se recuperan eliminando al disolvente. En el segundo método se emplea ácido diluido (pH 4.5) para alcanzar el punto isoeléctrico de las proteínas y precipitarlas; después se neutralizan y se secan. En el tercer método se insolubilizan las proteínas por desnaturalización con calor húmedo, se lavan con agua para eliminar los azúcares solubles y finalmente se seca el producto. Los concentrados obtenidos por estos tres procesos tienen aproximadamente la misma composición; sin embargo, las propiedades físicas y funcionales son diferentes en cada caso.

Los aislados son las proteínas de soya más refinadas que existen y se caracterizan por un contenido de proteína mínimo del 90% en base seca. Así como los concentrados, los aislados también se preparan a partir de harinas o de hojuelas desengrasadas; pero además de los azúcares solubles se extraen también los polisacáridos insolubles. Esto se

hace tratando a la harina o las hojuelas con álcali diluido (pH 7.5-8.5), obteniéndose un residuo insoluble que contiene principalmente polisacáridos y que se elimina por centrifugación; el extracto se acidifica a pH 4.5, precipitando a la mayor parte de las proteínas, que también se separan por centrifugación; posteriormente el precipitado se lava y se neutraliza con hidróxido de sodio para resolubilizar las proteínas y finalmente se seca por aspersión. Algunas veces, después del lavado, el precipitado se seca para producir la forma isoelectrica; pero el primer método se utiliza con mayor frecuencia en la industria alimentaria porque la proteína obtenida es soluble en agua. También los diferentes aislados comerciales tienen aproximadamente la misma composición química; sin embargo, sus propiedades físicas y funcionales, como la solubilidad, pueden variar.

Otro producto derivado de la proteína de soya que se utiliza en la industria de la carne es el texturizado. Es un producto proteico que ha sufrido un proceso por el cual las proteínas solubles se transforman en fibras con características funcionales similares a las de la carne, por lo que puede utilizarse en sustitución de ésta al añadirse los aditivos adecuados. Con estos texturizados se han desarrollado productos con formas y tamaños que semejan hamburguesas, filetes de pescado, de res, etc.

El uso de proteínas de soya en productos cárnicos se debe en gran parte a sus propiedades funcionales (emulsificantes, hidratantes, gelificantes, espumantes, etc.). Los derivados de la soya tienen composiciones diferentes, por lo que sus propiedades funcionales no son iguales. El contenido proteico es particularmente importante para desarrollar estas características, aunque también influyen los otros constituyentes.

Las harinas y sémolas se utilizan en los derivados de la carne con fines de aglutinación principalmente, ya que no son buenos emulsificantes de las grasas; además, su capacidad de absorción de agua es menor que la de concentrados y aislados, como

puede observarse en la tabla 4, en donde se ejemplifican también las diferencias que pueden encontrarse entre las propiedades funcionales de dos productos comerciales distintos de un mismo derivado de la soya (aislado o concentrado).

Muestra	Absorción de agua (%)	Absorción de grasa (%)	Aceite emulsificado (%)
Harina	130.0	84.4	2.8
Concentrado 1	227.3	133.0	11.7
Concentrado 2	196.1	92.0	18.7
Aislado 1	447.6	154.5	25.2
Aislado 2	416.7	119.2	22.2

Tabla 4 Comparación de algunas propiedades funcionales de los productos de soya.

Los concentrados de soya se utilizan en productos cárnicos por sus capacidades de absorción de agua y de grasa; así como por sus propiedades emulsificantes.

Los aislados tienen muchas propiedades funcionales que se aprovechan en los productos cárnicos: la absorción y retención de agua; la formación y estabilización de emulsiones; la absorción de grasas; la formación de geles y de películas; la adhesión y la elasticidad. En la tabla 4 se muestra la superioridad del aislado de soya en comparación con la harina y el concentrado en algunas de las propiedades funcionales mencionadas.

En la tabla 5 se resumen las propiedades funcionales de las proteínas de soya que se aprovechan en la fabricación de salchichas y embutidos en general.

Propiedad funcional	Producto proteico de soya
Emulsificación	
Formación	Concentrado, aislado.
Estabilización	Concentrado, aislado.
Absorción de grasa	Harina, concentrado, aislado.
Absorción y retención de agua	Harina, concentrado, aislado.
Formación de películas	Aislado.
Adhesión	Concentrado, aislado.

Tabla 5 Propiedades funcionales de las proteínas de soya en embutidos

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE SOYA EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Debido al amplio uso que se da a los derivados de soya en productos cárnicos, a la facilidad con que puede enmascararse dicha utilización e, inclusive, a los problemas de salud que pueden presentarse (se ha encontrado que las proteínas de soya son alergénicas⁷), es importante contar con un método apropiado para detectar y cuantificar soya en los alimentos mencionados. Pero, a pesar de que la composición de la soya es tan distinta a la de la carne, desarrollar dicho método ha resultado ser más difícil de lo que parece, porque existen muchas preparaciones de proteína de soya con distintos grados de pureza, obtenidas a través de procesos diferentes, cada una con distintas propiedades funcionales y diseñadas para una amplia gama de productos. Lo anterior explica la gran cantidad de métodos de identificación y cuantificación desarrollados y el relativamente escaso éxito obtenido⁴.

Existen varios métodos, tanto cualitativos como cuantitativos, para la determinación de productos de soya en cárnicos, los cuales pueden clasificarse en tres grupos⁹:

- Métodos inmunológicos: Se basan en una reacción antígeno-anticuerpo y la formación de un precipitado visible, que generalmente se efectúan en un gel. Entre estos tenemos la doble inmunodifusión radial (Ouchterlony), la inmunolectroforesis a contracorriente y la inmunodifusión radial simple.
- Métodos fisicoquímicos: Como la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y la HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento).
- Otros: Como la histología y los métodos indirectos; estos últimos miden otros componentes y los relacionan con la cantidad de proteína de soya presente.

Un método de detección y cuantificación muy efectivo en los Estados Unidos era el del óxido de titanio (TiO_2). En este país se requería la inclusión de 0.1% de dicho compuesto (fácilmente detectable) en la proteína aislada de soya utilizada en derivados cárnicos. Pero se tuvo que anular este reglamento en 1984 puesto que algunos otros países no permitían la presencia del óxido de titanio en alimentos, lo cual dificultaba la exportación de productos cárnicos estadounidenses¹⁵.

El método anterior, como todos los indirectos, depende de la relación entre la cantidad del analito medido y la de soya utilizada, lo que implica el control de dicha relación, que no siempre es fácil. Por lo tanto, el analito más adecuado para la determinación de soya en productos cárnicos es la proteína de soya misma, pues es el ingrediente principal de los derivados de soya, representando, como ya se mencionó en un apartado anterior, 90% o más del peso de los aislados, 70% de los concentrados y 40-50% de las harinas y sémolas⁴.

Los métodos mencionados en la clasificación anterior tienen, entre otras desventajas, un límite de detección relativamente alto, por lo que se han buscado técnicas más sensibles como las **inmunoenzimáticas** (se clasificarían entre los métodos inmunológicos), que se pueden considerar las más adecuadas porque tienen las siguientes ventajas²⁸ sobre las demás técnicas:

- Alta sensibilidad*.
- Elevada selectividad por la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo.
- Alta detectabilidad**.
- Posibilidad de automatización.
- Bajo costo del material en comparación con otras técnicas.

Debido a la sencillez de estos métodos y a las diferencias inmunogénicas entre las proteínas de soya y las de la carne, pareciera que adaptarlos es algo muy sencillo, pero la variedad de productos de soya existente también causa problemas en este caso. Entre los más importantes están el polimorfismo y la solubilidad⁴; esto es, los diferentes derivados de la soya se obtienen por distintos procesos -extracción, precipitación, texturizado, entre otros²⁴- que provocan cambios estructurales en la proteína, los cuales causan una disminución y modificación de los epítopes disponibles en la superficie de las moléculas de proteína para reaccionar con los anticuerpos. Además, las proteínas pierden solubilidad por los tratamientos térmicos a los que se someten los productos cárnicos, lo cual es un problema porque solamente solubilizadas pueden reaccionar con los anticuerpos utilizados en los métodos inmunológicos. Para resolver los problemas anteriores, Hitchcock y colaboradores¹² propusieron extraer las proteínas de soya bajo condiciones

* Sensibilidad se entiende en este trabajo como la capacidad de respuesta a cambios pequeños de concentración.

** Detectabilidad se refiere a la habilidad para detectar cantidades pequeñas.

desnaturalizantes con una disolución de urea y mercaptoetanol (la urea rompe los puentes de hidrógeno internos y el mercaptoetanol los enlaces disulfuro), lo cual las deja en una conformación desnaturalizada común, independiente del producto de soya utilizado. Después se eliminan los agentes desnaturalizantes por diálisis o se diluyen y las proteínas toman una misma conformación. Se desarrolla un anticuerpo con estas proteínas renaturalizadas y con él se adapta un ensayo inmunoenzimático (EIA) por inhibición (ver figura 1):

1. Se sensibilizan placas para inmunoensayo con antígeno (proteína renaturalizada de soya).
2. Por separado se incuban las muestras con un exceso de anticuerpo anti-proteína de soya desarrollado en conejo.
3. Las mezclas anteriores se transfieren a las placas sensibilizadas y se incuban para que los anticuerpos libres se fijen a los antígenos de la placa.
4. Se eliminan por lavado el exceso de anticuerpo y los complejos antígeno-anticuerpo formados en el paso 2.
5. Se agrega el anticuerpo anti-IgG de conejo, conjugado con una enzima y se incuba.
6. Se elimina el exceso de conjugado.
7. Se agrega el sustrato de la enzima y se incuba para desarrollar color.
8. Se mide en un espectrofotómetro la intensidad del color producido.

Como puede verse en la figura 1, este tipo de EIA es indirecto, porque el antígeno (proteína de soya) de la muestra se hace reaccionar con un exceso de anticuerpo y después se mide la cantidad de este último que no reaccionó. Por lo tanto, **entre más proteína de soya contenga la muestra, menos anticuerpos quedarán disponibles para reaccionar en las placas y habrá menos desarrollo de color.**

El método de Hitchcock y cols. fue el primero que pudo usarse con productos esterilizados²⁶. Sin embargo, a pesar de que se demostró la especificidad de los anticuerpos por las proteínas de soya, los resultados de la cuantificación de varios productos comerciales de soya no fueron constantes. Estas variaciones no se explican solamente por el error experimental inherente al EIA, sino que el procedimiento de solubilización-renaturalización no siempre convierte a todos los derivados de proteína de soya en la misma forma antigénica.

También se probó un anticuerpo comercial contra proteínas de soya nativa y desnaturalizada con calor (sin renaturalización) con muestras renaturalizadas después del tratamiento con urea y mercaptoetanol. Los resultados obtenidos indican que el anticuerpo comercial reconoció a las proteínas renaturalizadas, por lo que el producir un antisuero especial no representa ventajas para el método¹¹.

Más tarde, la European Vegetable Protein Federation (EUVEPRO) seleccionó el EIA anterior y un SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) para ser comparados en un estudio internacional, en el cual cinco productos cárnicos con diferentes concentraciones conocidas de soya, así como un blanco y un duplicado ciego, fueron analizados con ambas técnicas por 26 laboratorios en 10 países europeos. Las conclusiones de este estudio fueron que ambos métodos son adecuados para el análisis cualitativo y dan varianzas equivalentes entre los laboratorios, pero el EIA es más exacto que el SDS-PAGE. Aunque se recomendó refinar ambos métodos, el método al que EUVEPRO dio apoyo para más investigación fue el EIA²².

El estudio anterior dio como resultado que el EIA mencionado fuera adoptado oficialmente por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), aunque como

método semicuantitativo, pues puede considerarse cuantitativo sólo si se tiene disponible una muestra del derivado de la soya para calibrar el ensayo¹⁶.

Con la intención de superar las deficiencias del método de Hitchcock y cols., otros grupos hicieron modificaciones al EIA para detectar la proteína de soya sin importar el tipo de ésta ni los procesos a los que pudiera haber sido sometido el producto cárnico en el que fue utilizada. Una de estas variaciones fue la de Ravesteyn y Driedonks²⁶, en la cual se requiere aislar la glicinina (fracción de globulina IIS de la proteína de soya), desarrollar anticuerpos contra ésta y extraer las muestras con SDS y mercaptoetanol; además, utilizaron otro tipo de EIA (indirecto), pero los resultados obtenidos con productos esterilizados tampoco fueron satisfactorios del todo. Otro método (un EIA competitivo), desarrollado por Rittenburg y cols., se utilizó como base para un kit comercial¹⁹; es muy similar al método de Hitchcock, pero en este caso la extracción se hace con urea y ditiotreitol (este último en lugar del mercaptoetanol) y las proteínas se renaturalizan con una disolución de cistina; sin embargo, este método también tiene problemas para cuantificar productos esterilizados. Por otro lado, Medina¹⁷ desarrolló un EIA indirecto para salchichas, en el cual utilizó un anticuerpo comercial contra proteína entera de soya y extrajo las muestras con un amortiguador de carbonatos y Tween en un sonicador; pero sólo probó el método con aislados de soya y salchichas procesadas a 71°C. Más tarde, Yasumoto, Sudo y Suzuki³⁴ desarrollaron otro EIA competitivo que, al parecer, es el método que mejores resultados ha dado hasta ahora con productos esterilizados, pero tiene el inconveniente de ser muy laborioso, ya que es necesario obtener anticuerpos contra glicinina aislada y un fragmento peptídico que se usa como antígeno de referencia en las placas; además, las muestras llevan también un tratamiento drástico y laborioso.

ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS ^{N. 31. 32}

Los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) se desarrollaron a mediados de los sesentas para la identificación y localización de antígenos en preparaciones histológicas y para la identificación de líneas de precipitación obtenidas por inmunodifusión e inmunoelectroforesis. Hacia 1971 dos grupos (Engvall y Perlmann; Van Weemen y Schuurs) observaron que tanto los antígenos como los anticuerpos pueden ser inmovilizados en fases sólidas, lo cual hizo posible aplicar métodos similares para la detección cuantitativa de reactivos inmunológicos en tubos de ensayo. Este descubrimiento aumentó enormemente el número de haptenos, antígenos o anticuerpos que podían ser analizados. En 1972, Rubenstein y cols. desarrollaron el primer sistema homogéneo. En 1975, Köhler y Milstein desarrollaron los métodos para producir anticuerpos monoclonales que mejoraron las posibilidades de estandarización de los EIA, su especificidad y sensibilidad; además de contribuir al diseño de nuevos ensayos.

Los EIA se basan en dos fenómenos biológicos importantes: (1) la capacidad discriminadora de los anticuerpos, debida a su afinidad por un compuesto específico (antígeno o hapteno) y (2) el poder catalítico y especificidad de las enzimas, lo que normalmente las hace fácilmente detectables.

Más específicamente, el funcionamiento de los EIA depende de los siguientes principios:

- Algunas enzimas pueden ser acopladas químicamente a un anticuerpo o a un antígeno manteniendo las propiedades biológicas (interacción con el sustrato, unión con el antígeno, antigenicidad) de ambos componentes del conjugado.
- La mayoría de los antígenos (proteínas, péptidos, polisacáridos) se unen a través de interacciones electrostáticas a la superficie de plásticos tales como el

poliestireno. Los anticuerpos también se unen sin perder la capacidad de unión con el antígeno. De este modo, se pueden preparar placas "sensibilizadas" con antígeno o anticuerpo como primer paso. La unión de estas moléculas con el plástico es tan fuerte que resiste lavados vigorosos con amortiguadores detergentes, mientras que los reactivos que no se pegaron al plástico son eliminados por este tratamiento.

- En pasos subsecuentes se forma un complejo de una o más capas unido a la fase sólida, mientras que el exceso de reactivos se elimina con lavados.
- La enzima conjugada con un antígeno o un anticuerpo retiene la capacidad de interactuar con el sustrato cuando se une al complejo. La adición del sustrato produce un cambio progresivo en el color de la solución; la reacción se detiene en la etapa apropiada y se observa el cambio de color o se mide la densidad óptica.

Los EIA suelen dividirse en dos tipos: **heterogéneos** y **homogéneos**. Los ensayos heterogéneos involucran un paso de separación, en el cual el conjugado enzimático que reaccionó se separa del que no lo hizo por medio de un lavado. Estos ensayos son adecuados para la detección y medición de sustancias con peso molecular elevado (más de 10000). Los ensayos homogéneos se utilizan principalmente para detectar medicamentos o drogas y no tienen ningún paso de separación. En estos ensayos se conjuga un hapteno con una enzima de manera tal que la actividad enzimática se altere cuando el hapteno se une a un anticuerpo. De esta forma, si la muestra contiene al hapteno, éste se unirá al anticuerpo dejando al conjugado libre, el cual degradará al sustrato. Si la muestra es negativa, los anticuerpos se unirán al conjugado modificando su actividad enzimática, por lo que no habrá degradación del sustrato (ver figura 2).

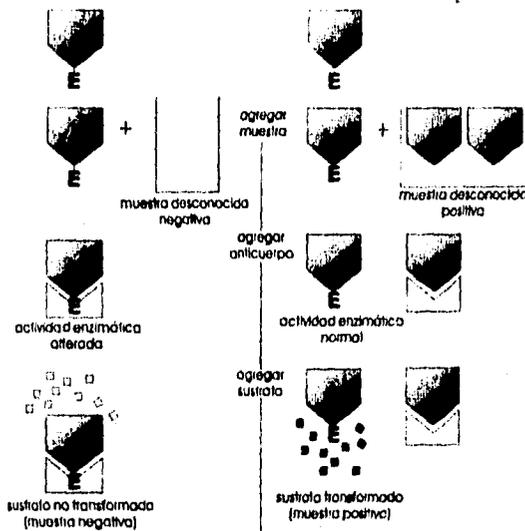


Figura 2 EIA homogénea.

Sin embargo, según Tijssen³¹, el desarrollo de tantos EIA y la falta de una evaluación teórica y estadística como la que se ha hecho a los RIA (radioimmunoassays) ha llevado a varias clasificaciones y a terminologías confusas, que a menudo son engañosas en cuanto a las características fundamentales de los EIA y tienden a ocultar sus méritos relativos. Aquí se expone brevemente la clasificación propuesta por dicho autor, que divide a los EIA en dos grupos: los que se basan en la **amplificación de la actividad** (AA) y los basados en la **modulación** de la misma (AM).

En los ensayos AA, tanto homogéneos como heterogéneos, se usa un exceso de reactivo inmunológico para obtener una señal máxima del compuesto que se mide. Esto

está basado en la ley de acción de masas, pues si se tiene uno de los reactivos en exceso, el otro reaccionará casi por completo.

En cambio, en los ensayos AM se establece una competencia por el mismo reactivo inmunológico entre la molécula a medir y la que está unida a la fase sólida, modulando así la señal enzimática. En este caso, la sensibilidad aumenta si se utilizan concentraciones bajas de reactivos inmunológicos, ya que una variación en la cantidad de moléculas "competidoras" tiene un mayor impacto en la interacción con la especie marcada con la enzima. En este tipo de ensayos la afinidad del anticuerpo es muy importante.

La especificidad de ambos tipos de EIA está determinada por la unicidad de la interacción antígeno-anticuerpo y por factores ambientales. La falta de especificidad se debe a dos fenómenos: la reactividad compartida (cuando antígenos distintos tienen epítopes comunes) y la reactividad cruzada (cuando el mismo anticuerpo se une a epítopes estructuralmente distintos). En los ensayos AA, los antígenos que reaccionan con el mismo anticuerpo formarán complejos en forma proporcional a sus concentraciones (parecerán equipotentes), ya que el anticuerpo está en exceso; en estos ensayos los factores ambientales tienen un efecto relativamente bajo. Sin embargo, en los ensayos AM es importante la potencia relativa (las concentraciones molares que dan una relación idéntica entre el reactivo acomplejado y el reactivo libre) de los reactivos que presentan reactividad cruzada pues los anticuerpos no están en exceso. En este caso las constantes de afinidad son las determinantes principales de la máxima especificidad alcanzable. Los reactivos que dan reacción cruzada normalmente forman complejos con avidez menor que la del antígeno específico; en consecuencia, los ensayos AM son a menudo más específicos que los AA.

La mayoría de los EIA son de alguno de los dos tipos anteriores, AA o AM; aunque debe hacerse notar que, estrictamente, estos términos no son sinónimos de ensayos no competitivos y competitivos (ver tabla 6).

Diseño de EIA	Tipo de ensayo
Heterogéneos no competitivos	AA
Homogéneos no competitivos	AA
Homogéneos competitivos	AM
Heterogéneos competitivos	AM o secuencial (una parte es AM y la otra AA)

Tabla 6 Diseños de los EIA. AA - amplificación de la actividad; AM - modulación de la actividad

La gran variedad de EIA en fase sólida puede parecer confusa respecto a su arreglo y a los requerimientos deseados (medir antígeno o anticuerpo, con alta especificidad o alta detectabilidad). Sin embargo, un análisis de los diversos EIA en fase sólida revela que, independientemente del diseño, se pueden distinguir tres etapas (ver figura 3):

- Unión del reactivo inmunológico de captura a la fase sólida.
- Incubación con la muestra problema, de manera que las moléculas a medir quedan siempre o compiten por la segunda capa.
- Un paso de amplificación en los ensayos AA, que puede estar formado por varias capas de reactivos inmunológicos.

La detectabilidad y la especificidad de estos diseños están dadas por las consideraciones hechas para los ensayos AA y AM; por lo que debe decidirse cuál de estas características es más importante para el ensayo en cuestión.

De los diseños de EIA mencionados en la tabla 6 sólo se considerarán para este trabajo los **heterogéneos competitivos**, pues el EIA por inhibición se encuentra entre ellos.

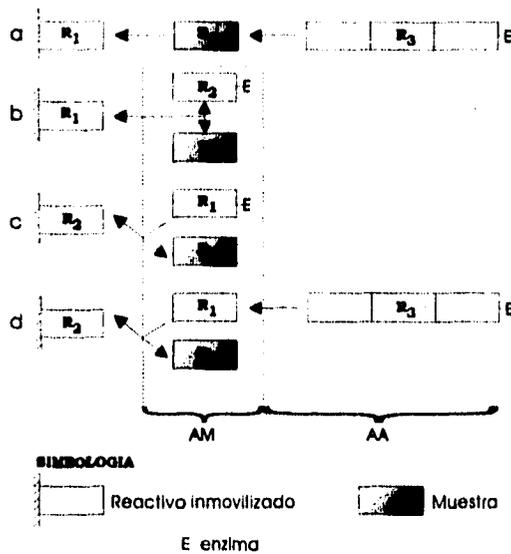


Figura 3 Diseño de EIA en fase sólida. Uno de los reactivos inmunológicos (R_1 o R_2 , generalmente un anticuerpo o un antígeno) se inmoviliza en la fase sólida y sirve para capturar al reactivo complementario de la muestra ("immunoextracción"). Por lo tanto, en los EIA, la sustancia a medir se agrega en la segunda capa. Con R_3 , que puede estar formado por varias capas, se amplifica la señal de la reacción entre R_1 y R_2 .

El primer EIA descrito en 1971 por dos grupos (Van Weemen y Schuurs; Engvall y Perlmann) es también un ensayo heterogéneo competitivo. En este caso se inmoviliza el anticuerpo en la fase sólida y el antígeno se marca con la enzima (conjugado); la unión del conjugado con el anticuerpo inmovilizado se inhibe al añadir antígeno libre (estándar para obtener una curva patrón; o el que contiene la muestra problema). Como hay un número limitado de anticuerpos disponibles, al final del ensayo permanece inmovilizada una cantidad menor de enzima para transformar al sustrato (ver figura 4a); por lo tanto, la

concentración del producto es inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre agregado. Este ensayo es del tipo AM.

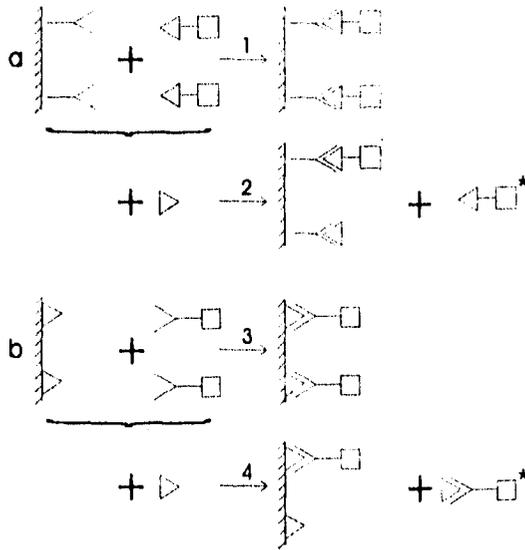


Figura 4 EIA heterógeno competitivo. Hay dos diseños posibles: (a) se inmoviliza el anticuerpo y reaccionan con él tanto el conjugado antígeno-enzima (1), como el antígeno de la muestra (2); (b) el antígeno se inmoviliza y puede reaccionar con el conjugado anticuerpo-enzima (3), que no debe estar en exceso; el antígeno libre de la muestra compite con el antígeno inmovilizado por el conjugado, disminuyendo la cantidad de enzima inmovilizada. El asterisco indica eliminación por lavado. Simbología igual a la de la figura 1.

También puede inmovilizarse el antígeno y marcar al anticuerpo con la enzima. El antígeno estándar o el de la muestra, agregado junto con el conjugado, compite por el anticuerpo (que está en cantidades limitadas) y disminuye así la actividad final (ver figura 4b). Éste también es un ensayo AM. Es posible incrementar la detectabilidad de este

último ensayo haciéndolo indirecto; para esto, el antígeno libre se agrega con antisuero diluido en lugar de anticuerpos conjugados, compite con el antígeno de la fase sólida y evita que una fracción de los anticuerpos queden inmovilizados. En un paso subsecuente, los anticuerpos inmovilizados se detectan con anticuerpos anti-Ig marcados con enzima. Este ensayo (ver figura 3d) es del tipo secuencial, la primera parte es AM y la segunda AA.

Enzimas utilizadas en EIA

Las propiedades que debe tener una enzima para poder ser utilizada en un EIA son las siguientes:

- Alto número de recambio.
- K_m (constante de Michaelis-Menten) baja para el sustrato y alta para el producto.
- Estabilidad durante el almacenamiento.
- Alta pureza.
- Facilidad de preparación.
- Bajo costo.
- Actividad fácilmente detectable.
- Compatibilidad con las condiciones del ensayo (pH, fuerza iónica, composición de los amortiguadores, etc.).
- Además, la muestra no debe contener la enzima ni sustancias que interfieran con la misma.

Ninguna enzima reúne todas las características para ser un marcador ideal en los EIA y debe elegirse la más adecuada para cada tipo de ensayo. Por razones que se

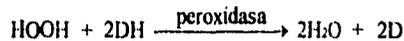
mencionan más adelante. la peroxidasa de rábano. la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa son las enzimas que se usan con mayor frecuencia en los EIA. En la tabla 7 se listan las enzimas utilizadas para los ensayos AA y AM.

Ensayos AA	Ensayos AM*
Peroxidasa	β -galactosidasa
β -galactosidasa	Lisozima
Fosfatasa alcalina	Malato deshidrogenasa
Ureasa	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Glucosa oxidasa	Ribonucleasa
Glucoamilasa	
Anhidrasa carbónica	
Acetilcolinesterasa	

Tabla 7 Enzimas utilizadas en los EIA.

En los EIA en fase sólida, la influencia de ésta sobre la enzima debe ser mínima. La conjugación con el antígeno o el anticuerpo debe ser sencilla y los conjugados activos y estables. Estos son, sin duda, algunos de los factores más importantes por los que se utilizan tan frecuentemente la peroxidasa de rábano y la β -galactosidasa. La fosfatasa alcalina, que es difícil de conjugar en forma definida (ya que se polimeriza), se utiliza ampliamente debido a que no se encuentra en tejidos vegetales y es muy estable.

La peroxidasa (oxidoreductasa del peróxido de hidrógeno, EC 1.11.1.7) es la enzima más utilizada en EIA. La reacción que catalizan es la transferencia de dos protones de un donador al peróxido de hidrógeno:



en donde DH es un donador de protones.

* Las enzimas utilizadas en los ensayos AA pueden usarse también para los AM en fase sólida.

Los donadores de protones más utilizados en EIA son: el ácido 5-aminosalicílico, la *o*-dianisidina, el 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), la *o*-toluidina, la *o*-fenilendiamina y la 3,3',5,5'-tetraetilbenzidina. La *o*-fenilendiamina (OPD) es un donador de protones muy adecuado cuya forma oxidada (color naranja) se puede detectar a bajas concentraciones a 445 o 492 nm, dependiendo del pH. Aunque el desarrollo de color de fondo puede ser significativo, la OPD podría ser el indicador más sensible (aunque hay controversia en este punto); sus desventajas principales son el ser fotosensible y posiblemente mutagénica.

Fases sólidas utilizadas en EIA

Las características deseables de la fase sólida son:

- Alta capacidad para retener a los reactivos inmunológicos (alta relación superficie/volumen).
- Posibilidad de inmovilización de muchos reactivos inmunológicos diferentes.
- Disociación mínima.
- Desnaturalización no significativa de la molécula inmovilizada.
- Orientación de los anticuerpos inmovilizados con los sitios de unión hacia la solución.

Aunque también se utilizan membranas de nitrocelulosa y sustancias particuladas (agarosa, celulosa, poliacrilamida, dextrán), el plástico es por mucho la fase sólida más popular, ya que facilita la realización de los ensayos haciéndolos extremadamente simples. Sin embargo, los plásticos también tienen algunas limitaciones respecto a otros tipos de fase sólida, como el elevado requerimiento de reactivos inmunológicos y la disminución en la cantidad de interacciones antígeno-anticuerpo.

Aunque hay muchas formas de soportes plásticos para EIA, los más comunes son las microplacas de poliestireno o cloruro de polivinilo (PVC) con 96 pozos, cada uno con capacidad de 0.3 mL. El fondo de los pozos puede ser plano, en forma de U o de V y el uso de uno u otro depende del método de lectura del EIA: para las lecturas con fotómetro los de fondo plano dan menos variaciones, mientras que para determinaciones visuales los fondos en U son mejores.

EIA POR INHIBICIÓN ⁸

En el primer paso de estos ensayos se deja reaccionar la solución del antígeno con el anticuerpo conjugado; esto **inhibirá** en el siguiente paso la unión del mismo con el antígeno inmovilizado en la fase sólida (ver figura 1). En los EIA por inhibición, la detectabilidad está determinada por una combinación de la afinidad del anticuerpo y los errores en el manejo.

Si el anticuerpo es monoclonal no es necesario que el antígeno unido a la fase sólida sea un estándar purificado, lo cual es un requisito importante si el anticuerpo es policlonal, ya que el antígeno a medir no inhibiría a los diferentes tipos de anticuerpo en la misma concentración. En este tipo de ensayo la detectabilidad se beneficia muy poco o nada si en lugar de marcar con la enzima al anticuerpo específico contra el antígeno a medir, se agrega un paso con conjugado enzima-antiinmunoglobulina. Aunque la conveniencia de este paso adicional podría considerarse si se utilizan anticuerpos monoclonales en el primer paso.

OBJETIVOS

General

Adaptar un ensayo inmunoenzimático (EIA) que permita cuantificar proteína de soya en salchichas.

Particulares

- a) Producir un anticuerpo contra proteína de soya renaturalizada después de un tratamiento desnaturizante con urea y mercaptoetanol.
- b) Comprobar la especificidad del anticuerpo anterior con Western-blot.
- c) Adaptar un EIA por inhibición con el anticuerpo obtenido.
- d) Aplicar el EIA a salchichas con una concentración conocida de proteínas de soya para probar la efectividad del método.

METODOLOGÍA

Para este trabajo se decidió utilizar el método oficial de la AOAC para la detección de proteína de soya en productos cárnicos¹, debido a que ha sido probado extensivamente²², a la disponibilidad de los reactivos y aparatos necesarios para ponerlo en práctica y a que los productos de soya utilizados normalmente en salchichas (aislado y concentrado³⁵) pueden detectarse de manera aceptable por este método¹². Sin embargo, fue necesario hacerle ciertas modificaciones (se detallan en la página 35) para adaptarlo al laboratorio y optimizar las condiciones del ensayo.

A pesar de lo mencionado en los antecedentes respecto al uso de anticuerpos comerciales, se decidió obtener el anticuerpo contra proteína de soya en lugar de comprarlo, ya que la Facultad de Química (institución en la que se realizó este trabajo) cuenta con las facilidades para producirlo.

La secuencia general de actividades para el presente trabajo puede observarse en la figura 5.

Obtención de los inmunógenos:

Se prepararon dos tipos de inmunógeno para inyectar al conejo (ver anexo I). El primero era un extracto de proteína total de soya y el segundo era proteína de soya tratada de la misma forma que los estándares para el EIA por inhibición, aunque en este caso la renaturalización no se hizo por dilución sino por diálisis contra amortiguador de fosfatos,

ya que era necesario eliminar la urea y el 2-mercaptoetanol para poder inyectar el extracto al conejo, pues ambos compuestos son tóxicos.

Se determinó la cantidad de proteína (ver anexos II y III) en ambos inmunógenos antes y después de esterilizar (ver tabla 8).

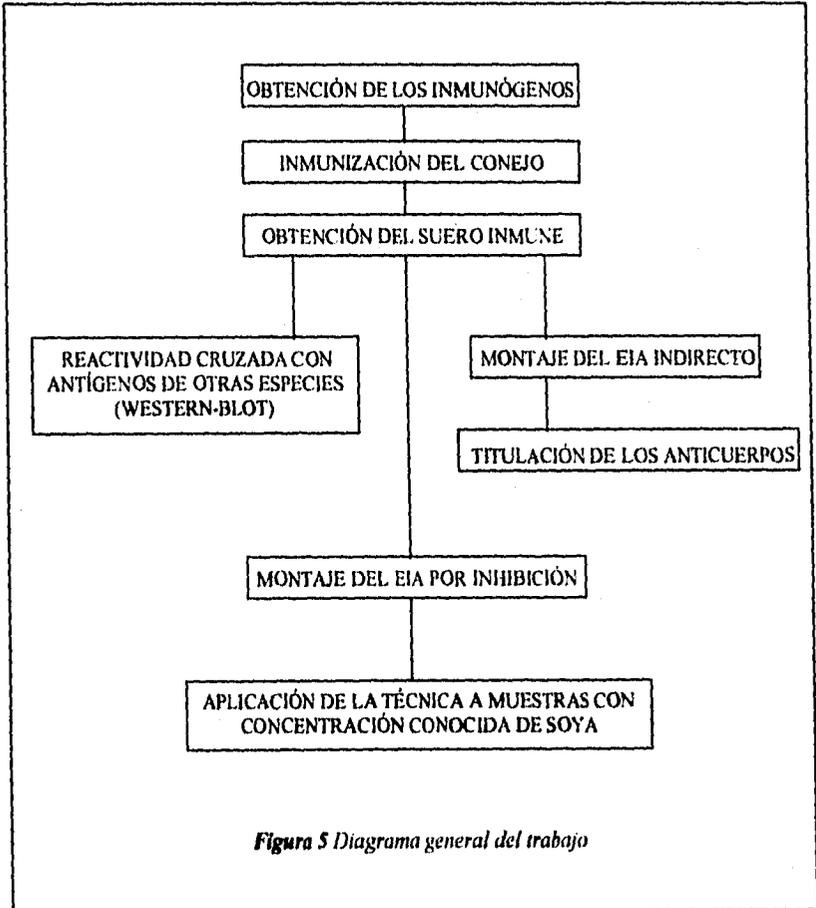


Figura 5 Diagrama general del trabajo

Muestra	Proteína (mg/mL)
Extracto de proteína total	
Antes de esterilizar	5.9
Después de esterilizar	4.4
Extracto renaturalizado (dializado)	
Antes de esterilizar	15.6
Después de esterilizar	15.5

Tabla 8 Concentración de proteína de los inmunógenos.

Inmunización del conejo y obtención del suero inmune:

El extracto de proteína de soya renaturalizada se diluyó con amortiguador de fosfatos (PBS) estéril hasta tener una concentración de proteínas de 3mg/mL. El extracto de proteína total de soya se utilizó sin diluir. Ambos extractos fueron esterilizados por filtración (ver anexo I). El conejo fue inmunizado según el esquema de la figura 6.

Se hicieron dos sangrías de prueba, se separó el suero (ver anexo IV) y se determinó la presencia de anticuerpos contra proteína de soya por la técnica de Ouchterlony (ver anexo V). Desde la primer sangría de prueba se detectaron anticuerpos, pero se inyectó una vez más al conejo para obtener un título más alto. La segunda sangría de prueba dio un suero con título 1:64 (por Ouchterlony), por lo que se realizó la sangría de cosecha obteniéndose 25mL de suero.

Semana	Día	Volumen (mL) ^a	Adyuvante (mL)	Tipo de inyección
1	1	0.5	0.5	intramuscular
	3	0.5	-	subcutánea
	5	1.0	-	subcutánea
2	1	1.0	1.0	intramuscular
	3	1.0	-	subcutánea
	5	1.5	-	subcutánea
3	1	1.0	1.0	intramuscular
	3	1.5	-	subcutánea
	5	2.0	-	subcutánea
4	DESCANSO			
5	SANGRÍA DE PRUEBA			
6	1	3.0	-	intraperitoneal
7	DESCANSO			
8	SANGRÍAS DE PRUEBA Y DE COSECHA			

Figura 6 Esquema de inmunización.

Montaje del EIA indirecto y titulación del anticuerpo:

Para este EIA (ver anexo VI) se sensibilizaron las microplacas con proteína de soya renaturalizada y dializada (40ng de proteína por pozo). Se hicieron las siguientes diluciones del anticuerpo contra proteína de soya y del suero de conejo sin el anticuerpo (obtenido antes de iniciar el esquema de inmunización): 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 y 1:10000. El conjugado se diluyó 1:40000.

^a Se refiere al volumen de extracto diluido de proteína de soya renaturalizada, a excepción de la primera inyección, que es de extracto de proteína total.

Reactividad cruzada con antígenos de otras especies por Western-blot (anexo VII):

Se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (al 15%) las siguientes muestras:

- Los extractos de soya total y de soya renaturalizada y dializada utilizados como inmunógenos
- Un extracto de soya renaturalizada preparado de la misma forma que la anterior, pero en lugar de dializarlo solamente se diluyó.
- Fécula de papa y carnes de puerco, res y pavo: se preparó polvo de acetona de cada una de ellas (ver anexo X) y se les trató de la misma forma que a la soya renaturalizada anterior.

Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se trataron con el anticuerpo contra proteína de soya. Después se revelaron las membranas para detectar con cuáles proteínas reaccionaba el anticuerpo.

Montaje del EIA por inhibición (anexo VIII):

Determinación de la cantidad óptima de antígeno y de la dilución del anticuerpo:

Primero se determinaron simultáneamente la cantidad óptima de antígeno (soya renaturalizada) para sensibilizar los pozos de la microplaca y la dilución más adecuada del anticuerpo contra proteínas de soya (anexo VIII-1). Las cantidades de antígeno que se probaron fueron 25, 50, 100 y 200ng por pozo; ya que el método de la AOAC¹ indicaba

200ng, pero en el EIA para titular el anticuerpo se utilizaron 40ng obteniéndose buenos resultados. Las diluciones del anticuerpo que se probaron fueron 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000; porque la titulación del anticuerpo por EIA sugería que, si se utilizaba una dilución mayor, la diferencia entre la respuesta del anticuerpo anti-proteína de soya y la del suero control sería menor a una unidad de absorbancia (ver la figura 7 en la página 39).

Bloqueo:

Después se determinó la cantidad adecuada de albúmina para el bloqueo (ver anexo VIII-2). Se probaron concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3% de BSA (albúmina sérica bovina) en PBS-Tween. Además, se utilizaron dos microplacas sin bloqueo para compararlas con las anteriores y, al mismo tiempo, determinar la variabilidad entre microplacas y dentro de ellas.

Curva patrón de proteína de soya:

Una vez determinados los parámetros mencionados anteriormente, se corrió la curva patrón del EIA por inhibición (ver anexo VIII-3). Como estándar se utilizó la misma disolución de soya renaturalizada que se usó para sensibilizar las microplacas y los puntos de la curva patrón correspondían a las siguientes concentraciones de proteína de soya: 300, 100, 33.333, 11.111, 3.704, 1.234, 0.412, 0.137 y 0.046µg/ml..

El ensayo está basado en el de la AOAC¹, aunque se adaptó para el anticuerpo obtenido en el laboratorio y para utilizar un conjugado con peroxidasa en lugar de fosfatasa alcalina. Las adaptaciones anteriores representaron las siguientes modificaciones: disminuir la cantidad de antígeno para sensibilizar las microplacas,

bloquear las microplacas con BSA (la técnica original no incluye el bloqueo) y eliminar la azida de sodio del PBS-Tween (la peroxidasa se inhibe con la NaN_3). A su vez, esto último hizo necesario otros cambios: (i) para sensibilizar las microplacas, en lugar de incubar 16h a 37°C se dejó secar al vacío toda la noche a temperatura ambiente; (ii) las cuatro incubaciones que se hacen durante el ensayo (para el bloqueo; después de agregar el anticuerpo a la microplaca; después de añadir el conjugado y después de agregar el sustrato) también se hicieron a temperatura ambiente y no a 37°C ; y (iii) el tiempo de incubación con el sustrato se bajó de 30 a 10 minutos.

Aplicación del EIA por inhibición a salchichas con concentración conocida de proteína de soya (anexo XI):

Se elaboraron seis tipos distintos de salchichas: cinco con concentraciones conocidas de proteína de soya y uno sin soya (ver anexo IX). Después se preparó polvo de acetona (ver anexo X) de cada tipo de salchicha y se les determinó el contenido de proteína total por el método de digestión en bloque² (ver tabla 9). Las salchichas del tipo 3 no se utilizaron porque el contenido de proteína total resultó menor al esperado.

Salchicha	% de proteína total (F=6.25)
Sin soya	50.42
Tipo 1	55.08
Tipo 2	55.79
Tipo 3	53.22
Tipo 5	57.18
Tipo 10	59.45

Tabla 9 Contenido de proteína total de los polvos de acetona de las salchichas

De cada tipo de polvo de acetona se pesó una cantidad correspondiente a 95-105mg de proteína, que después fue sometida a un tratamiento desnaturalizante con urea, 2-mercaptoetanol y calentamiento. Las disoluciones resultantes se diluyeron y fueron analizadas mediante un EIA por inhibición.

RESULTADOS

Suero anti-proteína de soya:

Desde la primer sangría de prueba se determinó por la técnica de doble difusión en agar (Ouchterlony) que se habían producido anticuerpos contra la proteína de soya en cantidades detectables; pero se reforzó con otra inyección al conejo para aumentar el título. Con esto se obtuvieron 25mL de suero con un título de 1:64 (por Ouchterlony).

Titulación del anticuerpo por EIA:

En este caso se entiende como título del anticuerpo la mayor dilución del mismo que da una absorbancia superior a la de la menor dilución del control negativo. La titulación se hizo por triplicado; en la tabla 10 se muestran las medias de los valores de absorbancia obtenidos para las diluciones del anticuerpo y el suero negativo. En la figura 7 se pueden observar los mismos valores en forma gráfica.

Dilución	Absorbancia promedio (490nm)	
	Anticuerpo	Control negativo
1:100	2.485	0.476
1:1000	1.210	0.104
1:2000	0.761	0.074
1:3000	0.574	0.066
1:4000	0.420	0.062
1:10000	0.298	0.057

Tabla 10 Titulación del anticuerpo anti-proteína de soya por EIA.

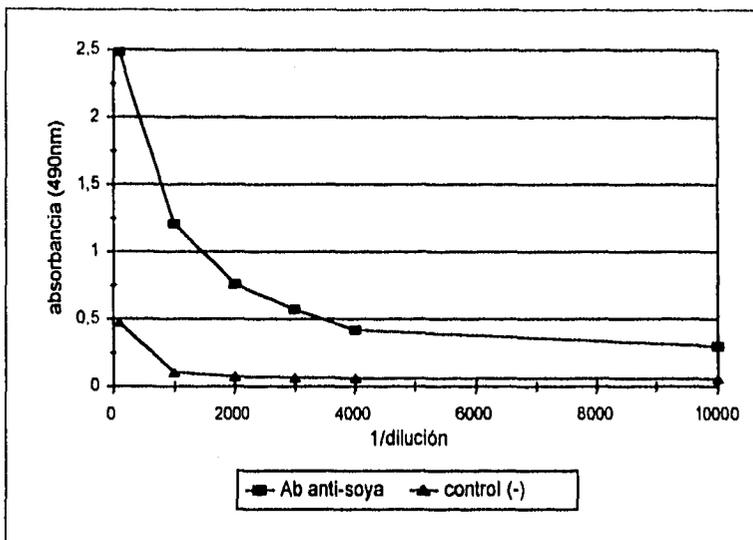


Figura 7 Titulación del anticuerpo anti-proteína de soya por EIA.

El título por EIA del anticuerpo anti-proteína de soya es, por lo tanto, de 1:3000.

Reactividad cruzada con antígenos de otras especies por Western-blot:

En los geles de poliacrilamida (al 15%) teñidos con azul de Coomassie no se observaron diferencias entre el patrón de bandas del extracto de soya renaturalizada y dializada y el de soya renaturalizada por dilución; por lo tanto se consideraron como idénticos para este trabajo. El extracto de soya total, en cambio, presentó más bandas, especialmente en la región de los pesos moleculares bajos (entre 14200 y 24000). Las

muestras de carnes de puerco, res y pavo dieron patrones similares entre sí; mientras que la muestra de papa produjo solamente cinco bandas detectables.

Mediante los Western-blot se determinó que los anticuerpos obtenidos no reaccionan con ninguna de las bandas producidas por las proteínas de papa, pavo, puerco o res, sino que sólo detectan a las proteínas de soya extraídas en condiciones desnaturalizantes (con urea y mercaptoetanol) y a las que se extrajeron con un amortiguador Tris-HCl (extracto de soya total).

Montaje de EIA por inhibición:

Determinación de la cantidad óptima de antígeno y de la dilución del anticuerpo:

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la cantidad óptima de antígeno para sensibilizar los pozos y la dilución más adecuada del anticuerpo anti-proteína de soya. Esta determinación se hizo tres veces pero se muestran los resultados de un sólo experimento.

Dilución del anticuerpo	Absorbancia a 490 nm					
	Controles			Controles		
	sin Ab	sin soya	todo	sin Ab	sin soya	todo
1:100	0.087	0.419	2.355	0.091	0.398	2.347
1:250	0.077	0.240	2.327	0.070	0.224	2.315
1:500	0.075	0.162	2.196	0.075	0.140	2.113
1:1000	0.083	0.091	1.705	0.072	0.095	1.474
	100 ng de antígeno			50 ng de antígeno		

Tabla 11 Determinación de la cantidad óptima de antígeno para sensibilizar las microplacas y de la dilución más adecuada del anticuerpo anti-proteína de soya. Ab=anticuerpo anti-proteína de soya; sin soya=no se sensibilizaron los pozos; todo=la determinación propiamente dicha.

muestras de carnes de puerco, res y pavo dieron patrones similares entre sí; mientras que la muestra de papa produjo solamente cinco bandas detectables.

Mediante los Western-blot se determinó que los anticuerpos obtenidos no reaccionan con ninguna de las bandas producidas por las proteínas de papa, pavo, puerco o res, sino que sólo detectan a las proteínas de soya extraídas en condiciones desnaturalizantes (con urea y mercaptoetanol) y a las que se extrajeron con un amortiguador Tris-HCl (extracto de soya total).

Montaje de EIA por inhibición:

Determinación de la cantidad óptima de antígeno y de la dilución del anticuerpo:

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la cantidad óptima de antígeno para sensibilizar los pozos y la dilución más adecuada del anticuerpo anti-proteína de soya. Esta determinación se hizo tres veces pero se muestran los resultados de un sólo experimento.

Dilución del anticuerpo	Absorbancia a 490 nm					
	Controles			Controles		
	sin Ab	sin soya	todo	sin Ab	sin soya	todo
1:100	0.087	0.419	2.355	0.091	0.398	2.347
1:250	0.077	0.240	2.327	0.070	0.224	2.315
1:500	0.075	0.162	2.196	0.075	0.140	2.113
1:1000	0.083	0.091	1.705	0.072	0.095	1.474
	100 ng de antígeno			50 ng de antígeno		

Tabla II Determinación de la cantidad óptima de antígeno para sensibilizar las microplacas y de la dilución más adecuada del anticuerpo anti-proteína de soya. Ab= anticuerpo anti-proteína de soya; sin soya= no se sensibilizaron los pozos; todo= la determinación propiamente dicha.

Sólo se muestran los resultados para 100 y 50ng de proteína, ya que se observó desde el primer ensayo que sensibilizar con 200 y 25ng daba absorbancias muy altas para los controles en el primer caso y muy bajas para la determinación en el segundo. Con base en los resultados anteriores, se decidió utilizar **100ng de antígeno** por pozo para sensibilizar y la **dilución 1:1000** del anticuerpo anti-proteína de soya, ya que esta combinación da absorbancias bajas con los controles y altas con el anticuerpo.

Bloqueo:

La determinación de la cantidad adecuada de albúmina para el bloqueo se hizo dos veces y los resultados del segundo experimento pueden observarse en la tabla 12 (no se muestran los resultados para la albúmina al 2 y 3%).

CON BLOQUEO (Absorbancia a 490 nm)						
Dilución del anticuerpo	BSA al 0.5%			BSA al 1%		
	Controles		todo	Controles		todo
	sin Ab	sin soya		sin Ab	sin soya	
1:100	0.048	0.318	2.144	0.042	0.364	2.055
1:250	0.045	0.151	2.006	0.038	0.142	1.828
1:500	0.045	0.102	1.783	0.036	0.096	1.614
1:1000	0.044	0.073	1.482	0.036	0.070	1.293
SIN BLOQUEO (Absorbancia a 490 nm)						
Dilución del anticuerpo	Microplaca 1			Microplaca 2		
	Controles		todo	Controles		todo
	sin Ab	sin soya		sin Ab	sin soya	
1:100	0.086	0.390	2.193	0.087	0.363	2.208
1:250	0.080	0.184	2.064	0.081	0.190	2.071
1:500	0.087	0.127	1.828	0.080	0.127	1.792
1:1000	0.082	0.091	1.446	0.082	0.087	1.368

Tabla 12 Determinación de la cantidad óptima de albúmina sérica bovina (BSA) para el bloqueo. Ab= anticuerpo anti-proteína de soya; sin soya=no se sensibilizaron los pozos; todo=la determinación propiamente dicha.

Se decidió **bloquear** con la disolución de albúmina sérica bovina (BSA) al **0.5%**, porque se obtienen valores de absorbancia más pequeños para los controles que en las placas sin bloqueo.

Cálculo de la variabilidad:

Los datos de las dos microplacas sin bloqueo del experimento anterior se utilizaron para determinar la variabilidad (como coeficientes de variación). En la tabla 13 se muestran las dos medias (obtenidas a partir de seis datos de absorbancia cada una) por placa obtenidas para cada dilución del anticuerpo anti-proteína de soya.

Ensayo	1:100		1:250		1:500		1:1000	
	Medias		Medias		Medias		Medias	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	2.187	2.199	2.063	2.064	1.825	1.830	1.439	1.453
2	2.204	2.212	2.071	2.071	1.791	1.793	1.365	1.370

Tabla 13 Datos para el cálculo de la variabilidad entre microplacas y dentro de las mismas.

A continuación se ilustra el cálculo de los coeficientes de variación con la dilución 1:100³¹:

Ensayo	Media (de 6 determinaciones)		Media	Desv. estándar
	1	2		
1	2.187	2.199	2.193	0.008485
2	2.204	2.212	2.208	0.005657
Media	2.1955	2.2055	2.2005	0.007071
Desv. estándar	0.012021	0.009192	0.010607	

Desviación estándar (DS) dentro de las microplacas:

$$\frac{\overline{DS}}{\sqrt{r}} = \frac{0.007071}{\sqrt{6}} = 0.002887$$

en donde r es el número de réplicas de cada muestra y \overline{DS} la desviación estándar promedio.

Desviación estándar entre microplacas:

$$\left[\left(DS \text{ de } \overline{X} \right)^2 - \left(\left(\overline{DS} \right)^2 / r \right) \right]^{1/2} = \left[(0.010607)^2 - \left((0.007071)^2 / 6 \right) \right]^{1/2} = 0.010206$$

en donde \overline{X} es la media de las medias.

Coefficiente de variación (CV) dentro de las microplacas:

$$\frac{\overline{DS}}{\overline{X}} \cdot \sqrt{r} \cdot 100 = \frac{0.007071}{2.2005} \cdot \sqrt{6} \cdot 100 = 0.787117$$

Coefficiente de variación entre microplacas:

$$\frac{DS \text{ entre microplacas}}{\overline{X}} \cdot 100 = \frac{0.010206}{2.2005} \cdot 100 = 0.463813$$

En la tabla 14 se observan los coeficientes de variación entre microplacas y dentro de las mismas para las cuatro diluciones.

	Dilución			
	1:100	1:250	1:500	1:1000
DS dentro	0.00289	0.00014	0.00101	0.00274
DS entre	0.01020	0.00530	0.02508	0.05544
CV dentro	0.787	0.042	0.335	1.170
CV entre	0.464	0.256	1.386	3.941

Tabla 14 Variabilidad dentro y entre microplacas. DS = desviación estándar; CV = coeficiente de variación; entre = entre microplacas; dentro = dentro de las microplacas.

Curva patrón de proteína de soya:

Con todos los parámetros mencionados en este apartado ya establecidos, se corrió una curva patrón de proteína de soya renaturalizada en nueve concentraciones diferentes. En la tabla 15 se encuentran las absorbancias obtenidas para cada dilución del estándar de soya y en la figura 8 pueden verse gráficamente.

Proteína de soya ($\mu\text{g/mL}$)	A (490 nm)
300	0.082
100	0.098
33.3333	0.131
11.1111	0.233
3.7037	0.446
1.2346	0.781
0.4115	1.197
0.1372	1.471
0.0457	1.569
BS	0.043
BC	0.046
BP	1.633
BN	0.085

Tabla 15 Datos de la curva patrón de proteína de soya (EIA por inhibición). BS = control del sustrato; BC = control del conjugado; BP = control positivo; BN = control negativo.

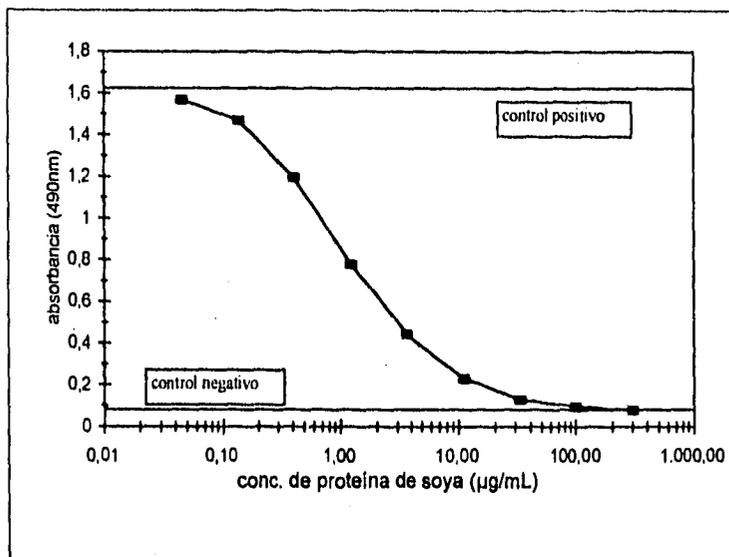


Figura 8 EIA por inhibición. Curva patrón de proteína de soja.

Aplicación del EIA por inhibición a salchichas con concentración conocida de proteína de soja:

El análisis de las muestras de salchichas mediante el EIA por inhibición da como resultado una serie de datos de absorbancia que deben transformarse a concentración de proteína de soja. Los cálculos necesarios para esta conversión se ejemplifican en el anexo XII.

Una vez transformados los resultados de todas las determinaciones a concentraciones de proteína de soya, se obtuvieron la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada tipo de salchicha analizado (ver tabla 16).

Salchicha	Contenido real de proteína de soya*	Contenido de proteína de soya estimado por EIA*			
		Media	No.de determinaciones	DS	CV
Sin soya	0	0.18	9	0.01563	8.79
Tipo 1	8.95	9.14	13	0.58057	6.35
Tipo 2	16.72	18.99	6	2.464	12.98
Tipo 5	34.86	45.71	5	6.786	14.84
Tipo 10	54.63	65.47	5	4.920	7.51

* En porcentaje de proteína de soya respecto a proteína total.

Tabla 16 Determinación del contenido de proteína de soya mediante EIA por inhibición. DS=desviación estándar; CV=coeficiente de variación.

Se hicieron pruebas *t* de Student¹⁸ para determinar si el contenido de proteína de soya estimado por EIA era significativamente distinto al contenido real. Las *t* se calcularon con la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

en donde \bar{x} es la media obtenida por EIA a la cual se resta el valor dado por la salchicha sin soya (0.18), μ el contenido real de proteína de soya, *s* la desviación estándar y *n* el número de determinaciones. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Ho: $\bar{x} = \mu$; Ha: $\bar{x} \neq \mu$; $\alpha=0.05$			
Salchicha	t calculada	t de tablas ($\alpha/2$)	Rechazo (si $ t > t$ de tablas)
Tipo 1	0.062	2.179	Se acepta Ho.
Tipo 2	2.078	2.571	Se acepta Ho.
Tipo 5	3.516	2.776	Se rechaza Ho.
Tipo 10	4.845	2.776	Se rechaza Ho.

Tabla 17 Pruebas t de Student para determinar si hay diferencias significativas entre el valor de proteína de soya obtenido por EIA y el contenido real.

Si se define al límite de detección como la cantidad que difiere de la media del blanco por tres desviaciones estándar⁴, este ensayo puede detectar en las salchichas analizadas hasta un 0.23% de proteína de soya respecto a la proteína total.

DISCUSIÓN

Una de las desventajas de los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) es la dificultad intrínseca de la caracterización de los reactivos inmunológicos, debida a que la respuesta analítica depende no solamente de la concentración del analito, sino también de la afinidad y heterogeneidad del anticuerpo utilizado; de hecho, para fines prácticos, cada anticuerpo puede considerarse como un analito único. Esta situación es especialmente importante en los EIA para caracterizar anticuerpos, pues no existen métodos de referencia independientes como los que puede disponerse para antígenos, lo que hace necesaria una buena estandarización del antígeno respectivo previa a la estandarización de un anticuerpo, mientras que lo contrario no es un requisito indispensable. Además, la normalización de los anticuerpos se complica por la gran variedad de formas de reportar los resultados¹⁴.

En este trabajo, para caracterizar al anticuerpo obtenido, se utilizó el método de titulación (titration o end-point titration)^{8, 14, 31} que es uno de los más comúnmente empleados. El título obtenido fue de 1:3000; sin embargo, ésta no fue la dilución del anticuerpo utilizada para los ensayos siguientes, sino 1:1000, pues se encontró experimentalmente que ésta era la más adecuada. Esto debido a que el utilizar la dilución del título (1:3000) implica trabajar cerca del límite de detección, lo cual va en contra de las prácticas analíticas comunes, pues aumenta la incertidumbre de la respuesta¹⁴. Además, puede observarse en la figura 7 que, de utilizar la dilución 1:3000, la mayor diferencia que se podía obtener entre las respuestas del anticuerpo anti-proteína de soya y el suero control era de 0.5 unidad de absorbancia, mientras que al diluir 1:1000 la diferencia aumentaba a 1.1 unidades.

Otra parte importante de la caracterización de un anticuerpo obtenido para utilizarse en un EIA, es determinar si existen reacciones cruzadas con otros antígenos para evaluar la especificidad del anticuerpo. En este caso se hicieron Western-blot con proteínas de soya, papa, pavo, puerco y res (porque se utilizan frecuentemente en la elaboración de salchichas), determinándose que el anticuerpo reacciona exclusivamente con las proteínas de soya, independientemente de si fueron desnaturalizadas o no. Esto se esperaba así, ya que en la literatura se habían encontrado varias referencias^{11, 12, 13, 26, 34} que indicaban una gran especificidad en la respuesta de los anticuerpos producidos contra proteína de soya.

El cálculo de la variabilidad dentro y entre microplacas se hizo principalmente para determinar si el procedimiento y/o los errores por manipulación provocaban variaciones grandes, especialmente de un ensayo a otro. Para un EIA satisfactorio, se considera que la variabilidad, expresada como coeficientes de variación, debe ser menor al 10%³¹ y en este caso todos los coeficientes de variación obtenidos fueron menores al 4%.

En los resultados obtenidos con la aplicación del EIA por inhibición a salchichas con concentraciones conocidas de soya puede observarse en primer lugar que el ensayo es cualitativo, pues permite diferenciar entre una muestra de salchicha sin proteína de soya y otra que la contenga. Sin embargo, surgen problemas con la cuantitatividad: el contenido de proteína de soya en la salchicha tipo 1 pudo estimarse con precisión y exactitud muy buenas, como lo indican respectivamente el coeficiente de variación (ver tabla 16) y el que no haya diferencia significativa entre la media obtenida por EIA y el contenido real de proteína de soya (ver tabla 17); para la salchicha tipo 2, aunque la prueba de *t* no indica diferencias entre la media obtenida por EIA y el contenido real, la precisión ya no es tan buena (el CV es mayor a 10); en los casos de las salchichas tipos 5 y 10 es especialmente notoria la falta de exactitud. Esto no puede atribuirse a errores por

manipulación, ya que si éste fuera el caso, las determinaciones hechas a las salchichas con concentraciones menores de soya también se verían afectadas. Para explicar dichas variaciones se consultó el estudio hecho hacia 1984 para obtener la aprobación del EIA por inhibición como método oficial de la AOAC²² y se encontró que no se hicieron pruebas con salchichas con concentraciones de proteína de soya mayores al 2.8%, pero se observó que todas las determinaciones tendían a dar resultados mayores (alrededor del 15%) respecto al contenido real, como sucede en este trabajo. La causa de dichas sobrestimaciones se atribuye en dicho estudio exclusivamente al uso de distintos tipos de proteína de soya, pero otras fuentes de variación en este tipo de EIA podrían influir en los resultados; por ejemplo, se ha reportado que el uso de polvos de acetona da resultados muy variables debido a problemas de homogeneidad por la distribución de la proteína de soya en el polvo; además, no se encontró ningún reporte que mencionara la influencia de los componentes del polvo de acetona que no son proteína de soya sobre los resultados, aunque en este trabajo se observó que es muy probable que exista, pues la salchicha sin soya da respuesta, aunque sea mínima. Por otro lado, el reporte de la evaluación hecha en 1989 por el gobierno austriaco de un EIA comercial inglés para la determinación de proteína de soya en productos cárnicos¹⁹, presenta datos similares en cuanto a exactitud y precisión a los obtenidos en este trabajo para las salchichas tipo 5 y tipo 10 y los califica como aceptables, atribuyendo las variaciones a la extracción de las proteínas y la preparación de las muestras.

El límite de detección obtenido para el EIA de este trabajo (0.23%) resulta muy adecuado tomando en cuenta que las cantidades de soya añadidas a las salchichas suelen ser mucho mayores para que surtan los efectos deseados.

Cabe mencionar también que el uso de polvos de acetona tiene otras desventajas además del incremento en la variabilidad de los resultados; la primera de ellas es el

enorme volumen de disolventes que se requiere para prepararlos, pues se gastan 600mL de cada uno por muestra; la otra desventaja es que, después de la desnaturalización en baño de agua en ebullición, la disolución tiene que transferirse caliente al matraz volumétrico para evitar que la urea cristalice, pero este procedimiento afecta la calibración del matraz.

Un problema que tampoco debe desestimarse es la forma en que se reportan los resultados. En cuanto a claridad para el fabricante de las salchichas la mejor sería en porcentaje de proteína de soya respecto al peso de la salchicha, pero no es sencillo hacerlo porque la cantidad de agua que se agrega en la fabricación de la salchicha depende del producto de soya que se está utilizando y es muy variable, por lo tanto, si quiere predecirse la cantidad de agua tiene que hacerse un análisis de retención de agua previo a la elaboración de las salchichas o medirla conforme se agrega, lo que puede ser complicado a nivel industrial. Por otra parte, el reportar en porcentaje de proteína de soya respecto a la proteína total es más exacto, aunque esta forma no es tan clara como la anterior; además se requiere hacer una determinación de proteína total.

Otro punto que es importante destacar es la falta de congruencia entre las diferentes normas que regulan los aditivos permitidos en los productos cárnicos, así como los errores encontrados en las mismas. Uno de los errores más graves es la omisión de los métodos de prueba para los aditivos cuya concentración se está regulando; por ejemplo, en el caso del aislado y el concentrado de soya en la NOM-122-SSA1-1994²⁰ se establece un máximo de 2.0% para el primero y de 3.5% para el segundo sin proponer un método de detección; pero además, el poner límites distintos a dichos derivados de la soya implica que dicho método debe poder no sólo detectar la proteína de soya, sino ser capaz de discriminar entre el aislado y el concentrado, lo cual no ha sido reportado hasta ahora. Además, esta misma norma no indica si los porcentajes que establece como máximos para

los aditivos son respecto al peso del producto terminado o de las materias primas, ni si se trata de peso seco o húmedo; tampoco incluye a otros productos de la soya, como las harinas, las sémolas y los texturizados, que también se utilizan en la elaboración de productos cárnicos. También debe hacerse notar que dicha norma, a pesar de citarlo en su bibliografía, está en desacuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios²⁷, pues en su artículo 490 indica que el aislado de soya debe adicionarse con 0.1% de dióxido de titanio como rastreador. Indicación difícil de cumplir dado que, según la Asociación Americana de Soya, en México ningún productor de aislado de soya agrega dióxido de titanio a sus productos. Por otro lado, la Norma Oficial Mexicana para salchichas²¹ vigente no menciona las limitaciones impuestas al contenido de proteína de soya en salchichas por la NOM-122-SSA1-1994 ni por el Reglamento de la Ley General de Salud mencionado.

CONCLUSIONES

Los objetivos de este trabajo se cumplieron satisfactoriamente y a partir de los resultados obtenidos puede concluirse que:

- Los extractos de proteína de soya fueron antigénicos, porque se obtuvo un anticuerpo contra proteína de soya con un título de 1:3000 por EIA.
- El anticuerpo fue específico, pues reconocía selectivamente a las proteínas de soya entre otros antígenos (proteínas de res, cerdo, pavo y papa). Además reconocía a las proteínas de soya independientemente de si fueron desnaturalizadas o no.
- El EIA por inhibición distinguió perfectamente entre una muestra sin proteína de soya y otra que la contuviera, con un límite de detección del 0.23% (gramos de proteína de soya /100 gramos de proteína total).
- El EIA por inhibición permitió cuantificar el contenido de proteína de soya en salchichas cuando éste era bajo (1-2%). A mayores concentraciones disminuyeron tanto la precisión como la exactitud, pero las variaciones son similares a las de otros estudios reportados en la literatura.

De los resultados obtenidos en este trabajo y la revisión bibliográfica se puede concluir también que los EIA son los métodos más adecuados para detectar proteína de soya en productos cárnicos, aunque es necesario mejorar la exactitud de la cuantificación.

Para otros trabajos sobre este método de detección de proteína de soya se hacen las siguientes recomendaciones:

- Revisar y, si es posible, modificar la preparación de las muestras, ya que el uso de polvos de acetona tiene varias desventajas importantes.
- Evaluar la mejor forma de reportar los resultados de la cuantificación, si como gramos de proteína de soya por 100 gramos de proteína total ó gramos de proteína de soya por cien gramos de producto cárnico (en este caso salchicha).
- Revisar a fondo las normas oficiales y otras reglamentaciones que regulan el uso de derivados de soya en productos cárnicos, con el objetivo de corregirlas y hacerlas congruentes entre sí.

ANEXOS

Los reactivos utilizados para todos los experimentos eran grado R.A.

I. OBTENCIÓN DE LOS INMUNÓGENOS:

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Potenciómetro Jenway 3020.
- Parrilla magnética Corning, PC-351.
- Centrifuga Damon/IEC Division, modelo IEC HT.
- Autoclave.
- 1 espátula.
- 1 vaso de precipitados de 100 mL.
- 1 agitador de vidrio.
- 2 vasos de precipitados de 1000 mL.
- 1 matraz volumétrico de 100 mL.
- 2 matraces volumétricos de 1000 mL.
- Agitadores magnéticos.
- Membrana para diálisis #24 de CMS, (se hierve en agua desionizada antes de usarse).
- Tubos de ensayo graduados de 10 mL con tapón.
- Probeta de 2000 mL.
- 1 Swinnex-25 de Millipore.*
- Membranas Millipore tipo GV 0.22 μm .*
- 10 frascos viales con tapón de plástico.*

Reactivos:

- 100 mL de amortiguador Tris-HCl: tris(hidroximetil)metilamina 0.25 M; ajustado a pH 8.6 con HCl.
- 6000 mL de amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.2: disolución A, 10% v/v; disolución B, 10% v/v.
- 1000 mL de disolución A: NaCl, 8% p/v; KCl, 0.2% p/v; CaCl₂, 0.1% p/v; MgCl₂·6H₂O, 0.1% p/v.
- 1000 mL de disolución B: Na₂HPO₄, 1.15% p/v; KH₂PO₄, 0.2% p/v.
- Acido clorhídrico concentrado.
- Proteína aislada de soya Suppry, 91.5%.

* Antes de utilizarlos, esterilizar en autoclave.

- Urea.
- 2-mercaptoetanol.
- Soya molida y desengrasada.
- Agua destilada y desionizada.

Técnicas:

Para el extracto de proteína total de soya:

- Se pesaron 125 mg de proteína aislada de soya y 125 mg de soya molida y desengrasada.
- Se agregaron 10 mL de amortiguador Tris-HCl.
- La disolución anterior se agitó en la parrilla magnética durante 1 hora.
- Se centrifugó durante 10 minutos a 12000 r.p.m., recuperando el sobrenadante.
- Se determinó el contenido de proteínas del sobrenadante (ver anexo II).
- El sobrenadante se esterilizó por filtración (con membranas Millipore).
- Se determinó el contenido de proteínas del extracto estéril.
- Se guardó en frascos viales (2 mL en cada uno) para su almacenamiento.

Para el extracto de proteína de soya renaturalizada:

- Se pesaron 250 mg de la proteína aislada de soya en un tubo graduado de 10 mL.
- Se agregaron 2 mL de amortiguador Tris-HCl, 6 g de urea, 2 mL de agua destilada, 200 μ L de 2-mercaptoetanol y agua destilada hasta 10 mL.
- El tubo se tapó y agitó. Cuando fue necesario, se completó el volumen a 10 mL con agua destilada.
- Se calentó el tubo en baño de agua hirviendo durante 60 ± 1 min, cuidando que quedara sumergido más allá del nivel de los 10 mL.
- Se dejó enfriar a temperatura ambiente (alrededor de 30 minutos).
- Se colocó la mezcla en una bolsa para diálisis y se dializó contra 2 L de PBS durante 16 horas.
- Se cambió el PBS y se dializó otras 24 horas.
- Se cambió nuevamente el PBS y se dializó 24 horas más.
- Se centrifugó el dializado durante 10 minutos a 12000 r.p.m., se conservó el sobrenadante.
- Se determinó el contenido de proteínas del sobrenadante (ver anexo II).
- El sobrenadante se esterilizó por filtración (con membranas Millipore).
- Se determinó el contenido de proteínas del sobrenadante estéril.
- Se guardó el extracto en frascos viales (2 mL en cada uno).

II. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SEGÚN LOWRY ^{5,10}:

Material y equipo:

- Espectrofotómetro UV/visible GBC 911;
- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Cronómetro.
- Celdas para espectrofotómetro de cuarzo de 1 mL SIGMA.
- Tubos de ensayo de 10 mL.
- Gradilla.
- Bureta de 50 mL.
- Pipeta graduada de 0.5 mL.
- Micropipeta de 0 a 500 μ L.
- Papel parafilm.

Reactivos:

- Reactivo A: 50 partes del reactivo 1 + 1 parte del reactivo 2.
- Reactivo 1: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N.
- Reactivo 2: 1 parte de tartrato de sodio y potasio al 2% + 1 parte de CuSO_4 al 1%.
- Reactivo B: 1 parte de Folin Ciocalteu + 1 parte de agua desionizada.
- Disolución patrón de albúmina sérica bovina (1 mg/mL).
- Agua destilada y desionizada.

Técnica:

Curva patrón de albúmina:

- Se colocan desde 0 hasta 500 μ L de disolución patrón de albúmina en 10 tubos de ensayo.
- Se completa con agua destilada a 500 μ L el volumen contenido en cada tubo.
- Se añaden 5 mL del reactivo A, se tapan los tubos, se agitan y se dejan reposar durante 10 minutos exactamente.
- Se agrega 0.5 mL del reactivo B, se tapan los tubos, se agitan y se dejan reposar durante 30 minutos.
- Se lee la absorbancia a 750 nm.
- Se grafican las absorbancias obtenidas contra el contenido de proteína.

Muestras problema:

- Se coloca en un tubo de ensayo un volumen conocido de la disolución problema que contenga alrededor de 200 μ g de proteína.
- Se completa con agua destilada a 500 μ L el volumen contenido en cada tubo.
- Se siguen los mismos pasos que para la curva patrón.

III. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SEGÚN BRADFORD ⁶:

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Espectrofotómetro UV/visible GBC 911.
- Celdas para espectrofotómetro de cuarzo de 1 mL SIGMA.
- Tubos de ensayo para 10 mL.
- Gradilla.
- Bureta de 50 mL.
- Micropipeta de 0 a 500 μ L.
- Papel parafilm.

Reactivos:

- Reactivo de Bradford: Se disuelve 1 mg de Azul Brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad) en 50 mL de etanol al 95%. A esta disolución se agregan 100 mL de ácido fosfórico al 85% p/v. Se lleva hasta 1 L con agua destilada.
- Disolución patrón de albúmina sérica bovina (1 mg/mL)
- Agua destilada y desionizada.

Técnica:

Curva patrón de albúmina:

- Se colocan desde 0 hasta 500 μ L de disolución patrón de albúmina en 10 tubos de ensayo.
- Se completa con agua destilada a 1000 μ L el volumen contenido en cada tubo.
- Se añaden 4 mL del reactivo de Bradford, se tapan los tubos, se agitan y se dejan reposar de 5 a 60 minutos.
- Se lee la absorbancia a 595 nm.
- Se grafican las absorbancias obtenidas contra el contenido de proteína.

Muestras problema:

- Se coloca en un tubo de ensayo un volumen conocido de la disolución problema que contenga alrededor de 200 μ g de proteína.
- Se completa con agua destilada a 1000 μ L el volumen contenido en cada tubo.
- Se siguen los mismos pasos que para la curva patrón.

IV. INMUNIZACIÓN DEL CONEJO Y OBTENCIÓN DEL SUERO:

Animal:

- Conejo de raza Nueva Zelanda, hembra de 3 kg.

Material y equipo:

- Centrifuga Damon/IEC Division, modelo IEC HT
- 10 jeringas estériles de 3 mL con agujas número 21.
- Algodón.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- 2 jeringas estériles de 10 mL con agujas número 22.
- Jeringa y aguja para punción cardíaca.

Reactivos:

- Etanol (96 °G.L.).
- Amortiguador de fosfatos (PBS) estéril, pH 7.2 (ver anexo I).
- Extracto de proteína total de soya.
- Extracto de proteína de soya renaturalizada.
- Adyuvante completo de Freund.

Técnica:

- El extracto de proteína de soya renaturalizada se diluyó con PBS estéril hasta una concentración de proteínas de aproximadamente 3 mg/mL. El extracto de proteína total de soya se utilizó sin diluir.
- El conejo se inmunizó de acuerdo con el esquema de la figura 6 (página 33).
- Las sangrías de prueba se hicieron extrayendo 4 mL de sangre de la vena marginal de la oreja del conejo (jeringa de 10 mL con aguja del 22), la cual se colocó en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm y se dejó coagular 2 h a 37°C.
- Se separó el suero por centrifugación (15 min a 5000 r.p.m.).
- Se determinó la presencia de anticuerpos en el suero por la técnica de doble difusión en agar (Ouchterlony).
- La sangría de cosecha se hizo por punción cardíaca.

V. TÉCNICA DE DOBLE DIFUSIÓN EN AGAR (OUCHTERLONY)²³:

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Parrilla magnética Corning, PC-351.
- Cajas Petri de vidrio.
- 1 matraz Erlenmeyer de 125 mL.
- 1 sacabocados de 5 mm de diámetro.

Reactivos:

- 100 mL de amortiguador de veronal-acetato (pH 8.6, fuerza iónica 0.01).
- 1.5 g de agar purum (Behring).
- 0.1 g de azida de sodio.
- Agua destilada y desionizada.

Técnica:

- Se coloca el agar purum en el matraz Erlenmeyer y se le agregan la azida y el amortiguador.
- Se agita el matraz y se calienta a ebullición hasta que el agar se disuelva por completo.
- Se vacía el agar en las cajas Petri sobre una superficie plana. El volumen de agar agregado debe alcanzar 0.5 cm desde el fondo de la caja.
- Se deja solidificar y se cortan los pozos con el sacabocados (ver figura 9).
- Se llenan los pozos con las disoluciones de antígeno o de anticuerpo hasta el borde superior de los mismos.
- Las cajas se dejan de 2 a 3 días a temperatura ambiente para permitir la formación de los precipitados de los complejos antígeno-anticuerpo.

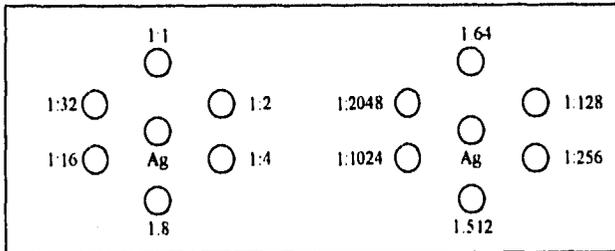


Figura 9 Arreglo de los pozos para la técnica de Ouchterlony; Ag = antígeno, los números indican las diluciones del anticuerpo.

VI. TITULACIÓN DE LOS ANTICUERPOS POR EIA:

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Lector de microplacas Behring EL 301, 490 y 630 nm.
- Agitador de microplacas Cole-Parmer serie 4732, 140-1400 rpm.
- Cronómetro.
- Microplacas de poliestireno de fondo plano COSTAR.
- Micropipetas: Gilson 0-20 μ L; Wheaton 50-200 μ L; IITL 200-1000 μ L.
- Matraces volumétricos.
- Vasos de precipitados.

Reactivos:

- Amortiguador PBS-Tween 20 0.5% (ver anexo I).
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA (albúmina sérica bovina, fracción V, SIGMA, producto No. A-4503) 0.5%.
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA 1%.
- Amortiguador de carbonatos 0.01M (pH 9.6): Mezclar 2 partes de disolución A (carbonato de sodio 0.2M) con 8 partes de la disolución B (bicarbonato de sodio 0.2M) y diluir 1:20.
- Amortiguador de citratos 0.1M (pH 4.5): 28mL de disolución A (ácido cítrico monohidratado 0.1M) + 22mL de disolución B (citrato de sodio dihidratado 0.1M) + c.b.p. 100mL de H₂O.
- *o*-fenilendiamina (OPD), SIGMA, tabletas de 10mg.
- H₂O₂ al 30%.
- H₂SO₄ 1N.
- Disolución de soya renaturalizada y dializada.
- Suero con anticuerpos anti-proteína de soya.
- Suero control (sin anticuerpos anti-proteína de soya).
- Disolución de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA, producto No. A-0545).
- Disolución de sustrato: 10 mL de amortiguador de citratos, 10 mg de OPD y 4 μ L de H₂O₂. Mantener en la oscuridad.
- Agua destilada y desionizada.

Técnica:

- Se sensibilizaron 2 microplacas con proteína de soya renaturalizada y dializada (40 ng de proteína en 50 μ L de amortiguador de carbonatos por pozo). Se dejaron secar al vacío durante toda la noche a temperatura ambiente.

- Las microplacas se lavaron 3 veces: 1 vez con PBS-Tween-BSA 0.5% y 2 veces con PBS-Tween (250 μ L por pozo, agitando 3 minutos con cada amortiguador).
- Se bloquearon las microplacas con 200 μ L de PBS-Tween-BSA 1% por pozo. Se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavaron las placas como se describió anteriormente.
- Se hicieron las siguientes diluciones del suero con el anticuerpo anti-soya y del suero control: 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 y 1:10000.
- Se colocaron por triplicado 50 μ L de cada dilución en los pozos y se dejaron agitando durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavaron las microplacas como en los casos anteriores.
- Se agregó el anticuerpo conjugado diluido 1:40000 en PBS-Tween (50 μ L por pozo) y se dejaron agitando durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavaron las microplacas como en los casos anteriores.
- Se agregaron 50 μ L de la disolución del sustrato y se agitaron durante 10 minutos.
- Se detuvo la reacción agregando 200 μ L de H_2SO_4 a cada pozo.
- Se leyó la absorbancia a 490 nm.

VII. REACTIVIDAD CRUZADA (POR WESTERN-BLOT):

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Balanza granataria.
- Cámara para electroforesis y transferencia BRL, Mini-V 8·10.
- Placas de vidrio (grandes y chicas) para electroforesis.
- Separadores para las placas anteriores.
- Peine con 10 dientes para electroforesis.
- Sujetadores para las placas de vidrio para las placas de vidrio.
- Placa de vidrio de 15cm por lado (mínimo).
- Almohadillas de presión para la transferencia.
- Fuente de poder GIBCO, modelo 250.
- Parrilla magnética Corning, PC-351.
- Pipetas.
- Micropipeta de 2-20 μ L.
- Vasos de precipitado.
- Matraces Kitasato de 50mL con tapón.
- Manguera para vacío.
- Papel filtro.
- Membranas de nitrocelulosa Pharmacia, 0.45 μ m.
- Tubos Eppendorf.
- Baño de agua.
- Cronómetro.
- Guantes de látex.

Reactivos:

- Solución I: Acrilamida 30% (SIGMA, A-8887), Bisacrilamida 0.8% (SIGMA, M-7256).
- Disolución II: Tris-HCl 0.75M pH 8.8, SDS 0.2% (SIGMA, L-4509).
- Disolución III: Tris-HCl 0.25M pH 6.8, SDS 0.2%.
- Amortiguador de carga: 0.3g de Tris, 4mL de SDS al 2%, 2mL de 2-mercaptoetanol, 4mL de glicerol, 40mg de azul de bromofenol y agua destilada c.b.p. 10 mL.
- Amortiguador de corrida (pH 8.3): Tris-HCl 25mM, glicina 192mM (SIGMA, G-7126), SDS 0.1%.
- Disolución de azul de Coomassie: azul de Coomassie 0.2%; metanol 50%, ácido acético 7%.
- Disolución destañadora: metanol 30%, ácido acético 7%.

- Amortiguador de transferencia (pH 8.3): Tris-base 24.8mM; glicina 192mM; metanol 10%.
- Disolución de agarosa: agarosa 1%.
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina).
- APS: persulfato de amonio al 20% (se prepara inmediatamente antes de usarse, Mallinckrodt, UN1479).
- Estándares de peso molecular para proteínas Dalton-mark VII-L (14000-70000).
- Buffer base (TBS) pH 7.4: NaCl 0.15mM; Tris 50mM.
- Disolución de saturación: Tween 20 0.05% v/v (SIGMA, P-1379); BSA 2% en TBS.
- TBS-NaCl 1M: Para 100mL: 5.0g de NaCl y llevar a volumen con TBS.
- Suero anti-proteína de soya.
- Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa.
- Disolución de sustrato: 22mg de 4-cloro-I-naftol (SIGMA, C-8890); 11mL de metanol; 33mL de TBS y 44μL de H₂O₂ al 30%.
- Agua destilada y desionizada.

Técnicas:

Preparación de las muestras:

- Soya total: ver en el anexo I: extracto de proteína total de soya.
- Soya renaturalizada y dializada: ver en el anexo I: extracto de proteína de soya renaturalizada.
- Soya renaturalizada: igual que la anterior, pero en lugar de dializar, una vez fría, la muestra se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 25mL y se lleva a volumen con agua.
- Carnes de puerco, de res y de pavo: se prepara polvo de acetona de cada una de las carnes (ver anexo X), a los cuales se les trata de la misma forma que a la soya renaturalizada.
- Fécula de papa: igual que las carnes, pero se pesan 30g en lugar de 20.
- Medir concentración de proteína de las muestras por el método de Bradford (ver anexo III).

Separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (al 15%):

- Preparación del material para la electroforesis: las placas de vidrio, los separadores y el peine se lavan, se dejan secar y se limpian con alcohol. Se coloca una placa grande en una superficie limpia y se colocan los espaciadores. Después se coloca una placa chica sobre los espaciadores. Se colocan los sujetadores. Se coloca el peine y se dibuja una marca 0.5cm abajo del nivel de los dientes. Retirar el peine. Con una pipeta Pasteur, colocar una línea recta de disolución de agarosa caliente sobre la placa de vidrio de 15cm de ancho. Inmediatamente se

colocan las placas de vidrio ya ensambladas sobre la agarosa. Se deja solidificar durante 10-15 minutos.

- Preparación del gel separador: En un matraz Kitasato se colocan 5ml de la disolución I, 5ml de la disolución II y 10 μ L de TEMED. Se desgasifica la disolución anterior al vacío. Se agregan 100 μ L de APS. Se agita y se vierte el gel. Se agrega agua para que solidifique parejo. Una vez sólido, se tira el agua, se secan los vidrios, se coloca el peine y se agrega el gel concentrador.
- Preparación del gel concentrador: En un matraz Kitasato se colocan 2.5ml de disolución I, 7.5ml de disolución III, 5.0ml de agua y 10 μ L de TEMED. Se desgasifica la disolución anterior al vacío. Se agregan 100 μ L de APS. Se agita y se vierte sobre el gel separador. Se deja solidificar. se retira el peine y se colocan las muestras.
- Muestras: Las muestras mencionadas y los estándares de peso molecular se colocaron en tubos Eppendorf (10 μ L de cada una) y se les agregaron 10 μ L de amortiguador de carga. En el caso de la fécula de papa, se colocaron 50 μ L de muestra y se agregaron 10 μ L de amortiguador de carga. Se colocan los tubos en un baño de agua hirviendo durante 1 minuto. Se cargan las muestras en el gel.
- Corrimiento del gel: se corrió el gel a 105V durante 3 horas en amortiguador de corrida.
- Tinción del gel: se sumerge el gel en la disolución de azul de Coomassie durante 1 hora. Después se transfiere a la disolución desteñidora, la cual debe cambiarse varias veces, hasta que se diferencien las bandas de proteínas del gel. NOTA: Si las proteínas se van a transferir a una membrana de nitrocelulosa no deben teñirse con azul de Coomassie, sino sumergirse en amortiguador de transferencia.

Transferencia a membranas de nitrocelulosa:

- Preparación del gel para la transferencia: Para cada transferencia se prepara por adelantado 1.5 l. de amortiguador de transferencia y se mantiene a 4°C. El gel debe sumergirse por lo menos media hora en 50ml. de amortiguador frío.
- Transferencia: Se corta un pedazo de membrana de nitrocelulosa de dimensiones un poco mayores a las del gel. Se sumerge la membrana en amortiguador de transferencia hasta que esté completamente húmeda. Se cortan dos pedazos de papel filtro grueso del tamaño de las almohadillas de presión. Se saturan tanto el papel filtro como las almohadillas en amortiguador de transferencia. En el soporte para transferencia se colocan una almohadilla, un pedazo de papel filtro, el gel, la membrana de nitrocelulosa, otro pedazo de papel filtro y las otras dos almohadillas. Se ensambla la cámara de transferencia y se transfiere a 150V durante 50 minutos. Una vez terminada la transferencia, se desechan el buffer y el papel filtro, la membrana se procesa como se indica a continuación.

Revelado de las membranas:

- Bloqueo de las membranas: Se incuba la membrana en la disolución de saturación 1 hora a temperatura ambiente.
- Anticuerpo: Se incuba la membrana con el anticuerpo anti-soya (diluido 1:3000 en disolución de saturación) 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C.
- Lavados: Primer lavado: Se agita la membrana durante ocho minutos en TBS; segundo lavado: se agita la membrana ocho minutos en TBS-NaCl; tercer lavado: igual que el primero.
- Conjugado: Se incuba la membrana con el anticuerpo conjugado (diluido 1:40000 en disolución de saturación) durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Lavados: Como los anteriores pero sin el de TBS-NaCl.
- Revelado: Se incuba la membrana en la disolución de sustrato durante media hora a temperatura ambiente.

VIII. EIA POR INHIBICIÓN:

I. Determinación de la cantidad de antígeno para sensibilizar los pozos de la microplaca y de la dilución del anticuerpo contra proteínas de soya.

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Lector de microplacas Behring EL 301, 490 y 630 nm.
- Agitador de microplacas Cole-Parmer serie 4732, 140-1400 rpm.
- Cronómetro.
- Microplacas de poliestireno de fondo plano COSTAR.
- Micropipetas: Gilson 0-20 μ L.; Wheaton 50-200 μ L.; IITL 200-1000 μ L.
- Matraces volumétricos.
- Vasos de precipitados.

Reactivos:

- Amortiguador PBS-Tween 20 0.5% (ver anexo I).
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA (albúmina sérica bovina, fracción V, SIGMA, producto No. A-4503) 0.5%.
- Amortiguador de carbonatos 0.01M (ver anexo VI).
- Amortiguador de citratos 0.1M (ver anexo VI).
- *o*-fenilendiamina (OPD), SIGMA, tabletas de 10mg.
- H₂O₂ al 30%.
- H₂SO₄ 1N.
- Disolución de soya renaturalizada (4 mg de proteína de soya/mL).
- Suero con anticuerpos anti-proteína de soya.
- Disolución de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA, producto No. A-0545).
- Disolución de sustrato: 10 mL de amortiguador de citratos, 10 mg de OPD y 4 μ L de H₂O₂. Mantener en la oscuridad.
- Agua destilada y desionizada.

Técnica:

- Se sensibilizaron 2 microplacas con las siguientes cantidades de proteína de soya renaturalizada: 200, 100, 50 y 25 ng de proteína (disueltos en 50 μ L de amortiguador de carbonatos). Se dejaron secar al vacío durante toda la noche a temperatura ambiente.
- Las microplacas se lavaron 3 veces con PBS-Tween (250 μ L por pozo, agitando 3 minutos por cada lavado).

- Se bloquearon las microplacas con PBS-Tween-BSA 0.5% (200µL por pozo) durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavaron las placas como se describió anteriormente.
- Se hicieron las siguientes diluciones del anticuerpo anti-proteína de soya: 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000.
- Se colocaron 50 µL por pozo de cada dilución en las microplacas según el esquema 1 y se dejaron agitando durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween.
- Se agregó el anticuerpo conjugado diluido 1:10000 en PBS-Tween (50 µL por pozo) y las placas se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se hicieron 5 lavados con PBS-Tween.
- Se agregaron 50 µL de la disolución del sustrato a cada pozo y las microplacas se dejaron durante 10 minutos en la oscuridad.
- Se detuvo la reacción enzimática agregando 200 µL de H₂SO₄ a cada pozo.
- Se leyó la absorbancia a 490 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	d
A				■	■	■				■	■	■	1:100
B				■	■	■				■	■	■	1:100
C				■	■	■				■	■	■	1:250
D				■	■	■				■	■	■	1:250
E				■	■	■				■	■	■	1:500
F				■	■	■				■	■	■	1:500
G				■	■	■				■	■	■	1:1000
H				■	■	■				■	■	■	1:1000
	200 ng de proteína de soya						100 ng de proteína de soya						

Esquema 1: Distribución de las microplacas. La d significa dilución del anticuerpo contra proteínas de soya. Los pozos con sombreado oscuro no fueron sensibilizados, mientras que a los pozos con sombreado claro se les puso el anticuerpo contra proteínas de soya. La segunda placa difiere de la del esquema en que se sensibilizó con 50 y 25 ng de proteína de soya en lugar de 200 y 100.

2. Determinación de la concentración de albúmina para el bloqueo.

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Lector de microplacas Behring EL 301, 490 y 630 nm.
- Agitador de microplacas Cole-Parmer serie 4732, 140-1400 rpm.
- Cronómetro.
- Microplacas de poliestireno de fondo plano COSTAR.

- Micropipetas: Gilson 0-20 μ L; Wheaton 50-200 μ L; HTL 200-1000 μ L.
- Matraces volumétricos.
- Vasos de precipitados.

Reactivos:

- Amortiguador PBS-Tween 20 0.5% (ver anexo I).
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA (albúmina sérica bovina, fracción V, SIGMA, producto No. A-4503) 0.5%.
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA 1%.
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA 2%.
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA 3%.
- Amortiguador de carbonatos 0.01M (ver anexo VI).
- Amortiguador de citratos 0.1M (ver anexo VI).
- *o*-fenilendiamina (OPD), SIGMA, tabletas de 10mg.
- H₂O₂ al 30%.
- H₂SO₄ 1N.
- Disolución de soya renaturalizada (4 mg de proteína de soya/ml.).
- Suero con anticuerpos anti-proteína de soya.
- Disolución de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA, producto No. A-0545).
- Disolución de sustrato: 10 mL de amortiguador de citratos, 10 mg de OPD y 4 μ L de H₂O₂. Mantener en la oscuridad.
- Agua destilada y desionizada.

Técnica:

- Se sensibilizaron 4 microplacas con 100 ng de proteína de soya renaturalizada disueltos en 50 μ L de amortiguador de carbonatos. Se dejaron secar al vacío durante toda la noche a temperatura ambiente.
- Las microplacas se lavaron 3 veces con PBS-Tween (250 μ L por pozo, agitando 3 minutos por cada lavado).
- Se bloquearon dos microplacas con PBS-Tween-BSA 0.5, 1, 2 ó 3% (200 μ L por pozo) durante 1 h a temperatura ambiente (ver esquema 2). A las otras dos microplacas se les agregó PBS-Tween y también se dejaron 1 hora a temperatura ambiente.
- Se lavaron las placas como se describió anteriormente.
- Se hicieron las siguientes diluciones del anticuerpo anti-proteína de soya: 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000.
- Se colocaron 50 μ L por pozo de cada dilución en las 4 microplacas según el esquema 2 y se dejaron agitando durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween.

- Se agregó el anticuerpo conjugado diluido 1:10000 en PBS-Tween (50 μ L por pozo) y las placas se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se hicieron 5 lavados con PBS-Tween.
- Se agregaron 50 μ L de la disolución del sustrato a cada pozo y las microplacas se dejaron durante 10 minutos en la oscuridad.
- Se detuvo la reacción enzimática agregando 200 μ L de H_2SO_4 a cada pozo.
- Se leyó la absorbancia a 490 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	d
A				■	■	■				■	■	■	1:100
B				□	□	□				□	□	□	1:100
C				■	■	■				■	■	■	1:250
D				□	□	□				□	□	□	1:250
E				■	■	■				■	■	■	1:500
F				□	□	□				□	□	□	1:500
G				■	■	■				■	■	■	1:1000
H				□	□	□				□	□	□	1:1000
Bloqueo con BSA al 0.5%						Bloqueo con BSA al 1%							

Esquema 2: Distribución de las microplacas. La *d* significa dilución del anticuerpo contra proteínas de soya. Los pozos con sombreado oscuro no fueron sensibilizados, mientras que a los pozos con sombreado claro no se les puso el anticuerpo contra proteínas de soya. La segunda placa difiere de la del esquema en que se bloqueó con soluciones de BSA al 2 y 3% en lugar de al 0.5 y 1%. Las placas que no fueron bloqueadas tienen la misma distribución, sólo que no se agregó BSA.

3. Curva patrón del EIA por inhibición.

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Incubadora F.E.L.I.S.A., modelo FE 131.
- Lector de microplacas Behring EL 301, 490 y 630 nm.
- Agitador de microplacas Cole-Parmer serie 4732, 140-1400 rpm.
- Cronómetro.
- Microplacas de poliestireno de fondo plano COSTAR.
- Micropipetas: Gilson 0-20 μ L; Wheaton 50-200 μ L; HTL 200-1000 μ L.
- Tubos de ensaye de 3 mL.
- Matraces volumétricos.
- Vasos de precipitados.

Reactivos:

- Amortiguador PBS-Tween 20 0.5% (ver anexo I).
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA (albúmina sérica bovina, fracción V, SIGMA, producto No. A-4503) 0.5%.
- Amortiguador de carbonatos 0.01M (ver anexo VI).
- Amortiguador de citratos 0.1M (ver anexo VI).
- *o*-fenilendiamina (OPD), SIGMA, tabletas de 10mg.
- H₂O₂ al 30%.
- H₂SO₄ 1N.
- Disolución de soya renaturalizada (4 mg de proteína de soya/mL).
- Suero control (sin anticuerpos anti-proteína de soya).
- Suero con anticuerpos anti-proteína de soya.
- Disolución de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA, producto No. A-0545).
- Disolución de sustrato: 10 mL de amortiguador de citratos, 10 mg de OPD y 4 µL de H₂O₂. Mantener en la oscuridad.
- Disolución de anticuerpo positivo: Se colocan 100µL de suero con anticuerpos anti-proteína de soya en un matraz volumétrico de 50mL y se lleva a volumen con PBS-Tween.
- Disolución de anticuerpo negativo: Se colocan 100µL de suero control en un matraz volumétrico de 50mL y se lleva a volumen con PBS-Tween.
- Agua destilada y desionizada.

Técnica:

- Se sensibilizó 1 microplaca con 100 ng de proteína de soya renaturalizada disueltos en 50µL de amortiguador de carbonatos. Se dejó secar al vacío durante toda la noche a temperatura ambiente.
- La microplaca se lavó 3 veces con PBS-Tween (250µL por pozo, agitando 3 minutos por cada lavado).
- Se bloqueó la microplaca con PBS-Tween-BSA 0.5% (200µL por pozo) durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa como se describió anteriormente.
- Se diluyó la disolución de soya renaturalizada de la siguiente forma: se colocaron 750µL en un matraz volumétrico de 10mL y se llevó a volumen con PBS-Tween.
- Curva patrón: En una serie de 9 tubos de ensayo se ponen 400µL de PBS-Tween, excepto al primer tubo, al cual se agregan 600µL de la dilución anterior (S1). Se toman 200µL del primer tubo y se mezclan con el contenido del segundo (S2), de esta disolución se toman también 200µL y se agregan al tercer tubo (S3) y así sucesivamente hasta llegar al noveno tubo (S9), del cual se desechan 200µL.

- Controles: Se colocan respectivamente en cuatro tubos de ensaye: Para el control del sustrato (BS): 800µL de PBS-Tween; para el control del conjugado (BC): 800µL. PBS-Tween; para el control positivo (BP): 400µL de PBS-Tween + 400µL. de disolución de anticuerpo positivo; para el control negativo (BN): 400µL. de PBS-Tween + 400µL. de disolución de anticuerpo negativo.
- Se agregaron 400µL. de disolución de anticuerpo positivo a los tubos de la curva patrón (S1-S9). Se taparon y mezclaron.
- Los tubos de la curva patrón y los de los controles se incubaron 30 minutos a 37°C.
- Se colocaron 50 µL. por pozo de cada dilución en la microplaca según el esquema 3 y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa 5 veces con PBS-Tween.
- Se agregó el anticuerpo conjugado diluido 1:10000 en PBS-Tween (50 µL. por pozo) y las placas se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente. BS no lleva conjugado.
- Se hicieron 5 lavados con PBS-Tween.
- Se agregaron 50 µL. de la disolución del sustrato a cada pozo y la microplaca se dejó durante 10 minutos en la oscuridad.
- Se detuvo la reacción enzimática agregando 200 µL. de H₂SO₄ a cada pozo.
- Se leyó la absorbancia a 490 nm.

	1	2	3	4	5
A	BS	S1	S1	S1	S8
B	BS	S2	S2	S2	S8
C	BS	S3	S3	S3	S8
D	BC	S4	S4	S4	S9
E	BC	S5	S5	S5	S9
F	BC	S6	S6	S6	S9
G	BP	S7	S7	S7	BN
H	BP	BP	BN	BN	BN

Esquema 3: Distribución de la microplaca.

IX. ELABORACIÓN DE SALCHICHAS CON CONCENTRACIÓN CONOCIDA DE PROTEÍNA DE SOYA:

Material y equipo:

- Balanza granataria.
- Picadora ("cutter").
- Termómetro.
- Olla para cocer las salchichas.
- Cronómetro.
- Embutidora.
- Tripa artificial para embutir las salchichas.

Formulaciones:

Para las salchichas sin soya:

- 50g de carne magra de res.
- 13g de grasa de cerdo.
- 25g de hielo picado.
- 7g de fécula de papa.
- 2.5 g de sal.
- 1g de consomé de pollo.
- 0.8g de cebolla en polvo.
- 0.4g de fosfato de sodio.
- 0.6g de pimienta negra molida.
- 0.1g de glutamato monosódico.
- 0.1g de eritorbato de sodio.
- 0.4g de sal de cura.
- Agua.

Para las salchichas con soya:

- Tipo 1: Igual que para las salchichas sin soya, pero sustituyendo 1g de carne de res por la misma cantidad de aislado de soya.
- Tipo 2: Igual que para las salchichas sin soya, pero sustituyendo 2g de carne de res por la misma cantidad de aislado de soya.
- Tipo 3: Igual que para las salchichas sin soya, pero sustituyendo 3g de carne de res por la misma cantidad de aislado de soya.
- Tipo 5: Igual que para las salchichas sin soya, pero sustituyendo 5g de carne de res por la misma cantidad de aislado de soya.
- Tipo 10: Igual que para las salchichas sin soya, pero sustituyendo 10g de carne de res por la misma cantidad de aislado de soya.

Preparación:

- Se colocan en la picadora la carne de res, el aislado de soya, la tercera parte del hielo, la sal de cura y la sal. Se pican 7 minutos, manteniendo la temperatura menor a 7°C.
- Con la picadora funcionando se incorpora la grasa. Se pica otros 3 minutos.
- Sin dejar de picar se adiciona otra tercera parte del hielo. A los 30 segundos se añade la fécula de papa y se deja 2 minutos.
- Sin dejar de picar se adicionan las especias y condimentos y se mezclan 1 minuto.
- Finalmente se añaden el último tercio del hielo y el fosfato. Se continúa el picado durante 2 minutos.
- Se embute la pasta en la tripa remojada en agua.
- Las salchichas se colocan en una olla para su cocimiento en agua a 72°C durante 20 minutos.
- Colocar en un recipiente con agua y hielo para formar la costra.

X. PREPARACIÓN DEL POLVO DE ACETONA DE SALCHICHA¹:

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- Homogenizador.
- Mortero.
- Embudos.
- Papel filtro.
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca.
- Espátula.

Reactivos:

- Cloroformo-metanol: 2+1 v/v.
- Etanol-agua (acidificado): 80+20 v/v, acidificado con 2 gotas de HCl/L.
- Acetona.

Técnica:

- Pesar 20 g de salchicha.
- Macerar con 100 mL de cloroformo-metanol.
- Filtrar el residuo.
- Repetir los dos pasos anteriores dos veces más.
- Repetir los tres pasos anteriores: la primera vez con etanol acidificado y la segunda con acetona.
- Dejar secar al aire toda la noche.
- Moler en un mortero.

XI. APLICACIÓN DEL EIA POR INHIBICIÓN A SALCHICHAS CON CONCENTRACIÓN CONOCIDA DE PROTEÍNA DE SOYA:

Material y equipo:

- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus, modelo AP210S.
- 1 espátula.
- Vasos de precipitados.
- Matraces volumétricos de 25 mL.
- Tubos de ensayo de 3 mL.
- Tubos de ensayo graduados de 10 mL con tapón.
- Incubadora F.E.L.I.S.A., modelo FE 131.
- Lector de microplacas Behring EL 301, 490 y 630 nm.
- Agitador de microplacas Cole-Parmer serie 4732, 140-1400 rpm.
- Cronómetro.
- Microplacas de poliestireno de fondo plano COSTAR.
- Micropipetas: Gilson 0-20 μ L; Wheaton 50-200 μ L; HTL 200-1000 μ L.

Reactivos:

- Amortiguador Tris-HCl (ver anexo I).
- Urea.
- 2-mercaptoetanol.
- Agua destilada y desionizada.
- Amortiguador PBS-Tween 20 0.5% (ver anexo I).
- Amortiguador PBS-Tween 20-BSA (albúmina sérica bovina, fracción V, SIGMA, producto No. A-4503) 0.5%.
- Amortiguador de carbonatos 0.01M (ver anexo VI).
- Amortiguador de citratos 0.1M (ver anexo VI).
- *o*-fenilendiamina (OPD), SIGMA, tabletas de 10mg.
- H₂O₂ al 30%.
- H₂SO₄ 1N.
- Disolución de soya renaturalizada (4 mg de proteína de soya/mL).
- Polvos de acetona de salchicha.
- Suero control (sin anticuerpos anti-proteína de soya).
- Suero con anticuerpos anti-proteína de soya.
- Disolución de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA, producto No. A-0545).
- Disolución de sustrato: 10 mL de amortiguador de citratos, 10 mg de OPD y 4 μ L de H₂O₂. Mantener en la oscuridad.
- Disolución de anticuerpo positivo: Se colocan 100 μ L de suero con anticuerpos anti-proteína de soya en un matraz volumétrico de 50mL y se lleva a volumen con PBS-Tween.

- Disolución de anticuerpo negativo: Se colocan 100µL de suero control en un matraz volumétrico de 50mL y se lleva a volumen con PBS-Tween.

Técnica:

- Se pesó una cantidad de cada muestra de polvo de acetona de salchicha que correspondiera a 95-105mg de proteína, en tubos de ensayo de 10mL con tapón.
- A cada tubo se agregaron 2ml. de amortiguador Tris-HCl, 6g de urea, 2ml. de agua destilada, 200µL de 2-mercaptoetanol y agua destilada hasta 10mL.
- Los tubos se taparon y agitaron. Cuando fue necesario, se completó el volumen a 10 mL con agua.
- Los tubos se calentaron en baño de agua hirviendo durante 60±1 min, cuidando que quedaran sumergidos más allá del nivel de los 10 mL.
- Se dejaron enfriar a temperatura ambiente (alrededor de 5 minutos).
- El contenido de los tubos se transfirió cuantitativamente a matraces volumétricos de 25mL y se llevó a volumen con agua.
- Almacenar a 2-8°C.
- Se sensibilizó 1 microplaca con 100 ng de proteína de soya renaturalizada disueltos en 50µL de amortiguador de carbonatos. Se dejó secar al vacío durante toda la noche a temperatura ambiente.
- La microplaca se lavó 3 veces con PBS-Tween (250µL por pozo, agitando 3 minutos por cada lavado).
- Se bloqueó la microplaca con PBS-Tween-BSA 0.5% (200µL por pozo) durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa como se describió anteriormente.
- Se diluyó la disolución de soya renaturalizada de la siguiente forma: se colocaron 750µL en un matraz volumétrico de 10mL y se llevó a volumen con PBS-Tween.
- Curva patrón: en una serie de 9 tubos de ensayo se ponen 400µL de PBS-Tween, excepto al primer tubo, al cual se agregan 600µL de la dilución anterior (S1). Se toman 200µL del primer tubo y se mezclan con el contenido del segundo (S2), de esta disolución se toman también 200µL y se agregan al tercer tubo (S3) y así sucesivamente hasta llegar al noveno tubo (S9), del cual se desechan 200µL.
- Dilución de las muestras: se hizo como en los dos pasos anteriores para la disolución de soya renaturalizada; pero para la muestra de salchicha sin soya se hicieron las diluciones hasta S3; para las salchichas tipo 1 y 2 hasta S4 y para las tipo 5 y 10 hasta S5.
- Controles: se colocan respectivamente en cuatro tubos de ensayo: para el control del sustrato (BS): 800µL de PBS-Tween; para el control del conjugado (BC): 800µL PBS-Tween; para el control positivo (BP): 400µL de PBS-Tween + 400µL de disolución de anticuerpo positivo; para el control negativo (BN): 400µL de PBS-Tween + 400µL de disolución de anticuerpo negativo.

- Se agregaron 400µL de disolución de anticuerpo positivo a los tubos de la curva patrón (S1-S9) y de las muestras. Se taparon y mezclaron.
- Los tubos de la curva patrón, de las muestras y de los controles se incubaron 30 minutos a 37°C.
- Se colocaron 50 µL por pozo de cada dilución en la microplaca según el esquema 4 y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavó la placa 5 veces con PBS-Tween.
- Se agregó el anticuerpo conjugado diluido 1:10000 en PBS-Tween (50 µL por pozo) y las placas se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente. BS no lleva conjugado.
- Se hicieron 5 lavados con PBS-Tween.
- Se agregaron 50 µL de la disolución del sustrato a cada pozo y la microplaca se dejó durante 10 minutos en la oscuridad.
- Se detuvo la reacción enzimática agregando 200 µL de H₂SO₄ a cada pozo.
- Se leyó la absorbancia a 490 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	BS	S1	S1	S1	S8	0-1	1-2	2-2	5-3	10-3
B	BS	S2	S2	S2	S8	0-1	1-2	2-2	5-3	10-3
C	BS	S3	S3	S3	S8	0-1	1-3	2-3	5-4	10-4
D	BC	S4	S4	S4	S9	0-2	1-3	2-3	5-4	10-4
E	BC	S5	S5	S5	S9	0-2	1-3	2-3	5-4	10-4
F	BC	S6	S6	S6	S9	0-2	1-4	2-4	5-5	10-5
G	BP	S7	S7	S7	BN	0-3	1-4	2-4	5-5	10-5
H	BP	BP	BN	BN	BN	0-3	1-4	2-4	5-5	10-5

Esquema 4: Distribución de la microplaca. BS: control del sustrato; BC: control del conjugado; BP: control positivo; BN: control negativo; S1-S9: diluciones de la curva patrón. El primer número de la clave para las muestras (columnas 6-10) indica el tipo de salchicha (0: sin soya; 1: tipo 1; etc.) y el segundo la dilución.

XII. CÁLCULOS PARA OBTENER LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE SOYA EN LAS MUESTRAS:

Para este ejemplo se tomaron los datos de absorbancia (ver tabla 18) obtenidos para una placa en la que se incluyeron la curva patrón y los extractos de las salchichas sin soya y del tipo 1.

Muestra	1	2	3	4	Media
BS	0.037	0.044	0.043		0.041
BC	0.043	0.042	0.044		0.043
BP	1.302	1.321	1.341		1.321
BN	0.082	0.099	0.088	0.105	0.094
S1	0.102	0.099	0.101		0.101
S2	0.132	0.125	0.127		0.128
S3	0.171	0.156	0.160		0.162
S4	0.229	0.226	0.269		0.241
S5	0.344	0.346	0.352		0.347
S6	0.581	0.553	0.590		0.575
S7	0.866	0.852	0.865		0.861
S8	1.114	1.090	1.094		1.099
S9	1.222	1.211	1.270		1.234
0-1	0.79	0.825			0.808
0-2	1.019	1.001			1.010
0-3	1.115	1.135	1.160	1.122	1.133
1-1	0.154	0.156			0.155
1-2	0.235	0.212			0.224
1-3	0.396	0.404	0.395	0.368	0.391

Tabla 18 Absorbancias (a 490nm) obtenidas en la determinación de proteína de soya mediante un EIA por inhibición. BS: control del sustrato; BC: control del conjugado; BP: control positivo; BN: control negativo; S1-S9: diluciones de la curva patrón. El primer número de la clave para las muestras (columnas 6-10) indica el tipo de salchicha (0: sin soya; 1: tipo 1; etc.) y el segundo la dilución.

La curva patrón se grafica en forma semilogarítmica (ver figura 10) y con los datos que conforman la parte recta (en este caso las diluciones S5 a S8, ver figura 10) se hace un análisis de regresión lineal (ver tabla 19).

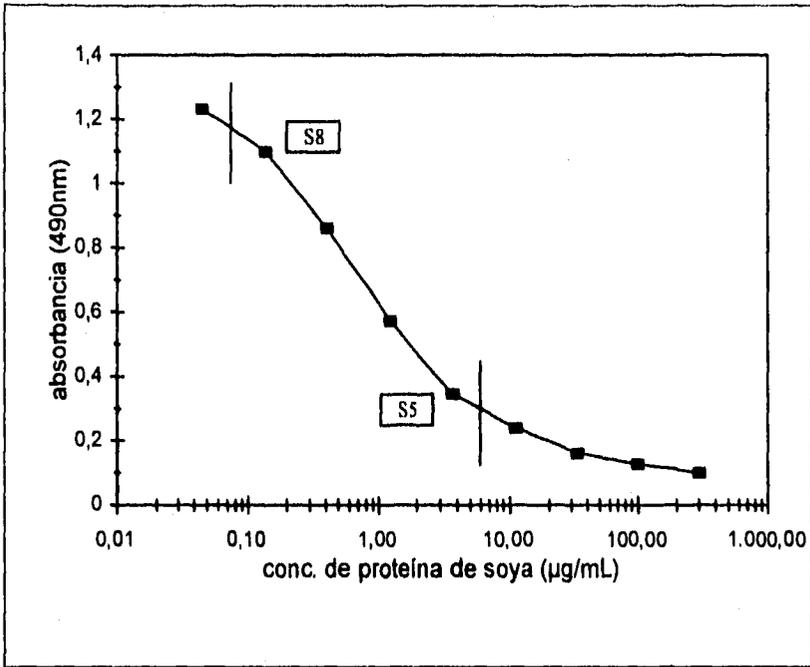


Figura 10 Curva patrón del EIA por inhibición.

Prot. de soya (µg/mL)	log (prot. de soya)	A (490nm)	Regresión lineal
3.7037	0.568636	0.347	$r = -0.99907$
1.2346	0.091515	0.575	$m = -0.5328$
0.4115	-0.385605	0.861	$ord = 0.6422$
0.1372	-0.862728	1.099	

Tabla 19 Datos de regresión lineal de la curva patrón del EIA por inhibición.

Las absorbancias medias de las muestras que queden dentro de la parte recta de la curva patrón se transforman a concentración de proteína de soya con los datos de regresión lineal. En este caso solamente las muestras 0-1 y 1-3 dieron absorbancias dentro del rango indicado. La muestra 0-1 tuvo una absorbancia media de 0.808, lo cual equivale a 0.4896µg/mL de proteína de soya. En cambio la muestra 1-3 contenía 2.964µg/mL.

Se calculan las concentraciones de proteína en las disoluciones renaturalizadas tomando en cuenta las diluciones hechas a cada muestra (ver anexo XI); en el caso de la salchicha sin soya es de 163.2µg de proteína de soya y en el de la salchicha tipo 1 es de 8892µg. Tomando en cuenta la cantidad de polvo de acetona que se pesó para preparar cada disolución y el contenido de proteína total, se calcula el porcentaje de proteína de soya respecto a la proteína total: para la salchicha sin soya es de 0.17% y para la salchicha tipo 1 es de 9.12%.

XIII. GLOSARIO:

- *Aislado de soya*: las proteínas de soya más refinadas que existen en el mercado, se caracterizan por un contenido de proteína mínimo del 90% en base seca.
- *Anticuerpos (o inmunoglobulinas)*: proteínas producidas en la respuesta inmune humoral por las células plasmáticas (linfocitos B activados), reaccionan específicamente con los epítopes.
- *Antígenos*: del inglés antigen (*antibody generator*), macromoléculas capaces de provocar una respuesta inmune; la mayoría son proteínas, péptidos y polisacáridos.
- *Concentrado de soya*: derivado de la soya que contiene un mínimo de 70% de proteína en base seca.
- *Detectabilidad*: capacidad para detectar cantidades pequeñas.
- *Epítopo (o determinante antigénico)*: porción de un antígeno involucrada en la interacción antígeno-anticuerpo, son regiones pequeñas (de 5 a 7 aminoácidos).
- *Hapteno*: molécula que reacciona con anticuerpos pero no es capaz de estimular la producción de los mismos.
- *Inmunogenicidad*: capacidad de estimular la producción de anticuerpos específicos.
- *Sensibilidad*: capacidad de respuesta a pequeños cambios de concentración.

REFERENCIAS

- 1) AOAC Official Methods of Analysis: **AOAC Official Method 988.10: Soy Protein in Raw and Heat-Processed Meat Products. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.** 16th Edition (1995), Vol. II, Chapter 39, p.p. 16-19.
- 2) AOAC Official Methods of Analysis: **AOAC Official Method 981.10: Crude Protein in Meat. Block Digestion Method.** 16th Edition (1995), Vol. II, Chapter 39, p.p. 7-8.
- 3) Badui, S.: **Soya en Química de los Alimentos.** 2ª Ed. México, Alhambra, 1990.
- 4) Berkowitz, D.B.; D.W. Webert: **Determination of Soy in Meat.** *J AOAC.* 1987, 70(1), 85-90.
- 5) Boyer, R.F.: **Modern Experimental Biochemistry.** 2nd Edition. Redwood City, Benjamin Cummings, 1993.
- 6) Bradford, M.: **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** *Anal Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- 7) Burks, A.W.; H.L. Butler; J.R. Brooks; J. Hardin; C. Connaughton: **Identification and Comparison of Differences in Antigens in Two Commercially Available Soybean Protein Isolates.** *J Food Sci.* 1988, 53(5), 1456-1459.
- 8) Catty, D.; C. Raykundalia: **ELISA and Related Enzyme Immunoassays en Antibodies: A Practical Approach.** Vol. II. Oxford, IRL Press, 1989.
- 9) Deweghe, L.; J. Lenges: **Analyse des Protéines Étrangères dans les Produits de Viande.** *Bel J Food Chem Biotech.* 1988, 43(6), 175-182.
- 10) Dryer, R.L.; G.F. Lata: **Experimental Biochemistry.** New York, Oxford University Press, 1989.
- 11) Griffiths, N.M.; M.J. Billington; A.A. Crimes; C.H.S. Hitchcock: **An Assessment of Commercially Available Reagents for an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of Soya Protein in Meat Products.** *J Sci Food Agric.* 1984, 35, 1255-1260.

- 12) Hitchcock, C.H.S.; F.J. Bailey; A.A. Crimes; D.A.G. Dean; P.J. Davis: **Determination of Soya Proteins in Food Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedure.** *J Sci Food Agric.* 1981, 32, 157-165.
- 13) Hugo, A.; J.J. Robertes, M.S. Smith: **Rapid detection of selected non-meat proteins in model boerewors and emulsified meat systems by means of an accelerated ELISA technique.** *SAJ Food Sci Nutr.* 1993, 5(2), 34-40.
- 14) Malvano, R.; A. Boniolo; R.F. Masseyeff: **Problems in Standardization of Enzyme-immunoassays for Antibodies en Methods of Enzymatic Analysis.** Editado por H.U. Bergmeyer, 3ª Edición. Volume X: Antigenes and Antibodies 1. VCH, Weinheim, 1986. p.p.1-10.
- 15) Mandigo, R.W.; R.C. Sander: **Usos, Restricciones y Detección de las Proteínas de la Soya en Productos de la Carne.** Asociación Americana de Soya, México, Cat. No. 51.
- 16) McNeal, J.E.: **Semiquantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Soy Protein in Meat Products: Summary of Collaborative Study.** *J AOAC.* 1988, 71(2), 443.
- 17) Medina, M.B.: **Extraction and Quantitation of Soy Protein in Sausages by ELISA.** *J Agric Food Chem.* 1988, 36(4), 766-771.
- 18) Mendenhall, W.; R.L. Scheaffer; D.D. Wackerly: **Estadística Matemática con Aplicaciones.** México, Iberoamericana, 1986. p.p.405-406.
- 19) Mifek, K.; M. Glawischning: **Nachweis von hitzdenaturiertem Sojaprotein in Fleischwaren mittels Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA).** *Ernährung.* 1989, 13(12), 763-766.
- 20) NOM-122-SSA1-1994: **Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.** Diario Oficial de la Federación. Miércoles 13.12.1995. 63-78.
- 21) NOM-F-065-1984: **Saltichas.** SECOFI, D.G.N.
- 22) Olsman, W.J.; S. Dobbelaere; C.H.S. Hitchcock: **The Performance of an SDS-PAGE and an ELISA Method for the Quantitative Analysis of Soya Protein in Meat Products: An International Collaborative Study.** *J Sci Food Agric.* 1985, 36, 499-507.

- 23) Pastelin, R.; R.E. Ruiz: **Determinación por Métodos Inmunológicos de Derivados de Soya en Productos Cárnicos**. Tesis. Facultad de Química, UNAM, 1978.
- 24) **Proceso de Obtención de Proteína del Frijol Soya**. Asociación Americana de Soya, México, H.N. No.21.
- 25) **PROY-NOM-122-SSA1-1994: Productos Cárnicos Curados y Cocidos y Curados, Emulsionados y Cocidos. Especificaciones Sanitarias**. Diario Oficial de la Federación. Lunes 15.08.1994. 2ª Sección. 93-107.
- 26) Ravestein, P.; R.A. Driedonks: **Quantitative Immunoassay for Soya Protein in Raw and Sterilized Meat Products**. *J Food Tech.* 1986, 21(1), 19-32.
- 27) **Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Título Quinto: De la carne, sus productos y condiciones sanitarias de los establecimientos donde se manipulan. Capítulo V: Empacadoras de carnes frías**. En la Ley General de Salud, 11ª Ed. actualizada. México, Porrúa, 1994. p. 265.
- 28) Rodríguez, C.; C. Martín; F. Centrich: **Aplicaciones de las Técnicas Inmunológicas al Análisis de los Alimentos**. *Alimentaria*. 1990, 27(215), 29-33.
- 29) Sipos, E.F.: **Usos Comestibles de la Proteína de Soya**. Asociación Americana de Soya, México, Cat. No. 47.
- 30) Smith, A.K.; S.J. Circle (Editors): **Soybeans: Chemistry and Technology. Vol. 1: Proteins**. Reviewed 2nd printing. Westport, AVI, 1980.
- 31) Tijssen, P.: **Practice and Theory of Enzyme Immunoassays**. Amsterdam, Elsevier, 1990. Vol. 15 de la colección *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, editada por R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg.
- 32) Voller, A.; D.E. Bidwell; A. Bartlett: **The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**. Alexandria, Dynatech Laboratories, 1979.
- 33) Wolf, W.J.: **Proteínas Comestibles de la Soya y sus Usos**. Asociación Americana de Soya, México, H.N. No. 5.
- 34) Yasumoto, K.; M. Sudo; T. Suzuki: **Quantitation of Soya Protein by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of its Characteristic Peptide**. *J Sci Food Agric.* 1990, 50(3), 377-389.

- 35) Young, L.S.: **Soy Protein Products in Processed Meat and Dairy Foods**. In World Soybean Research Conference III Proceedings (Edited by R.Shibles), Westview Press, U.S.A., 1985, p.183.