



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

VALIDACION DEL METODO DE ELECTROFORESIS EN GEL DE  
ACRIL - BISACRILAMIDA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**NANCY MONTSERRAT TORAL PEÑA**

ASESORA :

DRA. SARA ESTHER VALDES MARTINEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO,

2005

m340588



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Nancy Hatzereat

Tareal Paz

FECHA: 04/09/2004

FIRMA: [Firma]

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ESTADO NACIONAL  
SISTEMA DE  
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E.

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Validación del método de electroforesis  
en gel de acril-bisacrilamida

que presenta 1a pasante: Nancy Montserrat Toral Peña  
con número de cuenta: 9753698-3 para obtener el título de  
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de Agosto de 2004

PRESIDENTE

Dr. Francisco Montiel Sosa

VOCAL

Dra. Sara Esther Valdés Martínez

SECRETARIO

MC. Rosalía Meléndez Pérez

PRIMER SUPLENTE

IBQ. Leticia Figueroa Villarreal

SEGUNDO SUPLENTE

IA. Sandra Margarita Rueda Enríquez

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias Dios por darme la oportunidad y la fortaleza para dar lo mejor de mi y lograr esta nueva meta en mi vida.

A mi mamá Jose (†) por ser el pilar de mi familia, por el gran ejemplo y amor que me dio a lo largo de toda su vida. No te has ido, te llevo día a día en mi corazón.

A mi mamá Isabel por darme la vida, por todas sus enseñanzas y amor que día a día me brinda, por apoyarme y estar a mi lado en todo momento y por alentarme en los momentos más difíciles. Todo lo que soy te lo debo a ti. Te amo mamita.

A mis tías Guille e Irene por todo su amor, ternura, comprensión y apoyo moral y económico incondicional, a ti mamá Guille por darme ese ejemplo de fortaleza y enorme ternura ante las adversidades y a ti mamá Irene por enseñarme que con esfuerzo y tenacidad podemos lograr todo lo que nos proponemos.

A mis hermanas Ale e Irean por estar presentes en cada momento, a ti Irean por ser mi compañera de toda la vida. A ti Ale por alegrar e iluminar día a día mi vida, por ser más que mi hermana mi amiga.

A mi prima Paz por enseñarme que cada día podemos ser mejores, solo basta que nos lo proponemos. Eres una gran mujer.

A mis sobrinos Yutzil, Aarón, Adrián y Karen por todo el cariño, ternura y alegrías que me brindan cada momento.

A Gabriela, por brindarme su confianza durante todos estos años, por estar conmigo y por enseñarme lo valiosa que es la amistad. Eres mi ejemplo de superación constante.

A la Dra. Sara por ayudarme a culminar esta etapa de mi vida, por la paciencia, dedicación y el apoyo incondicional que me brindó para la realización de este trabajo.

A Sergio y Lulú por brindarme su amistad, por sus consejos, por la oportunidad y confianza que depositaron en mí para desarrollar otras capacidades.

A Mary, Michelle, Alan, Adair, Miguel, Felipe, Don Gabino, Raúl y Reynaldo por proporcionarme su amistad, confianza, ayuda, compañía y por alentarme para concluir este trabajo.

A TODOS USTEDES...

*GRACIAS*

*Dedico este trabajo a mis mamás, hermanas, prima y sobrinos  
Ya que sin su amor, apoyo, ejemplo, confianza y aliento  
No hubiera podido cumplir este objetivo.*

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE GRÁFICAS	IX
RESUMEN	X
JUSTIFICACIÓN	XI
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
1.1 ADITIVOS	5
1.1.1 DEFINICIÓN DE ADITIVO	5
1.1.2 NORMATIVIDAD DE LOS ADITIVOS	5
1.1.3 USO DE LAS PROTEÍNAS COMO ADITIVOS	7
1.2 LA SOYA	8
1.2.1 DERIVADOS DE LA SOYA	11
1.2.2 APLICACIONES DE LOS DERIVADOS DE SOYA	13
1.3 ADULTERACIONES EN ALIMENTOS	15
1.4 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA DETECCIÓN DE ADULTERACIONES EN ALIMENTOS	16
1.4.1 ELECTROFORESIS	19
1.4.1.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRIL-BISACRILAMIDA	21
1.4.1.2 PARÁMETROS DE CONTROL EN LA ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRIL-BISACRILAMIDA	26
1.5 VALIDACIÓN	30



1.5.1	TIPOS DE VALIDACIÓN	32
1.5.1.1	VALIDACIÓN PROSPECTIVA	32
1.5.1.2	VALIDACIÓN RETROSPECTIVA	33
1.5.1.3	VALIDACIÓN CONCURRENTE	35
1.5.2	CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	35
1.5.3	DESARROLLO DEL MÉTODO DE VALIDACIÓN	36
<b>2.</b>	<b>DESARROLLO METODOLÓGICO</b>	<b>43</b>
2.1	CUADRO METODOLÓGICO	43
2.2	DESCRIPCIÓN DEL CUADRO METODOLÓGICO	44
2.3	MATERIALES Y MÉTODOS	46
2.3.1	ESPECIFICACIÓN DE LA MUESTRA	46
2.3.2	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA	46
2.3.3	PERFILES ELECTROFORÉTICOS	48
2.3.3.1	PREPARACIÓN DE REACTIVOS	48
2.3.3.2	MANEJO DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS	54
2.3.3.3	FORMULACIÓN DE LOS GELES DE ACRIL-BISACRILAMIDA	54
2.3.3.4	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	55
2.3.3.5	DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMA Y MÁXIMA	56
<b>3.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>59</b>
3.1	PROTEÍNA	59
3.2	GELES DE ACRIL-BISACRILAMIDA	60
3.3	VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRIL-BISACRILAMIDA	67
3.3.1	EXACTITUD, INTERVALO Y SELECTIBILIDAD	67

---

3.3.2 LINEARIDAD	74
3.3.3 PRECISIÓN	79
3.3.4 REPETIBILIDAD Y ROBUSTEZ	80
<b>4. RECOMENDACIONES Y DISCUSIONES</b>	<b>83</b>
4.1 RECOMENDACIONES	83
4.2 CONCLUSIONES	85
<b>5. LITERATURA CONSULTADA</b>	<b>87</b>
<b>6. APÉNDICES</b>	<b>94</b>
APÉNDICE A	94
APÉNDICE B	101

<b>TABLA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SOYA</b>	<b>8</b>
<b>TABLA 2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA DE SOYA</b>	<b>9</b>
<b>TABLA 3. PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA</b>	<b>10</b>
<b>TABLA 4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE LA SOYA EN ALGUNOS SISTEMAS DE ALIMENTOS</b>	<b>14</b>
<b>TABLA 5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE PCR Y ELECTROFORESIS</b>	<b>18</b>
<b>TABLA 6. MARCADOR DE PESOS MOLECULARES</b>	<b>26</b>
<b>TABLA 7. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS SEGÚN LA USP</b>	<b>36</b>
<b>TABLA 8. TÉCNICAS Y HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS APLICADAS EN LA VALIDACIÓN</b>	<b>40</b>
<b>TABLA 9. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AISLADO DE SOYA</b>	<b>46</b>
<b>TABLA 10. REACTIVOS UTILIZADOS PARA EL MÉTODO MICRO-KJELDAHL</b>	<b>47</b>
<b>TABLA 11. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA pH= 8.8</b>	<b>49</b>
<b>TABLA 12. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA pH= 6.8</b>	<b>49</b>
<b>TABLA 13. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CORRIDA 10x</b>	<b>50</b>
<b>TABLA 14. FORMULACIÓN DE LA ACRIL-BISACRILAMIDA 30%</b>	<b>51</b>

<b>TABLA 15. FORMULACIÓN DEL PERSULFATO DE AMONIO</b>	<b>51</b>
<b>TABLA 16. FORMULACIÓN DEL TEMED AL 8.4%</b>	<b>52</b>
<b>TABLA 17. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA</b>	<b>52</b>
<b>TABLA 18. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN TEÑIDORA</b>	<b>53</b>
<b>TABLA 19. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN DESTEÑIDORA</b>	<b>53</b>
<b>TABLA 20. FORMULACIÓN DEL GEL SEPARADOR</b>	<b>54</b>
<b>TABLA 21. FORMULACIÓN DEL GEL CONCENTRADOR</b>	<b>55</b>
<b>TABLA 22. CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LA MUESTRA</b>	<b>59</b>
<b>TABLA 23. PESOS MOLECULARES DE LA BANDA DE INHIBIDOR DE TRIPSINA</b>	<b>66</b>
<b>TABLA 24. RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDIENTES A LA PRUEBA DE HIPÓTESIS</b>	<b>68</b>
<b>TABLA 25. RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS DE CORRELACIÓN</b>	<b>74</b>
<b>TABLA 26. COEFICIENTES DE VARIACIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES</b>	<b>79</b>
<b>TABLA 27. ANÁLISIS DE VARIANZA A DISTINTAS CONCENTRACIONES</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

<b>DIAGRAMA 1. VALIDACIÓN PROSPECTIVA</b>	<b>32</b>
<b>DIAGRAMA 2. VALIDACIÓN RETROSPECTIVA</b>	<b>34</b>
<b>DIAGRAMA 3. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES CRÍTICOS EN EL PROCESO</b>	<b>37</b>
<b>DIAGRAMA 4. CUADRO METODOLÓGICO</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 2. ENSAYOS INICIALES PARA ESTABLECER LAS CONCENTRACIONES</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 3. ENSAYOS CON LAS CONCENTRACIONES DE 0.5 A 4 <math>\mu\text{g} / \mu\text{l}</math></b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 4. ENSAYOS CON LAS CONCENTRACIONES DE 5 A 12 <math>\mu\text{g} / \mu\text{l}</math></b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 5. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA BANDA DE INTERÉS</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 6. ENSAYOS CON LAS CONCENTRACIONES DE 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 Y 0.5 <math>\mu\text{g} / \mu\text{l}</math> Y EL BLANCO</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA 7. GELES OBTENIDOS EN LAS REPETICIONES</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 8. GELES OBTENIDOS EN LAS REPETICIONES</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 9. GELES OBTENIDOS EN LAS REPETICIONES</b>	<b>64</b>

<b>FIGURA 10. GELES OBTENIDOS EN LAS REPETICIONES</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 11. GELES OBTENIDOS EN LAS REPETICIONES</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 12. GELES OBTENIDOS EN LAS REPETICIONES</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 13. PLATO SEPARADOR</b>	<b>94</b>
<b>FIGURA 14. PLATO PEQUEÑO</b>	<b>94</b>
<b>FIGURA 15. CONTENEDOR DEL GEL</b>	<b>94</b>
<b>FIGURA 16. ARMAZÓN DE FORMACIÓN DEL GEL</b>	<b>95</b>
<b>FIGURA 17. PLATAFORMA DE FORMACIÓN</b>	<b>95</b>
<b>FIGURA 18. TAPA PLÁSTICA DE AMORTIGUADOR</b>	<b>95</b>
<b>FIGURA 19. MONTA-ELECTRODOS</b>	<b>96</b>
<b>FIGURA 20. MARCO SUJETADOR</b>	<b>96</b>
<b>FIGURA 21. MINI TANQUE</b>	<b>96</b>
<b>FIGURA 22. ENSAMBLE DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS BIO-RAD</b>	<b>97</b>
<b>FIGURA 23. ENSAMBLE DE LOS CRISTALES</b>	<b>98</b>
<b>FIGURA 24. ENSAMBLE DE LOS CRISTALES DENTRO DEL ARMAZÓN DE FORMACIÓN</b>	<b>98</b>
<b>FIGURA 25. FIJAR LOS CRISTALES AL ARMAZÓN</b>	<b>98</b>

<b>FIGURA 26. ENSAMBLE DEL ARMAZÓN EN LA PLATAFORMA</b>	<b>98</b>
<b>FIGURA 27. EXTRAER LOS CRISTALES DEL ARMAZÓN</b>	<b>99</b>
<b>FIGURA 28. COLOCAR LOS CRISTALES EN EL MONTA-ELECTRODOS</b>	<b>99</b>
<b>FIGURA 29. ENSAMBLE DEL MONTAELECTRODOS DENTRO DEL MARCO SUJETADOR</b>	<b>99</b>
<b>FIGURA 30. ASEGURAR EL MONTA-ELECTRODOS DENTRO DEL MARCO SUJETADOR</b>	<b>99</b>
<b>FIGURA 31. COLOCAR LA CÁMARA INTERNA DENTRO DEL MINI-TANQUE</b>	<b>100</b>

**ÍNDICE DE GRÁFICAS**

<b>GRÁFICA 1.</b> GRÁFICA COMPARATIVA DE LA MEDIA DE LAS CONCENTRACIONES	69
<b>GRÁFICA 2.</b> GRÁFICA COMPARATIVA ENTRE $\bar{x}$ Y $H_0$ A UNA CONCENTRACIÓN DE $0.5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	70
<b>GRÁFICA 3.</b> GRÁFICA COMPARATIVA ENTRE $\bar{x}$ Y $H_0$ A UNA CONCENTRACIÓN DE $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	71
<b>GRÁFICA 4.</b> GRÁFICA COMPARATIVA ENTRE $\bar{x}$ Y $H_0$ A UNA CONCENTRACIÓN DE $2 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	71
<b>GRÁFICA 5.</b> GRÁFICA COMPARATIVA ENTRE $\bar{x}$ Y $H_0$ A UNA CONCENTRACIÓN DE $3 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	72
<b>GRÁFICA 6.</b> REGRESIÓN LINEAL A UNA CONCENTRACIÓN DE $0.5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	76
<b>GRÁFICA 7.</b> REGRESIÓN LINEAL A UNA CONCENTRACIÓN DE $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	76
<b>GRÁFICA 8.</b> REGRESIÓN LINEAL A UNA CONCENTRACIÓN DE $2 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	77
<b>GRÁFICA 9.</b> REGRESIÓN LINEAL A UNA CONCENTRACIÓN DE $3 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	77



## RESUMEN

El presente trabajo muestra una metodología para la validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida a partir de muestras de aislado de proteína de soya.

En primera instancia, se realizó la cuantificación del porcentaje de proteína presente en la muestra de estudio, con el fin de detectar si contenía la cantidad de proteína necesaria para ser considerada como un aislado proteico.

Así mismo se realizaron ensayos electroforéticos previos, cuya finalidad consistió en que, a partir de los resultados obtenidos en éstos, se pudiera determinar las concentraciones de aislado de soya que se emplearían para la validación.

Posteriormente, una vez establecido lo anterior, se efectuaron repeticiones de los ensayos electroforéticos, para que, de esta manera se pudiera contar con los resultados necesarios para realizar la validación del método analítico.

Una vez que se tuvieron los datos necesarios, se procedió a aplicarles las diversas técnicas estadísticas que se requieren para realizar la validación del método.

Finalmente, una vez que se realizó el tratamiento estadístico, se efectuó la interpretación de los resultados obtenidos en dicho tratamiento y con base en esto posteriormente se practicó un análisis de cada uno de los componentes que integran la metodología de validación, logrando así, validar el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad en la industria alimentaria se ha dado un auge en el uso de aditivos, los cuales, tienen como principal función proporcionar a los alimentos características tanto organolépticas como nutricionales deseables para el consumidor. Debido a esto, la normatividad que rige la producción de éstos estipula un intervalo permitido de presencia de dichos compuestos, buscando con esto evitar posibles adulteraciones.

Uno de los aditivos más empleados en la industria resulta ser la proteína de soya, ya que es tan versátil que proporciona numerosas propiedades funcionales a algunos alimentos, como es el caso de los embutidos, salchicha, pan, entre otros y, del mismo modo, es capaz de incrementar las propiedades nutrimentales de los mismos. Lo anterior puede ser contraproducente, debido a que los productores pueden excederse en el uso de éste aditivo logrando con ello emplear menos materia prima y con esto obtener un producto a un menor precio pero de baja calidad.

En relación con lo anterior, el precio final de un alimento está integrado por diversos costos, tales como materia prima, transformación, distribución, conservación, entre otros; sin embargo, en ocasiones se encuentran en el mercado productos terminados cuyo valor total está por debajo del de su materia prima correspondiente, resultando un tanto discordante, dado que en dicho precio no se aprecia ese valor agregado, lo cual hace suponer la posible adición de aditivos, como la proteína de soya, en cantidades superiores a las permitidas, lo cuál constituye un fraude para el consumidor.

Debido a lo anterior, se hace necesario contar con técnicas que sirvan como herramienta en la detección de éstas anomalías, siendo una de éstas, la electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, la cuál ha sido estudiada desde hace más de dos décadas.

Dado que ésta metodología electroforética es muy utilizada en la determinación del perfil electroforético presente en los alimentos, es importante contar con la seguridad de que ésta técnica proporciona resultados confiables, por lo que, es indispensable evaluar

el comportamiento de dicha técnica, lo cuál se realiza mediante la validación del método.

El presente trabajo tiene como finalidad principal estudiar el comportamiento del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida frente a muestras de aislado proteico de soya, con lo cuál se busca evaluar ciertos parámetros que intervienen en la validación, tales como precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, entre otros, a partir de los cuáles se pueda establecer si dicho método electroforético resulta confiable para determinar la presencia de proteína de soya en los alimentos.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes en la elaboración de alimentos es proporcionar a éstos características que resulten atractivas al consumidor, tales como color, textura, aroma, sabor, valor nutritivo, vida de anaquel, entre otras. Es por ello que en la actualidad se ha recurrido al uso de ciertas sustancias denominadas aditivos, los cuales tienen como función principal mejorar dichas características. Se puede definir de forma genérica que un "aditivo es una sustancia que se adiciona a otra en cantidades relativamente pequeñas para mejorar o impartir propiedades deseables así como para suprimir propiedades indeseables".<sup>2, 14</sup>

Aunado a lo anterior, es frecuente encontrar a la venta productos que presenten en su formulación un excedente no reportado de aditivos, ya que el uso de estas sustancias constituye una opción que resulta redituable para los productores debido a que pueden obtenerse alimentos con características deseables a un menor costo.<sup>2</sup> Esta práctica se conoce como adulteración y representa un fraude para el consumidor. Según la FDA (Food and Drug Administration) un alimento se considera adulterado:<sup>14</sup>

- Si algún constituyente importante del alimento ha sido parcial o totalmente eliminado del mismo.
- Si cualquier sustancia ha sido sustituida completamente o en parte.
- Si cualquier sustancia ha sido adicionada o mezclada con el fin de incrementar su peso o volumen, reducir su calidad, o bien, para aparentar un mejor producto de lo que realmente es.

Con el fin de evitar la adulteración de los productos, ha sido indispensable la creación de normas que regulen y garanticen que los alimentos cumplan con las especificaciones establecidas.<sup>2</sup>

Existen diferentes tipos de aditivos, cada uno de los cuales, proporciona al alimento cierta característica proveniente de las denominadas propiedades funcionales que

desarrollan dichas sustancias, y es aquí donde las proteínas juegan un papel primordial, ya que además de ser útiles para el crecimiento y nutrición, son utilizadas como aditivos debido a las propiedades funcionales que desarrollan, mismas que aportan estructura, sabor, color y textura a muchos alimentos.<sup>5, 21</sup>

Dentro del rubro de las proteínas utilizadas como aditivos, quizá la proteína de soya es la más empleada, ya que, aunque inicialmente la soya era utilizada para consumo animal, su uso se ha diversificado y hoy en día los productos extraídos de ésta leguminosa, tales como harinas, concentrados, aislados y sus derivados, mismos que se diferencian entre sí por la concentración de proteína que poseen, son utilizados en la industria alimentaria debido no sólo a los beneficios nutricionales que estos confieren, sino además por las numerosas propiedades funcionales que aportan.<sup>2, 5, 10</sup>

Debido a la necesidad de asegurar la calidad de los productos alimenticios, ha sido necesario incorporar a las buenas prácticas de manufactura diversas herramientas que ayuden a constatar que los alimentos cumplan con los requerimientos establecidos en la normatividad.<sup>23, 61</sup>

Una de estas herramientas es la electroforesis en gel de poliacrilamida, que es un método analítico relativamente fácil de aplicar, rápido y de gran sensibilidad que se utiliza para el estudio e identificación de proteínas y ácidos nucleicos en una muestra, es decir, la aplicación de este método resulta especialmente satisfactoria para determinar la adulteración de un alimento debida a la presencia de algún tipo de proteína que no esté permitida por la legislación.<sup>6, 15</sup>

Además de la implementación de diversos métodos que aseguren la calidad de un producto, es imprescindible contar con la seguridad de que éstos son verdaderamente efectivos, razón por la cual la validación de métodos analíticos se ha convertido en un instrumento que, con el paso del tiempo, ha ganado terreno dentro del área de aseguramiento de calidad, ya que mejora la productividad reduciendo costos de

producción al mismo tiempo que asegura la confiabilidad del método o proceso empleado.<sup>23, 35</sup>

A groso modo, la validación de un método debe incluir pruebas de selectibilidad, linealidad, exactitud, precisión, rango, límite de detección, límite de cuantificación y robustez, entre otras.<sup>28, 42</sup>

Es importante considerar que durante la validación de un método, éste debe desarrollarse bajo las mismas condiciones experimentales, es decir, no debe efectuarse cambio alguno a lo largo de las repeticiones de la técnica, ya que de esta forma es posible corroborar mediante la validación si dichas condiciones son las adecuadas o bien si es necesario hacer algún cambio en la metodología, con lo cual, sería necesario efectuar la revalidación de la técnica.<sup>35</sup>

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Desarrollar la validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida para verificar su efectividad como técnica analítica en la detección de adulteraciones en alimentos originadas por la presencia de proteína de soya.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el contenido de proteína presente en la muestra de aislado de soya que se utilizará durante la experimentación para corroborar las especificaciones dadas por el proveedor y con el fin de contar con un parámetro base para calcular el peso de la muestra requerido para efectuar la electroforesis.
2. Efectuar corridas electroforéticas a diferentes concentraciones de muestra de aislado de soya hasta encontrar el intervalo de concentraciones en las cuáles se definan claramente los patrones electroforéticos para de ésta forma establecer las concentraciones que se utilizarán durante la validación.
3. Realizar las repeticiones del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida a las concentraciones establecidas en el objetivo anterior para de esta manera contar con los perfiles electroforéticos necesarios para efectuar la validación del método.
4. Aplicar a los datos obtenidos en las repeticiones electroforéticas las pruebas estadísticas necesarias para realizar la validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida y de esta manera poder evaluar su efectividad en la detección de aislado proteínico de soya.
5. Analizar los resultados obtenidos en la validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida con el fin de determinar la factibilidad de uso de éste método analítico en la detección de adulteración de alimentos originada por proteína de soya.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 ADITIVOS

#### 1.1.1 DEFINICIÓN DE ADITIVO

Según la legislación "Se entiende por aditivos, aquellas sustancias que se añaden a los alimentos y bebidas, con el objeto de proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; prevenir cambios indeseables o modificar en general su aspecto físico. Queda prohibido su uso para ocultar defectos de calidad" (Art. 657).<sup>58</sup>

#### 1.1.2 NORMATIVIDAD DE LOS ADITIVOS

En la industria alimentaria es indispensable tener en mente que es necesario conferírle al alimento ciertas características como color, textura, aroma, sabor, valor nutritivo, vida de anaquel, etc; mismas que propician la aceptación de un producto en el mercado. Dichas características se obtienen a partir de los ingredientes que se involucran en la formulación, sin embargo, en muchas ocasiones se requiere adicionar ciertos aditivos que ayuden a potencializar o mejorar estas características.

No obstante, debido al auge que han tenido estas sustancias, ha sido necesario crear una legislación que regule el adecuado uso de éstas, haciendo hincapié en que los aditivos deben ser utilizados únicamente con el fin de ayudar a la producción del alimento y no para ocultar las deficiencias de un alimento de mala calidad.<sup>2</sup>

Con el fin de delimitar lo anterior, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, estipula lo siguiente con referencia al empleo de aditivos.<sup>58</sup>

- "Los aditivos deberán ajustarse a las especificaciones de identidad y pureza así como a los límites de contaminantes que la Secretaría establezca, y no deberán



utilizarse en cantidades superiores a las autorizadas en la norma correspondiente” (Art. 659).<sup>58</sup>

- “Se prohíbe la utilización de aditivos para (Art. 664):
- I. Encubrir alteraciones y adulteraciones en la materia prima o en el producto terminado;
  - II. Disimular materias primas no aptas para el consumo humano;
  - III. Ocultar técnicas y procesos defectuosos de elaboración, manipulación, almacenamiento y transporte;
  - IV. Reemplazar ingredientes en los productos que induzcan a error o engaño sobre la verdadera composición de los mismos, y
  - V. Alterar los resultados analíticos de los productos en que se agreguen”.<sup>58</sup>

Pese a lo establecido en la normatividad, es frecuente encontrar en el mercado productos que presentan en su formulación un excedente, no reportado, en lo que a aditivos se refiere, lo cual constituye una violación a la legislación y un engaño para el consumidor. Lo anterior se da principalmente debido a que aditivos tales como las proteínas y sus derivados, confieren al alimento características deseables a un menor costo. Es aquí donde interviene el término “Buenas Prácticas de Fabricación”, el cual es definido en la Norma Oficial Mexicana **NOM 119-SSA1-1994**, “Bienes y Servicios. Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes orgánicos naturales. Especificaciones sanitarias”, de la siguiente manera:<sup>55</sup>

“Buenas prácticas de fabricación: conjunto de normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su uso.”<sup>55</sup>

Es decir, en el área de alimentos es fundamental cumplir en todo momento con las buenas prácticas de fabricación, ya que con esto se asegura que los productos obtenidos siempre cumplirán con las especificaciones establecidas en la legislación correspondiente, evitando así posibles fraudes.

### 1.1.3 USO DE LAS PROTEÍNAS COMO ADITIVOS

En el área de los aditivos se utiliza mucho el término "propiedad funcional", el cual hace referencia a cierta característica no nutricional que posee un ingrediente de la cual va a depender el uso de éste en la elaboración de un alimento.<sup>2</sup>

Las proteínas son utilizadas en diversas áreas, tanto en la alimentación humana como animal, ya que son útiles para el crecimiento, mantenimiento, regulación de las funciones de las células y en algunos casos como fuentes de energía. Aunado a esto, se utilizan como aditivos debido, entre otras razones, a las propiedades funcionales que aportan a muchos alimentos, tales como estructura, sabor, color y textura entre otras, mismas que se derivan de las características fisicoquímicas de cada proteína.<sup>21</sup>

Estas propiedades funcionales pueden dividirse en tres grupos, que a su vez, pueden actuar de forma independiente o bien interactuar entre sí para lograr determinada propiedad. Estos grupos son los siguientes:<sup>2, 5</sup>

- 1) **Propiedades de hidratación (las cuales dependen de la interacción del complejo proteína-agua):** Dentro de este grupo se encuentran las propiedades de absorción y retención de agua, las cuales son de gran importancia en lo que se refiere a la textura de alimentos como carnes trituradas y pastas de panadería; el hinchado aporta propiedades de consistencia, espesamiento, viscosidad y adherencia.
  
- 2) **Propiedades estructurales y reológicas (las cuales dependen de la interacción del complejo proteína-proteína):** Algunas de las propiedades que corresponden a este tipo de interacción son la elasticidad, cohesión, precipitación, gelificación y formación de otras fibras y pastas proteicas, mismas que ayudan a proporcionar cierta estructura a los alimentos, por lo que son empleadas para la elaboración de productos sustitutos de carne principalmente.

- 3) **Propiedades superficiales (las cuales dependen de la interacción del complejo proteína-lípido):** La acción de la unión proteína-lípido da origen a las propiedades funcionales de emulsificación, estabilización y características espumantes que desarrolla una proteína, las cuales son utilizadas en embutidos, productos batidos como crema chantilly y postres congelados gracias a la consistencia que ayudan a desarrollar.

Además de las ventajas funcionales, las proteínas aportan tanto beneficios nutricionales como económicos, ya que se utilizan para disminuir el contenido calórico del alimento, incrementar el nivel de proteína, mejorar la calidad de las proteínas presentes, disminuir los costos al incrementar la producción debido a sus propiedades funcionales, entre otros usos.<sup>14</sup>

## 1.2 LA SOYA

La soya (*Glycine max*) es una leguminosa que debido a su alto contenido en aceite pertenece al grupo de las oleaginosas. La semilla de la soya está conformada por tres partes principales: la cascarilla, el hipocotilo y el cotiledón. Su composición química va a variar dependiendo del tipo de cultivo, de suelo, temperatura, etc, sin embargo a continuación se muestra su composición promedio (Tabla 1).<sup>2, 5</sup>

TABLA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SOYA

	CONSTITUYENTE DE LA SEMILLA (%)	COMPOSICIÓN (% P/P SECO)			
		PROTEÍNA (N * 6.25) (%)	GRASA (%)	HIDRATOS DE CARBONO TOTALES (%)	CENIZAS (%)
SOYA TOTAL	100	40	21	34	4.9
COTILEDÓN	90	43	23	29	5.0
CASCARILLA	8	9	1	86	4.4
HIPOCOTILO	2	41	11	43	4.3

Badui D. Salvador, Química De Los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana (1986), pág. 617

La tabla 1 muestra las proporciones en las que se encuentran divididos los constituyentes de la semilla de soya, que son el cotiledón, la cascarilla y el hipocotilo,

los cuales representan el 90, 8 y 2 % del peso total de la semilla respectivamente; así como las fracciones de proteína, grasa, hidratos de carbono totales y ceniza que contienen dichos constituyentes.

Las proteínas de la soya están compuestas por globulinas (60-75% del total) y albúminas, las cuáles son solubles en soluciones salinas y agua, tienen pesos moleculares muy variados y presentan su punto isoeléctrico a un pH alrededor de 4.2 a 4.8.<sup>2</sup>

En términos generales, la proteína de soya presenta una deficiencia de aminoácidos azufrados, característica que está más acentuada en los aislados proteínicos, esto es debido a que la concentración de metionina y cistina disminuye durante la elaboración de estos productos, en cambio, la cantidad de lisina presente es elevada, lo cual hace que la soya sea adecuada para complementar las proteínas de los cereales. En la tabla 2 se muestra el perfil de aminoácidos correspondiente a la proteína de soya.<sup>2</sup>

**TABLA 2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA DE SOYA  
(GRAMOS DE AMINOÁCIDOS POR 16 g. DE NITRÓGENO)**

AMINOÁCIDO	HARINA DESGRASADA	CONCENTRADOS	AISLADOS
Isoleucina	4.6	4.9	4.8
Leucina	7.7	8.0	7.8
Lisina	6.2	6.2	6.0
Metionina	1.3	1.3	1.0
Cistina	1.2	1.6	1.0
Fenilalanina	5.3	5.3	5.5
Treonina	4.2	4.3	3.7
Triptofano	1.4	1.4	1.3
Valina	4.9	5.0	4.8

Badui D. Salvador, Química De Los Alimentos, Alhambra Mexicana (1986), pág. 619.

La tabla 2 muestra el perfil de aminoácidos esenciales de distintos derivados de la soya, como la harina, concentrados y aislados. El contenido de éstos aminoácidos esta expresado en gramos de aminoácido presentes por cada 16 gramos de nitrógeno.

A pesar de las numerosas ventajas que la soya ofrece, también produce, al igual que otros tejidos vegetales, algunos factores antifisiológicos, como son los originados por los inhibidores de la actividad proteolítica de la tripsina y que se conocen como inhibidores de tripsina de Bowman-Birk y de Kunitz, los cuáles han sido ampliamente estudiados y cuyas principales características se muestran en la tabla 3.<sup>2</sup>

**TABLA 3. PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA**

PROPIEDAD	KUNITZ	BOWMAN-BIRK
PUNTO ISOELÉCTRICO	4.5	4.2
PESO MOLECULAR (DALTONES)	21,500	7,975
NÚMERO DE AMINOÁCIDOS	197	72
ESTABILIDAD A LA ALTA TEMPERATURA, A LOS ÁCIDOS Y A LA PEPSINA	INESTABLE	ESTABLE
HIPERTROFIA PANCREÁTICA	POSITIVA	POSITIVA

Badui D. Salvador, Química De Los Alimentos, Alhambra Mexicana (1986), pág. 631.

La tabla 3 muestra algunos de los rasgos que distinguen entre sí a los inhibidores de tripsina presentes en la soya, como son el peso molecular y la estabilidad a alta temperatura y en presencia de ácidos, encontrando que el inhibidor de Bowman-Birk es el que posee una mayor estabilidad.

Los factores antifisiológicos se logran eliminar mediante tratamiento térmico, sin embargo, es de vital importancia optimizar las condiciones de tiempo-temperatura para combatir éstos, ya que un calentamiento excesivo provoca cambios dañinos en la proteína, mismos que se reflejan en una disminución de su relación de eficiencia proteica (PER).

En un principio, la soya era utilizada básicamente para el consumo de animales como aves, cerdos y ganado, sin embargo, desde 1950 se introdujo su uso al área de la alimentación humana, haciéndose su utilización más extensa debido a la producción de sus derivados (concentrados y aislados), mismos que se utilizan en la elaboración de alimentos.<sup>5</sup>

### 1.2.1 DERIVADOS DE LA SOYA

Al percatarse de la enorme importancia tanto nutricional como funcional que tienen las proteínas, los tecnólogos se han enfocado en la necesidad de desarrollar técnicas que contribuyan a aumentar la disponibilidad de éstas, es así como descubren en la semilla de soya una rica fuente de proteínas a partir de la cual obtienen, mediante procesos controlados para conservar sus propiedades funcionales, subproductos como los que se enlistan a continuación:<sup>5, 10</sup>

- **MOLIDOS Y HARINAS DE SOYA:** Constituyen la forma menos refinada de presentación de los ingredientes de soya, se obtienen a partir de la molienda y extracción del aceite de las hojuelas de esta leguminosa ya sea antes o después de la molienda. Su contenido de proteína oscila entre el 40 y 54%.<sup>10</sup>

Así mismo, de acuerdo al contenido de aceite presente, la harina y molido de soya pueden clasificarse en:

1. **Harina grasa de soya:** Contiene alrededor del 40% de proteína y es utilizada principalmente en la industria panadera y en la producción de leche de soya.<sup>10</sup>
2. **Harina alta en enzimas:** Contiene alrededor del 52-54% de proteína. Se utiliza en la industria panadera ya que ayuda a incrementar la tolerancia al mezclado, al blanqueado del pan y como materia prima para la producción de aislados y concentrados de soya.<sup>10</sup>
3. **Harina de soya desengrasada:** Contiene alrededor del 52-54% de proteína. Se utiliza en alimentos en donde se requiere un alto grado de proteínas solubles.<sup>10</sup>

4. **Harina de lecitina o reengrasada:** Contienen alrededor del 0.5-30% de lecitina o aceite vegetal y se utiliza en la industria panadera debido principalmente a su habilidad para emulsificar.<sup>10</sup>
- **CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DE SOYA:** Contienen un mínimo de 70% de proteínas y, debido a sus propiedades de adherencia, son empleados principalmente como emulsificantes y estabilizantes de emulsiones.<sup>10</sup>
- **AISLADOS DE PROTEÍNAS DE SOYA:** Tienen un contenido mínimo de 90% en su fracción proteica. Se clasifican en:<sup>10</sup>
1. **AISLADO ISOELÉCTRICO DE PROTEÍNA DE SOYA:** La proteína se extrae con agua a un pH de 8.5-9.0. Posteriormente se somete a centrifugación con el fin de remover el residuo insoluble. Para lograr la precipitación de las proteínas, el líquido extraído se ajusta a un pH de 4.5 y se somete a una segunda centrifugación, el residuo se lava y se rocía en seco para obtener así el aislado isoelectrico, el cual tiene aplicaciones nutricionales; sin embargo, este tipo de aislado presenta baja solubilidad y una actividad funcional muy limitada, por lo que se requiere someterlo a un proceso de neutralización.<sup>10</sup>
  2. **AISLADOS NEUTRALIZADOS DE SOYA:** Se obtienen a partir del aislado isoelectrico de soya, el cual es neutralizado con un álcali para formar proteinatos de calcio, sodio o potasio, logrando así un incremento en la solubilidad del aislado. Se utilizan como agentes emulsificantes, estabilizadores de emulsiones, adhesivos y como formadores de fibras.<sup>10</sup>
- **PROTEÍNA DE SOYA TEXTURIZADA (TSP):** Debido a sus características, tiene la propiedad de simular la estructura de la carne, pollo o productos marinos una vez que es hidratada.<sup>10</sup>

### 1.2.2 APLICACIONES DE LOS DERIVADOS DE SOYA

Como se mencionó anteriormente, los derivados de soya son utilizados en la industria de los alimentos para el enriquecimiento proteico de muchos productos, así como también para reemplazar parcialmente algunos componentes y comúnmente se incorporan a los alimentos para proporcionarles mejores propiedades funcionales.<sup>5</sup> La diversidad de usos que ofrece este aditivo está dada por las distintas características fisicoquímicas propias de la soya, las cuales afectan el comportamiento de la proteína logrando así diferentes propiedades funcionales.<sup>10</sup> Es así que estos productos son utilizados como emulsionantes, gelificantes, espumantes, etcétera. En la tabla 4 se sintetizan algunas de las propiedades funcionales de las proteínas de soya y los alimentos en los que se emplean.

Adicionalmente, debido a sus propiedades nutritivas, la soya se utiliza para la fabricación de complementos alimenticios, productos sustitutos de la leche humana, derivados vegetales y otros productos que, en algunos casos, resultan económicamente ventajosos para el consumidor además de que su calidad nutricional resulta benéfica para los mismos.<sup>2</sup>



**TABLA 4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE LA SOYA EN ALGUNOS SISTEMAS DE ALIMENTOS**

PROPIEDAD FUNCIONAL	FORMA DE LA PROTEÍNA	SISTEMA UTILIZADO
<b>EMULSIFICACIÓN</b>		
Formación	H, C, A	Salchichas, embutidos, salami, panes, pasteles y sopas
Estabilización	H, C, A	Productos batidos como crema chantilly, postres congelados, embutidos en general
<b>ABSORCIÓN DE GRASA</b>		
Promoción	H, C, A	Salchichas, embutidos y hamburguesas
Prevención	H, A	Donas y bollos
<b>ABSORCIÓN DE AGUA</b>		
Absorción	H, C	Pasteles, panes y pastas
Retención	H, C	Pan y pasteles
<b>TEXTURA</b>		
Viscosidad	H, C, A	Sopas y salsas
Gelificación	A	Sustitutos de carne molida
Formación de fibras	A	Sustitutos de carne
<b>FORMACIÓN DE MASAS</b>	H, C, A	Productos de panificación
<b>FORMACIÓN DE PELÍCULAS</b>	A	Salchichas y salami
<b>ADHESIÓN</b>	C, A	Embutidos, carnes frías y productos cárnicos
<b>COHESIÓN</b>	H, A	Productos horneados, macarrones y sustitutos de carne
<b>ELASTICIDAD</b>	A	Productos horneados y sustitutos de carne
<b>CONTROL DEL COLOR</b>		
Blanqueado	H	Pan
Oscurecimiento	H	Pan y derivados
<b>AERACIÓN</b>	A	Productos batidos y confituras

H = harina; C = concentrado; A = aislado

Badui D. Salvador, Química De Los Alimentos, Alhambra Mexicana (1986), pág. 629

En la tabla 4 se muestra una síntesis de las principales propiedades funcionales que desarrollan las proteínas de soya, las diferentes presentaciones o formas en las que se encuentran dichas proteínas en el mercado y que se utilizan para obtener la funcionalidad deseada, así como algunos de los alimentos en los que se emplean comúnmente éstos derivados de la soya, logrando con esto un producto de características deseables.

De igual forma, como se observa en la tabla 4, los derivados de la soya son utilizados principalmente en la industria de los cárnicos, razón por la cual, la legislación oficial ha establecido los límites de soya permitidos para este tipo de productos, siendo de hasta un 2% de proteína de aislado de soya y de 3.5% de harina de soya con respecto a la composición total del alimento.<sup>54, 56, 57</sup>

### 1.3 ADULTERACIONES EN ALIMENTOS

Debido a las ventajas funcionales y económicas que aportan los aditivos a la industria alimentaria, pudiera resultar común hacer uso excesivo de éstos, haciendo a un lado las especificaciones y cantidades permitidas que se marcan en la legislación correspondiente, lo cual constituye un fraude para el consumidor.

Con el fin de evitar estas anomalías, en la legislación mexicana vigente se establecen ciertos lineamientos que ayudan a impedir la adulteración de alimentos. Tal es el caso del Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios, en donde se establece que:<sup>58</sup>

- “Está prohibida la venta o suministro de los productos o materias primas que sean adulterados, contaminados o alterados durante cualquiera de las fases del proceso. La infracción de ésta disposición originará la adopción de medidas de seguridad por parte de la Secretaría, además de las sanciones administrativas que procedan” (Art. 32).

- “Se considera adulterado un producto cuando:
  - I.- Su naturaleza o composición no corresponda a aquéllas con que se etiquete, anuncie, expendá, suministre o cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización, o
  - II.- Haya sido objeto de tratamiento que disimule su alteración o encubra defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas” (Art. 33).
  
- “Se considera alterado un producto o materia prima cuando, por efecto de cualquier causa, haya sido objeto de modificaciones en su composición intrínseca que (Art. 35):
  - I.- Reduzca su poder nutritivo o terapéutico;
  - II.- Lo conviertan en nocivo para la salud, o
  - III.- Modifique sus características fisicoquímicas u organolépticas, rebasando los límites autorizados por la Secretaría.<sup>58</sup>

De lo anterior se resume que debido al papel tan importante que juegan los aditivos en la industria alimentaria, entre los que se encuentran las proteínas, se hace necesaria la implementación de diversos métodos analíticos a través de los cuáles sea posible la identificación de adulteraciones en los alimentos.<sup>21</sup>

#### **1.4 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA DETECCIÓN DE ADULTERACIONES EN ALIMENTOS**

Como se mencionó anteriormente, debido a la incidencia que se ha dado en la adulteración de alimentos, se ha requerido establecer diversos métodos de análisis que permitan detectar dichas anomalías. Algunas de las técnicas que permiten la identificación de estas irregularidades son la conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis, entre otras.<sup>25, 26, 27</sup>

La técnica de PCR fue descubierta por el Dr. Kary Mullis en la década de los 80's.<sup>9</sup> Este método se utiliza para la detección y análisis de secuencias de ácidos nucleicos específicos, es por esto que ha revolucionado el campo de la biología molecular, ya que permite a los investigadores identificar la presencia de una secuencia específica de DNA y de una manera rápida y fácil genera copias ilimitadas de cualquier fragmento del material genético en cuestión.<sup>3, 40</sup>

Debido a las características y funcionalidad que ofrece esta técnica, es utilizada en diversos campos de la ciencia, tales como la medicina, ciencia forense y alimentos, entre otros.<sup>3, 40</sup>

En la industria alimentaria, esta técnica es utilizada principalmente en la determinación de las especies de animales de las cuales procede cierto alimento, para la identificación y cuantificación de productos transgénicos presentes en algún alimento, en la detección de microorganismos patógenos o bien, como se mencionó en un principio, para determinar adulteraciones.<sup>9, 22, 25, 26, 31, 32, 37, 39</sup>

La electroforesis es un método que se basa en la separación de las proteínas o ácidos nucleicos presentes en una muestra de acuerdo con ciertos parámetros como la carga neta y el tamaño de la molécula. Esta técnica analítica es utilizada en la industria alimentaria para el monitoreo de la composición de los alimentos, sobre todo para la detección de alimentos genéticamente modificados y para la identificación de la adición de sustitutos o ingredientes no autorizados.<sup>26, 37</sup>

Aunque los dos métodos mencionados son empleados en el área de alimentos, resulta interesante identificar algunas de las ventajas y desventajas que conlleva el uso de dichas técnicas. En lo referente a la sensibilidad del método, diversos estudios muestran que la técnica de PCR es tan sensible que es capaz de detectar la presencia de DNA de soya en cantidades menores a 0.01 ng, mientras que la electroforesis requiere de por lo menos 0.5 µg de muestra para la identificación de alguna proteína.<sup>26,</sup>

<sup>32</sup> La factibilidad de uso tiene mucho que ver con lo sofisticado del método, ya que una desventaja de las técnicas basadas en el análisis de nucleótidos, como el PCR, es que

requieren de instalaciones y de personal especializado para efectuarlas, lo cual dificulta su aplicación en comparación con la electroforesis, misma que se caracteriza por ser relativamente fácil de llevar a cabo. Lo anterior se relaciona directamente con el costo que implica efectuar alguna de éstas técnicas, siendo la PCR la opción que involucra un mayor costo.<sup>27, 31</sup> La especificidad que desarrolla un método resulta ser un factor decisivo al momento de elegir el más adecuado para efectuar un análisis, a este respecto, debido a que la técnica PCR se enfoca en identificar secuencias específicas de DNA, se considera que tiene una mayor especificidad. Finalmente, lo anterior ratifica la confiabilidad del método de PCR, ya que la principal ventaja de los métodos basados en el DNA sobre aquellos basados en las proteínas es la habilidad para obtener resultados confiables aún con alimentos o muestras procesadas.<sup>25</sup>

En la tabla 5 se muestra un comparativo de las ventajas y desventajas de los métodos PCR y electroforesis de proteínas.

TABLA 5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE PCR Y ELECTROFORESIS

MÉTODO	SENSIBILIDAD	FACTIBILIDAD DE USO	COSTO	ESPECIFICIDAD	CONFIABILIDAD	ESTABILIDAD TÉRMICA
PCR	+	-	+	+	+	+
ELECTRO-FORESIS	-	+	-	-	-	-

En la tabla 5 se observa que las principales ventajas que ofrece el método PCR frente al de electroforesis son que el primero ofrece una mayor sensibilidad, especificidad y confiabilidad, sin embargo, al tener una menor factibilidad de uso y un costo más elevado, estas dos últimas características constituyen las desventajas de dicho método.

No obstante, el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida resulta ser una opción viable para el análisis de alimentos debido principalmente a su sencillez, factibilidad de uso y a que, a pesar de ser un método menos sensible en comparación con PCR, sigue siendo muy confiable, es por ello que este trabajo experimental se centra en el estudio de dicha técnica.

### 1.4.1 ELECTROFORESIS

La electroforesis es una herramienta analítica que se ha ido aplicando desde 1937 y ha evolucionado a tal grado, que en nuestros días es uno de los métodos más aplicados y efectivos en lo que a separación y caracterización se refiere.<sup>4, 15</sup>

Se caracteriza por ser una técnica relativamente fácil de aplicar, rápida y de gran sensibilidad que se utiliza como un método de separación y para el estudio de las propiedades de especies cargadas, tales como las proteínas y ácidos nucleicos. Una de las restricciones que presenta la técnica es que los componentes de la mezcla deben tener forma iónica y una carga neta diferente.

Este método se basa en la migración de moléculas cargadas en una solución al ser sometidas a un campo eléctrico. Esta movilidad va a depender de diversos factores, tales como, la resistencia que ofrece el campo eléctrico, la carga neta, el tamaño y forma de las moléculas, la resistencia iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual se lleva a cabo el desplazamiento.<sup>8</sup>

En el caso de las proteínas, por tratarse de compuestos cuya carga neta está dada por el pH del medio en el cual se encuentra, si se localizan en una solución con un pH mayor a su punto isoelectrónico, adquieren carga negativa y se desplazan hacia el ánodo, mientras que si se encuentran en un medio con pH inferior a su punto isoelectrónico, la proteína es cargada positivamente y va a migrar hacia el cátodo.<sup>41</sup>

Ésta separación se lleva a cabo mediante el uso de un material de soporte, ya sea sólido o acuoso, el cual tiene como función contrarrestar los efectos de convección y difusión que pudieran presentarse durante la migración y al mismo tiempo, facilitar la inmovilización de las proteínas que se separan.

En función del estado en que se encuentren las proteínas a lo largo del proceso electroforético, la electroforesis puede clasificarse en electroforesis nativa o desnaturizante. La primera de éstas es la que somete a las proteínas a migración sin

desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. La electroforesis desnaturalizante es la más común y consiste en someter a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.<sup>12</sup>

Otra clasificación de los métodos electroforéticos es la siguiente:<sup>4</sup>

- **LÍMITE MÓVIL:** Este método se utiliza para demostrar la pureza de una muestra o bien para valuar las concentraciones de los solutos. Se caracteriza porque la electroforesis se lleva a cabo en solución salina, es decir, las partículas se desplazan en un medio conductor acuoso. Durante la técnica las moléculas migran hacia el electrodo opuesto a su carga formando un borde con el cual se evidencia la presencia de cada componente de una muestra, es decir, los límites que se forman entre las partículas de soluto que se desplazan y la región del canal que contiene la solución son indicadores del número de solutos que se encuentran en la muestra. Una desventaja de este método es que, por tratarse de un medio acuoso, no es posible que los solutos lleguen a separarse por completo unos de otros.
  
- **ZONALES:** Esta técnica requiere de un soporte sólido en donde la migración puede llevarse a cabo de forma horizontal o vertical, dependiendo de la conformación del equipo. Es un método que ofrece mayores ventajas que el de límite móvil, razón por la cual es más utilizado. Uno de los beneficios que ofrece este método es que, además de caracterizar la pureza de un compuesto, permite llevar a cabo la separación de solutos, ya que éstos pueden resolverse en zonas discretas.<sup>4</sup>

Debido a que este procedimiento es más utilizado, se ha presentado una evolución en lo que a soportes se refiere, es decir, en un inicio se utilizaban tiras

de papel filtro y en 1955 O. Smithies estableció el uso de geles porosos de almidón, los cuales presentaban una resolución mayor que otras técnicas. Pese a las ventajas que este soporte ofrecía, resultaba relativamente complicada la preparación del mismo y los resultados obtenidos eran un tanto variables, razón por la cual fue necesario desarrollar un soporte más funcional, siendo así como en 1959 L. Ornstein y B.J. Davis encontraron en los geles de poliacrilamida la opción más adecuada para subsanar dichas desventajas. Estos geles se caracterizan por ser porosos, lo cual les confiere una funcionalidad tipo tamiz que permite retardar u obstruir el movimiento de las macromoléculas mientras que las de menor tamaño pueden desplazarse libremente, logrando así su separación por tamaño de molécula.<sup>41</sup>

Aunado a lo anterior, algunas otras ventajas que ofrece este tipo de soporte se enlistan a continuación:<sup>4</sup>

- Resolución comparable con la de los geles de almidón
- Termoestables
- Transparentes
- Durables
- Relativamente inertes químicamente
- No iónicos
- Fáciles de preparar con distintos tamaños de poro.

#### **1.4.1.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRIL-BISACRILAMIDA**

Es un método analítico que se basa en el tamizado y la migración de moléculas dentro de un campo eléctrico. Esta técnica es de tipo zonal, por lo que requiere de un gel de poliacrilamida como soporte, cuya porosidad juega un papel primordial para el correcto desempeño de la prueba y está en función de las concentraciones de los componentes del gel.



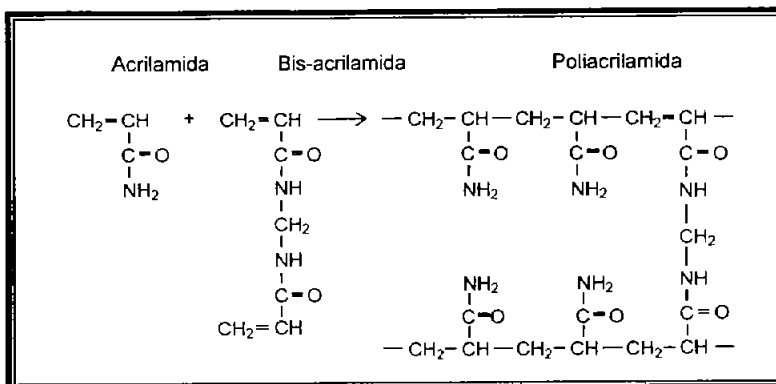
La electroforesis en gel de poliacrilamida es empleada para determinar el peso molecular, pureza de las proteínas, actividad enzimática, y secuencia de aminoácidos, entre otras, en las que este método es de suma utilidad.<sup>15</sup>

Presenta las siguientes ventajas:<sup>6</sup>

- a) Los polipéptidos estándar y los de estudio pueden correrse en el mismo gel.
- b) Uniformidad tanto en la polimerización como en el hinchado o encogimiento durante el teñido y desteñido.
- c) Versatilidad en el manejo. Se puede someter a secado, auto-radiografía y fotografía.
- d) Mayor exactitud en las determinaciones de peso molecular.
- e) Los aparatos que se requieren son sencillos y relativamente económicos, además de que es factible su uso en casi cualquier laboratorio.
- f) Requieren pequeñas cantidades de proteína dependiendo del método de tinción que se elija. En términos generales, la detección con azul de Coomassie requiere de 2-10µg de muestra por banda, mientras que para la detección con Plata se requieren cantidades de 0.5-2µg por banda.
- g) La muestra no requiere estar pura, ya que este método es capaz de separar diferentes moléculas.<sup>6</sup>

Los geles de poliacrilamida están conformados por los monómeros acrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) y N-N'-metilén-bis-acrilamida o bis-acrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), así como por una combinación de los iniciadores persulfato de amonio y TEMED (N,N,N',N'-tetrametilén-diamina) u ocasionalmente de riboflavina y TEMED. La reacción de polimerización se muestra en la figura 1.<sup>38</sup>

FIGURA 1. REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN



Menter, Paul, Acrylamide Polymerization. A Practical Approach, Bio-Rad Laboratories (2000), pág 1.

La reacción de polimerización de estos dos monómeros se inicia por una serie de radicales libres generados a partir del persulfato de amonio y TEMED. Éste último reactivo tiene como función principal acelerar la formación de los radicales libres del persulfato, los cuales actúan como catalizadores de la polimerización, ya que convierten los monómeros de acrilamida a radicales libres para que estos últimos reaccionen con los monómeros inactivos y así iniciar la reacción de cadenas de polimerización. Estas cadenas se entrecruzan con la bisacrilamida dando como resultado un gel con determinada porosidad, la cual está determinada por las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida en comparación con la acrilamida se emplee. Comúnmente se utilizan geles con concentración al 15% de acrilamida, sin embargo, se ha visto que esta concentración no reporta resultados satisfactorios si se desea analizar péptidos con pesos moleculares menores a los 15,000 daltones, por lo que para contrarrestar este problema, se han desarrollado soluciones alternas, encontrando que para el análisis de péptidos de cadena corta se obtiene una mejor resolución si se utilizan geles de poliacrilamida al 12% de concentración, logrando con esto el análisis de polipéptidos cuyos pesos moleculares están dentro de un rango de 2,500 – 90,000 daltones.<sup>12, 38</sup>

Existen dos sistemas electroforéticos, el discontinuo, que es el más utilizado, y el continuo. El sistema discontinuo está formado por dos tipos de geles superpuestos uno encima del otro, esto es, consta de un gel separador o de resolución sobre el cual se encuentra un gel concentrador. Por otro lado, el sistema continuo únicamente está conformado por el gel concentrador. Cada uno de estos geles se obtienen a partir de dos soluciones amortiguadoras diferentes.

El gel de resolución es en el cual las proteínas se separan y la solución amortiguadora de la que se obtiene tiene un pH de 8.8. Por otro lado, el gel concentrador utiliza una solución con un pH dos unidades menor que el de separación (pH 6.8).

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis'). Fue descrito por Laemmli y se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de una tercera solución amortiguadora que contiene agentes desnaturizantes como el beta-mercaptoetanol, el cuál se encarga de reducir los enlaces disulfuro a grupos sulfidrilos, de tal modo que si la muestra cuenta con este tipo de enlaces, con la solución amortiguadora estos enlaces se rompen y al someterla a un campo eléctrico, las moléculas electrificadas negativamente podrán migrar únicamente debido a su peso molecular. Otro agente desnaturizante es el SDS, que es un detergente aniónico que actúa sobre la muestra cubriendo las cadenas polipeptídicas desnaturizando así las proteínas de modo tal que éstas se desdobl原因 en sus polipéptidos constitutivos, los cuales se unen al SDS en una proporción de 1.4 g de SDS por gramo de polipéptido, este exceso trae como consecuencia que la carga del péptido se considere imperceptible en comparación con la carga negativa del SDS, siendo de este modo como las moléculas presentan una carga prácticamente idéntica y su desplazamiento a lo largo del gel dependerá primordialmente de su tamaño molecular.<sup>12, 15, 34</sup>

Para una correcta determinación del peso molecular de un polipéptido es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones:<sup>6</sup>

- Todos los polipéptidos deben ligar la óptima cantidad de SDS y tener una carga constante.
- Deben tener la misma forma o conformación.
- La electroforesis tanto de los polipéptidos conocidos como los sujetos de estudio deben correr bajo las mismas condiciones al mismo tiempo y preferentemente en el mismo gel.<sup>6</sup>

Para lograr determinar el peso molecular de un determinado compuesto es necesario, en primera instancia aplicar la técnica tanto a una muestra que contenga proteína de peso molecular conocido como a la muestra problema, esto con el fin de obtener una comparación entre ambas muestras, dicho de otra manera, existe una relación lineal entre el logaritmo del peso molecular del polipéptido desnaturalizado y el Rf, el cual se define como la proporción de la distancia que se desplazó la molécula durante la electroforesis.

Es necesario construir una curva patrón con los datos obtenidos de la muestra de peso molecular conocido y posteriormente interpolar los datos obtenidos de la muestra problema con el "eje Y" obteniendo así su peso molecular.<sup>41</sup>

En el mercado existen marcadores de pesos moleculares, los cuales se emplean para construir una curva estándar o curva patrón, misma que se va a utilizar, como se mencionó anteriormente, para determinar el peso molecular de la proteína que está siendo analizada.

En la tabla 6 se muestran los datos correspondientes a un marcador de pesos moleculares.<sup>15</sup>

TABLA 6. MARCADOR DE PESOS MOLECULARES

POLIPÉPTIDO	PESO MOLECULAR (Kda)
MIOSINA	212
$\alpha$ 2-MACROGLOBULINA	180
$\beta$ -GALACTOSIDASA (E.coli)	116
FOSFORILASA b	97.4
FOSFORILASA a (MÚSCULO DE CONEJO)	92.5
FRUCTOSA-6-FOSFATO KINASA (MÚSCULO DE CONEJO)	84
ALBÚMINA DE BOVINO	66-68
CATALASA	57.5
FUMARASA (CORAZÓN DE PORCINO)	48.5
OVOALBÚMINA	43
ALDOLASA (MÚSCULO DE CONEJO)	36.5
ANHIDRASA CARBÓNICA	29-31
INHIBIDOR DE TRIPSINA DE SOYA	8.0
MIOGLOBINA	17
$\alpha$ -LACTOALBUMINA (LECHE DE BOVINO)	14.4
LISOZIMA (HUEVO BLANCO)	14.3
CITOCROMO C	11.7
APROTIMINA	6.5
INSULINA B	3.5
BACITRASINA	1.45

Rosemberg, Ian M. Protein Analysis And Purification. Benchtop Techniques, Ed. Birkhäuser (1996), pág. 76

La tabla 6 muestra los pesos moleculares en kilodaltones (Kda) correspondientes a ciertos polipéptidos presentes en un marcador de pesos moleculares que se emplea en la electroforesis.

#### 1.4.1.2 PARÁMETROS DE CONTROL EN LA ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRIL-BISACRILAMIDA

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida posee la ventaja de ser muy reproducible. Las variaciones que se pueden llegar a presentar son debidas a la falta de control sobre algunos parámetros. Uno de estos lo constituye el cuidado que se debe

tener con los reactivos que se utilizan para elaborar el gel, ya que pequeñas variaciones en pH o presencia de contaminantes pueden ocasionar diversos problemas a lo largo de la electroforesis. A continuación se enlistan algunos puntos de control en la electroforesis.<sup>38</sup>

#### ➤ PUREZA DE LOS REACTIVOS

a) **Acrilamida y bisacrilamida:** Debido a que la acrilamida y la bisacrilamida son los principales componentes en la solución, estos reactivos representan una de las principales fuentes de contaminación, por lo cual es indispensable tener especial cuidado en la calidad y pureza de estos componentes ya que pueden llegar a contener alguno de los siguientes contaminantes.<sup>38</sup>

1.- **ÁCIDO ACRÍLICO:** Este componente puede copolimerizar con la acrilamida y bisacrilamida dando como resultado un intercambio de las propiedades iónicas del gel resultante, lo cual trae como consecuencia un cambio de pH en el gel originando resultados desfavorables, tales como la irreproducibilidad entre corridas, precipitación de algunas proteínas y ácidos nucleicos, así como manchas en las bandas.<sup>38</sup>

2.- **POLIACRILAMIDA LINEAL:** Este componente, que se produce como consecuencia de una autopolimerización originada por ciertos contaminantes que tengan propiedades catalíticas, afecta la polimerización, ya que actúa como núcleo generando efectos indeseables como son la pérdida de reproducibilidad en la porosidad del gel y movilidad de las proteínas y ácidos nucleicos.<sup>38</sup>

3.- **CONTAMINANTES IÓNICOS:** Éstos incluyen tanto inhibidores como aceleradores de la polimerización.<sup>38</sup>

b) **Iniciadores de reacción:** La solución TEMED está propensa a sufrir oxidación, la cual afecta directamente su capacidad catalítica, requiriendo mayores

cantidades del compuesto para lograr la polimerización. Del mismo modo, el TEMED posee la facilidad de acumular agua dando como resultado una aceleración en la descomposición oxidativa.

Por otro lado, el persulfato de amonio es un componente sumamente higroscópico, lo cual resulta contraproducente, ya que al empezar a disolverse en el agua, este componente comienza a romper sus enlaces. Así mismo, al haber una acumulación de agua el persulfato sufre una rápida pérdida de reactividad, razón por la cual es conveniente utilizar solución recién preparada.<sup>38</sup>

### ➤ TIPO DE INICIADOR Y CONCENTRACIÓN

En este sentido es importante prestar atención a la concentración de componente iniciador que se agrega, ya que de ésta van a depender las características finales del gel obtenido. Por ejemplo, si se adiciona TEMED y persulfato de amonio en exceso, puede dar como resultado un descenso en el tamaño promedio de las cadenas del polímero que se obtienen, originando un descenso en la elasticidad del gel, un aumento en la turbidez del mismo o bien, en casos extremos, debido a la formación de cadenas tan cortas, no se visualiza la gelificación, dando la impresión de que no se llevó a cabo la polimerización.

Por otro lado, si la concentración de estos componentes no es suficiente, el oxígeno comenzará a interactuar con la solución del monómero inhibiendo la polimerización obteniendo así geles demasiado porosos y de consistencia débil. Es por esto que el tiempo óptimo para que se lleve a cabo la gelificación en sistemas discontinuos, es de 15-20 minutos después de haber adicionado los compuestos iniciadores. Si dicho fenómeno toma más de 20 minutos, los efectos inhibidores del oxígeno comenzarán a hacerse presentes.<sup>38</sup>

## ➤ TEMPERATURA

Un factor crítico que afecta directamente la reproducibilidad de la polimerización es la temperatura, ya que la reacción de polimerización es de tipo exotérmico, el calor generado induce a que la reacción se lleve a cabo más rápido, de ahí que normalmente la gelificación se produzca rápidamente una vez que el proceso de polimerización inicia.

Del mismo modo, la temperatura afecta las propiedades del gel, de tal forma que a bajas temperaturas (0-4°C) se obtiene un gel turbio, poroso e inelástico y de reproducibilidad difícil de lograr. Este fenómeno se debe a que a bajas temperaturas se da un incremento de los puentes de hidrógeno con el monómero. Por otro lado, la temperatura óptima para la polimerización es a 23-25°C, ya que es cuando se obtiene un gel más transparente, menos poroso y más elástico. Si la temperatura es más elevada se forman cadenas cortas del polímero originando que el gel sea inelástico.<sup>38</sup>

## ➤ OXIGENO

El oxígeno puede actuar como un inhibidor de la polimerización, ya que como ésta reacción se produce vía radicales libres, el oxígeno presente en el aire actúa como una trampa de radicales libres inhibiendo o previniendo así la polimerización.

Existen muchas formas de asegurar la reproducibilidad de la polimerización, uno de los métodos más sencillos consiste en monitorear el tiempo que tarda en presentarse la gelificación, ya que un cambio significativo en este tiempo es un indicador de que alguno de los parámetros requeridos para la polimerización ha cambiado.<sup>38</sup>



## 1.5 VALIDACIÓN

Hoy en día se ha dado un auge en el uso de métodos analíticos en diversas áreas y la de alimentos no es la excepción; esto es debido a los requerimientos que estipulan las diferentes legislaciones vigentes, en las cuales se hace hincapié en el aseguramiento de calidad.<sup>42</sup>

Este término se define dentro de la CGMP (Current Good Manufacturing Practice) de la siguiente manera:

“ Todas las actividades necesarias para verificar la calidad de un proceso que se aplica para la manufactura de algún producto”.<sup>42</sup>

Dicho de otra forma, para asegurar la calidad de un producto terminado es necesario controlar numerosos factores a lo largo de la producción del mismo, como la selección de la materia prima, formulación, condiciones del proceso, entre otras. Debido a esto es de vital importancia contar con métodos analíticos que permitan demostrar si efectivamente, se obtiene un alimento de calidad o, si por el contrario, dicho producto ha sido objeto de diversas alteraciones o adulteraciones a lo largo de su proceso de manufactura. No sólo basta con tener métodos de análisis sino que los resultados reportados a partir de éstos deben ser confiables, razón por la cual deben de ser sujetos de un proceso de validación.

Según ISO (International Standards Organization) un método de validación “Es el proceso mediante el cual se establecen las características de desempeño y limitaciones de un método analítico, así como la identificación de las influencias bajo las cuales puede darse un cambio en el desempeño de éste”.<sup>61</sup>

La FDA establece que un “proceso de validación consiste en establecer evidencia documentada, la cual proporciona un alto grado de confianza, de que un proceso específico originará determinado producto con determinadas especificaciones y atributos de calidad.”<sup>61</sup>

La validación es una herramienta que, con el paso del tiempo, ha ganado terreno dentro del área de aseguramiento de calidad. Esta metodología surge como respuesta a la necesidad de probar la seguridad de los productos y prevenir adulteraciones a los mismos y, aunada a las buenas prácticas de manufactura establecidas en 1976 por la FDA, dan como resultado la obtención de un producto cuya calidad cumple con las especificaciones establecidas en la legislación vigente.<sup>23</sup>

El aumento que se ha dado en la aplicación de la validación en diferentes rubros de la industria es debido a la importante inversión que esta metodología representa, ya que por un lado mejora la productividad reduciendo costos de producción al mismo tiempo que asegura la confiabilidad del método o proceso.<sup>24</sup>

La validación fue aplicada en un inicio a los procesos de esterilización y asépticos (1979) y poco a poco fue involucrándose dicha metodología a otras áreas en donde el aseguramiento de la calidad constituía un factor determinante, ya que los científicos cayeron en la cuenta de que la calidad de un producto debe forjarse a lo largo del proceso de producción y no únicamente evaluarse al final del proceso.<sup>23</sup>

En la actualidad se considera que un método analítico debe validarse cuando se requiere verificar si su desempeño es el adecuado para utilizarlo en un problema en específico, como pudiera ser el desarrollo de un nuevo método, para introducir mejoras a un método ya existente, para demostrar la equivalencia entre dos métodos, etcétera.<sup>61</sup>

Del mismo modo, dentro de la legislación ya se plantea la importancia de la validación, tal es el caso de la norma **NMX-EC-17025-IMNC-2000** "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración", en donde se establecen los requisitos que los laboratorios de ensayo y calibración deben cubrir si desean demostrar que operan un sistema de calidad y que son capaces de generar resultados válidos, motivo por el cual el laboratorio debe validar tanto los métodos no normalizados, como los desarrollados o diseñados por él mismo, para con esto confirmar que dichas metodologías se ajustan al uso propuesto.<sup>53</sup>

### 1.5.1 TIPOS DE VALIDACIÓN

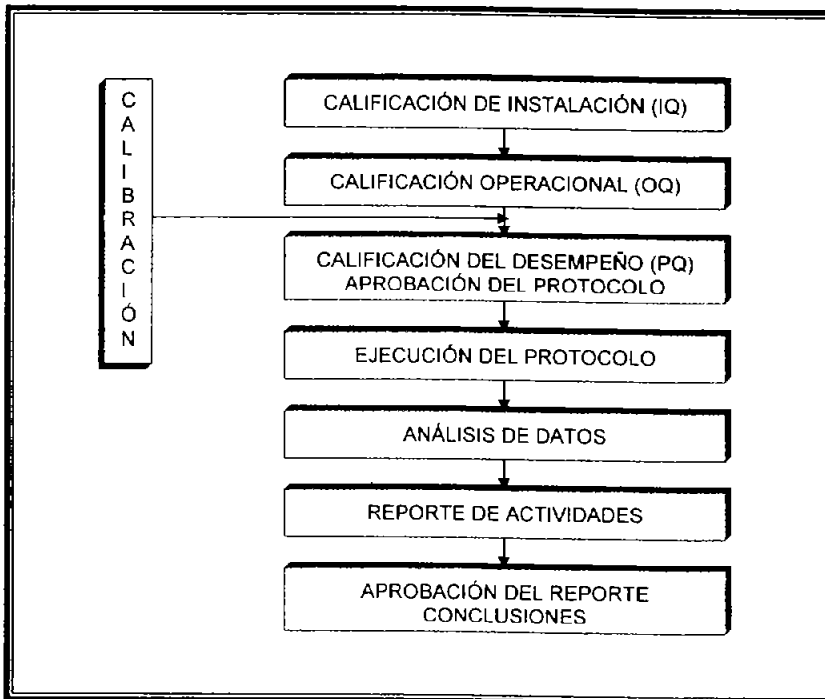
Dependiendo de la fase del proceso de producción en la cual se aplique, existen 3 tipos de validación, los cuales se describen a continuación:

#### 1.5.1.1 VALIDACIÓN PROSPECTIVA

“Es la validación que se lleva a cabo antes de la distribución o entrada de un producto nuevo al mercado o bien, en el caso en que se hayan dado cambios en el proceso de manufactura de un producto, lo cual pudiera haber afectado sus características.”<sup>61</sup>

Este tipo de validación involucra una secuencia de pasos que se muestran en el diagrama 1.<sup>23</sup>

DIAGRAMA 1. VALIDACIÓN PROSPECTIVA



Chapman Kenneth G. A History Of Validation In The United States: Part 1. Pharmaceutical Technology (1991), Vol. 15, No. 10, pág 88

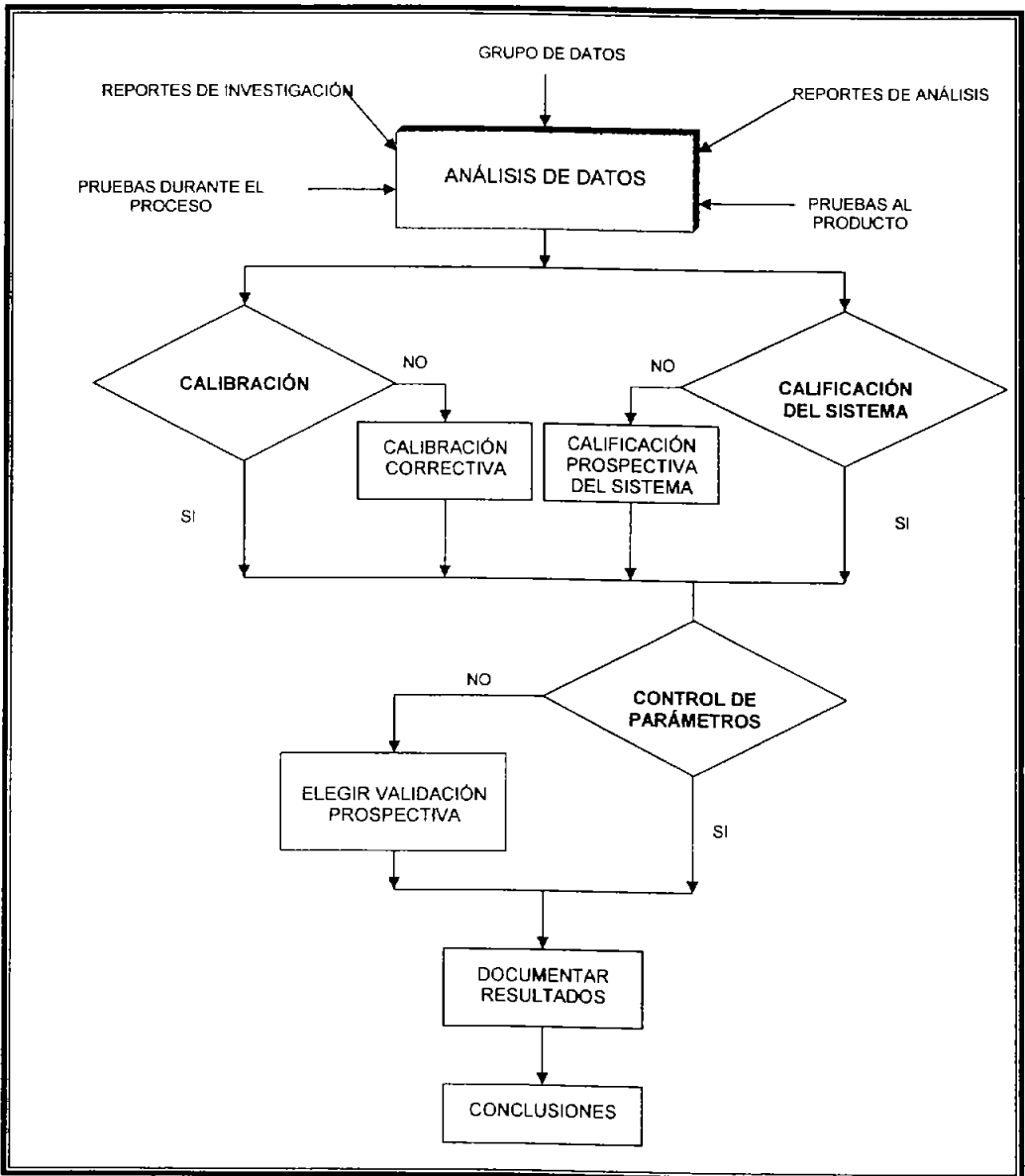
- **CALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN (IQ):** La cual consiste en verificar que los equipos y sistemas fueron instalados de acuerdo a las especificaciones del fabricante.
- **CALIFICACIÓN OPERACIONAL (OQ):** Es la evaluación que se basa en el correcto funcionamiento de los equipos y materiales que se utilizan en un método.
- **CALIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO (PQ):** Se refiere a la evaluación que se hace al proceso en sí, es decir, establece la evidencia de que tanto el proceso como las condiciones de operación y los parámetros establecidos son los adecuados para obtener un producto con las especificaciones de calidad determinadas.<sup>35</sup>

#### 1.5.1.2 VALIDACIÓN RETROSPECTIVA

Consiste en la validación de un proceso para un producto que ya se distribuye, es decir, esta validación establece la evidencia documentada que un proceso cumple con el propósito para el que fue diseñado basada en la revisión y análisis de la información histórica acerca del producto. Esta validación se lleva a cabo con procesos establecidos con anterioridad.<sup>35, 61</sup>

Este tipo de validación involucra una secuencia de pasos que se muestran en el diagrama 2:<sup>23</sup>

DIAGRAMA 2. VALIDACIÓN RETROSPECTIVA



Chapman Kenneth G. A History Of Validation In The United States: Part 1. Pharmaceutical Technology (1991), Vol. 15, No. 10, pág. 92

### 1.5.1.3 VALIDACIÓN CONCURRENTENTE

Es la evidencia documentada de que un proceso cumple con el propósito para el que fue diseñado de acuerdo con la información obtenida durante su implementación.<sup>35</sup>

### 1.5.2 CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Es frecuente ver que al momento de validar un método se aplican a éste todas las pruebas estadísticas que se sugieren en las guías de validación, lo cual podría desencadenar consecuencias tales como, mala toma de decisiones o retraso debido a que se aplican técnicas estadísticas innecesarias. Con el fin de evitar trabajo innecesario y contar con la información adecuada para una toma de decisiones correcta, es importante ajustar el diseño de validación y evaluación de resultados al proceso o método en específico al que va a ser aplicado. Para lograr esto, diversas instituciones como la USP (United States Pharmacopea) y la ICH (The International Conference on the Harmonization of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) han realizado una categorización de los métodos analíticos dependiendo de la aplicación o propósito del mismo.<sup>33</sup>

La USP establece tres categorías para clasificar a los métodos analíticos y sus pruebas estadísticas correspondientes (Tabla 7):<sup>17</sup>

- **CATEGORÍA 1:** Métodos que cuantifican el componente principal o ingrediente activo.
- **CATEGORÍA 2:** Métodos que determinan las impurezas o degradación de productos.
- **CATEGORÍA 3:** Métodos que determinan las características de desempeño.

TABLA 7. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS SEGÚN LA USP

PARÁMETRO DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO	CATEGORÍA 1	CATEGORÍA 2		CATEGORÍA 3
		CUANTIFICACIÓN	PRUEBA LÍMITE	
EXACTITUD	SI	SI	*	*
PRECISIÓN	SI	SI	NO	SI
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	*
LOD	NO	NO	SI	*
LOQ	NO	SI	NO	*
LINEALIDAD	SI	SI	NO	*
INTERVALO	SI	SI	*	*
ROBUSTEZ	SI	SI	SI	SI

\*Podría ser requerido, dependiendo de la naturaleza de la prueba.

LOD = LIMIT OF DETECTION = LÍMITE DE DETECCIÓN

LOQ = LIMIT OF QUANTIFICATION = LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Swartz, Michael. Analytical Method Development And Validation. Marcel Dekker, Inc. (1997). Pág. 69

### 1.5.3 DESARROLLO DEL MÉTODO DE VALIDACIÓN

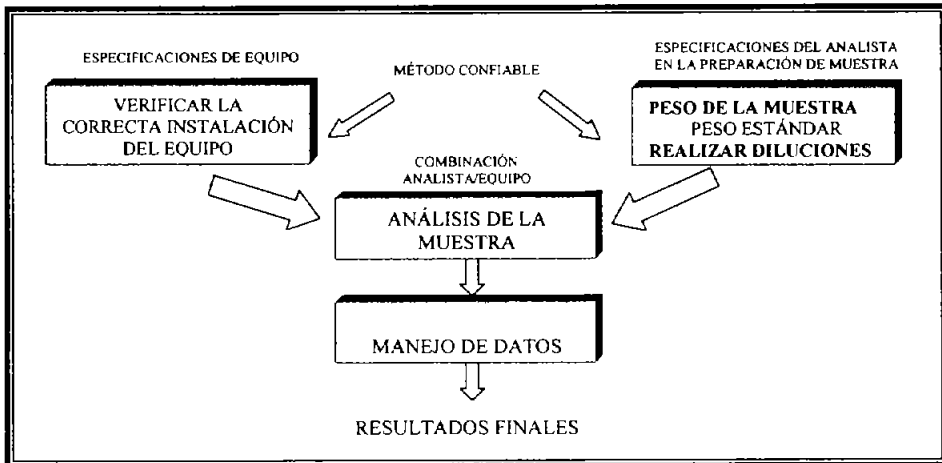
Sin importar de que tipo de validación se trate, el paso inicial consiste en seleccionar el método que se desea validar, considerar sus requerimientos y realizar la elección del tipo de equipo o instrumentación que se va a utilizar. Así mismo, es importante justificar el motivo por el cuál se desea efectuar el desarrollo de un sistema de análisis, lo que puede deberse, entre otras razones, a que los procedimientos existentes presentan poca exactitud, son muy caros o tardados, o bien, a la implementación de nuevos equipos o técnicas, etc. Una vez hecho lo anterior es importante establecer el alcance o propósito del método que va a ser sujeto de validación.<sup>17, 29</sup>

Del mismo modo, el analista debe evaluar o considerar todos los factores que pudieran llegar a afectar a lo largo de la aplicación del método sujeto de validación, para de ésta manera delimitar o especificar, tanto como sea posible, dichos parámetros logrando así un mayor control sobre la técnica, evitando con esto que se llegue a presentar alguna variación, lo cual podría repercutir en el resultado final poniendo en duda la confiabilidad del método. Con respecto a lo anterior, es importante realizar la investigación de la muestra que será utilizada durante la técnica, esto es, definirla en

términos de su composición, características físicas, químicas, entre otras, para así poder establecer el intervalo de valores bajo el cuál debe regirse el procedimiento y para qué tipo de compuestos es aplicable el método que está siendo validado.<sup>17, 35, 61</sup>

Para facilitar la identificación de estos factores, se recomienda dividir el proceso en operaciones, como se muestra en el diagrama 3. La finalidad de esto radica en proporcionar una manera más sencilla de establecer los parámetros, ya que de esta forma es posible examinar cada una de estas operaciones individualmente logrando así reconocer los parámetros de control en cada etapa.<sup>30</sup>

**DIAGRAMA 3. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES CRÍTICOS EN EL PROCESO**



Hokanson, Gerard C. A Life Cycle Approach To The Validation Of Analytical Methods During Pharmaceutical Product Development: PART 2. Pharmaceutical Technology (1994), No. 10, pág. 94

En la etapa de validación, se deben realizar ensayos con el fin de demostrar que el método funciona con muestras del analito establecido obteniendo resultados con alto grado de exactitud y precisión. En las guías de validación se incluyen diversas propuestas para la validación de un método, las cuales pueden aplicarse según el criterio del analista, es decir, no se puede aplicar la misma propuesta para todos los métodos y el criterio del experimentador es de suma importancia al momento de seleccionar la propuesta que pruebe de manera efectiva la correcta validación de un método, ya que de esto depende que la técnica validada sea aceptada por otras



personas relacionadas al campo de estudio que concierne a dicho procedimiento. Las propuestas de validación se enlistan a continuación:<sup>17</sup>

- **MÉTODO DEL CERO OCULTO:** Esta propuesta involucra a un solo analista, el cual utiliza el método con muestras de concentración o nivel conocidos para de ésta forma demostrar la recuperación, exactitud y precisión. Dentro de las ventajas de la aplicación de este método se encuentran que es rápido, sencillo y como una primera aproximación o demostración de la validación eficaz con un mínimo de tiempo, personal y costo, resulta ser una opción viable para iniciar todo el proceso de validación. Como desventajas se encuentra el hecho de que se considera que este método puede ser sujeto de cierta parcialidad por parte del analista, lo cual puede ocasionar cierta duda acerca de la correcta validación por parte del usuario final o por algún crítico.
- **MÉTODO OCULTO SIMPLE:** Esta técnica involucra a dos analistas, uno de los cuales prepara diversas muestras a diferentes niveles o concentraciones desconocidas para el otro investigador. Éste último aplica el método a validar con las muestras desconocidas y una vez que obtiene los resultados los coteja con los reportados por el primer analista. Aunque al inicio ésta técnica es imparcial, dicha característica se pierde al momento de realizar la comparación de los resultados obtenidos por ambos investigadores. No obstante, se considera que ésta propuesta de validación es mucho más confiables que la del cero oculto.
- **MÉTODO OCULTO DOBLE:** Esta propuesta involucra a tres analistas. El primero de ellos realiza la preparación de las muestras a niveles o concentraciones conocidas, el segundo realiza el análisis de las muestras con el método sujeto de validación y el último compara los resultados obtenidos de forma separada por ambos analistas, quienes únicamente tienen acceso a sus datos obtenidos. Se considera que ésta propuesta es la más objetiva.

- **ANÁLISIS DE LOS MATERIALES ESTÁNDAR DE REFERENCIA (SRM):** Esta es la propuesta de validación comúnmente aceptada. Para obtener estos materiales es preciso acudir a instituciones tales como United States Pharmacopeia (USP) y National Institute of Standards and Technology (NIST), entre otras de origen privado, que se dedican a la preparación, garantía y mercadeo de materiales estándar de referencia de diversos analitos. Cuando se hace uso de estos materiales el analista debe demostrar que el método sujeto de validación proporciona mediciones con alto grado de exactitud y precisión.
- **ESTUDIO DE COLABORACIÓN INTERLABORATORIOS:** Esta propuesta es la más ampliamente aceptada para realizar la validación de un método analítico, sin embargo, es un procedimiento costoso y requiere de mucho tiempo, incluso años, para finalizar la validación.
- **COMPARACIÓN CON UN MÉTODO ACTUALMENTE ACEPTADO:** Esta propuesta es generalmente llevada a cabo por un solo analista y consiste en utilizar los resultados de la técnica aceptada para corroborar o comprobar los valores obtenidos con la nueva técnica sujeta de validación.<sup>17</sup>

Una vez que se efectuó el número de repeticiones pertinentes de la técnica que esta siendo validada (por lo menos 20 ensayos), el siguiente paso consiste en dar el tratamiento de datos correspondientes, es decir, se deben aplicar las técnicas estadísticas para evaluar los factores de precisión, exactitud, reproducibilidad, etc. Para realizar lo anterior es necesario en primera instancia categorizar el método que se está validando, para de este modo poder establecer las pruebas que se requieren desarrollar, ya que como se mencionó anteriormente, no es necesario determinar todos los criterios estadísticos que se establecen en las guías de validación.

En la tabla 8 se muestra una síntesis de las técnicas y herramientas estadísticas que se aplican en la validación.<sup>7, 28, 60</sup>

TABLA 8. TÉCNICAS Y HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS APLICADAS EN LA VALIDACIÓN

TÉCNICA DE VALIDACIÓN	DEFINICIÓN	HERRAMIENTA ESTADÍSTICA
SELECTIBILIDAD	Se define como la capacidad de un método para identificar un analito específico aun cuando este se encuentre en presencia de otros componentes.	Prueba de hipótesis
LINEALIDAD	Se define como la habilidad de un método para obtener resultados que sean proporcionales a las concentraciones del analito de interés. La regresión lineal que se obtiene de graficar la respuesta del analito vs. su concentración, aporta ciertos parámetros que son fundamentales para la aceptación de la linealidad, estos valores son el coeficiente de correlación y la intersección con el eje Y.	Regresión y correlación
EXACTITUD	Se define así a la cercanía que existe entre el valor obtenido del método a evaluar y un valor que es considerado como verdadero. Existen cuatro formas de evaluar este parámetro. La primera de ellas consiste en analizar una muestra de concentración conocida con el método sujeto de validación y cotejar los resultados obtenidos con los valores ideales o reales. Una segunda opción es realizar una comparación entre los resultados obtenidos con el nuevo método y aquellos que se recaban a partir de un método alternativo que de antemano se sabe de su exactitud. Las últimas dos opciones se basan en la recuperación de cantidades conocidas del analito dentro de una muestra.	Prueba de hipótesis
INTERVALO	Se define así al grupo de concentraciones dentro del cual se presentan valores aceptables de precisión, exactitud y linealidad. Una forma de obtenerlo es a partir de los valores de linealidad y exactitud.	Prueba de hipótesis
PRECISIÓN	Se denomina así a la dispersión o diferencia que se presenta entre los resultados obtenidos de varios ensayos de una muestra homogénea que se prepara bajo las mismas condiciones.	Coeficiente de variación

REPETIBILIDAD	Es la cercanía que se da entre los resultados obtenidos de mediciones sucesivas realizadas por un mismo operador bajo las mismas condiciones experimentales en un periodo de tiempo corto. Se obtiene a partir de la repetición del método con varias muestras preparadas de la forma en que el método lo señala.	Análisis de varianza
REPRODUCIBILIDAD	Consiste en determinar la precisión que existe entre los diferentes ensayos realizados por diferentes analistas en diferentes días a una misma muestra.	Análisis de varianza
LÍMITE DE DETECCIÓN	Se conoce así a la concentración más baja del analito que es detectable.	Desviación Estándar
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	Es la concentración más baja del analito cuya exactitud y precisión pueden ser determinadas.	Desviación Estándar
ROBUSTEZ	Se define como la habilidad para no mostrar cambio alguno en los resultados al realizar la prueba con pequeños cambios en los parámetros. Es importante mencionar que para evaluar este parámetro es factible realizar uno o varios cambios a la vez.	Análisis de bloques aleatorios

La tabla 8 muestra los parámetros que se cuantifican frecuentemente en la validación, a través de los cuáles se obtienen los datos suficientes para establecer si el método que está siendo validado, en efecto proporciona resultados confiables, así como también para precisar las condiciones bajo las cuáles la técnica proporciona mejores resultados. Así mismo, para cuantificar dichos parámetros se utilizan diversas herramientas estadísticas, tales como prueba de hipótesis, coeficiente de variación, regresión y correlación, análisis de varianza, por citar las más usuales.

Aunado a lo anterior, es importante que se lleve a cabo por escrito un protocolo de validación, en el cual se reúnan los datos obtenidos a partir del método, se reporten las pruebas que se realizan a dichos datos así como sus respectivos resultados.

Una vez realizada la validación es necesario monitorear los cambios posibles que se pudieran llegar a dar con el paso del tiempo, es decir, se requiere inspeccionar frecuentemente el método validado con el fin de detectar cambios de condiciones,

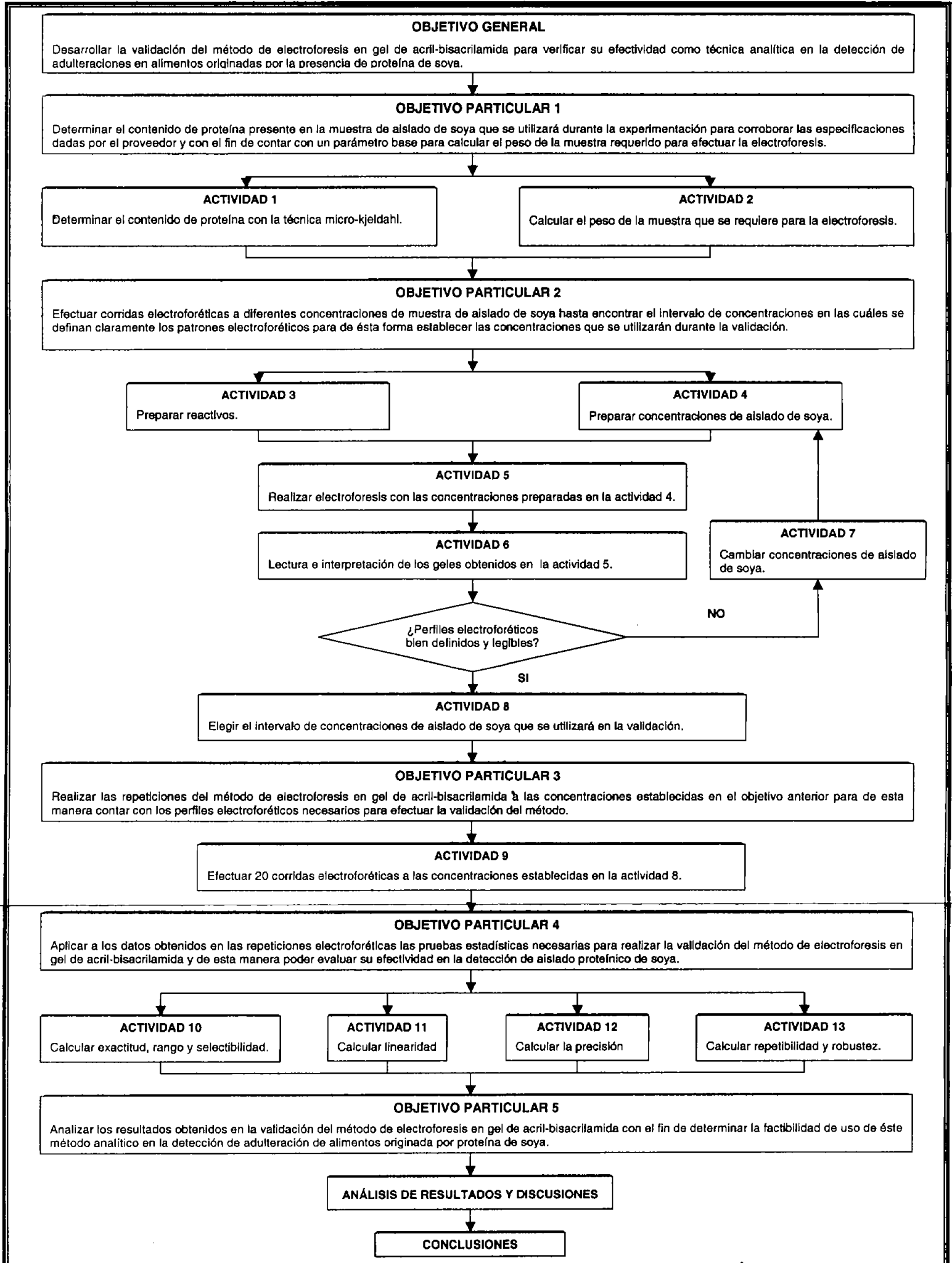
personal, equipo, material, etcétera, los cuales son indicativos de la necesidad de plantear una revalidación de éste.<sup>61</sup>

## 2. DESARROLLO METODOLÓGICO

En éste apartado se explica la metodología que se siguió durante la experimentación, misma que se resume en el diagrama 4.

### 2.1 CUADRO METODOLÓGICO

DIAGRAMA 4. CUADRO METODOLÓGICO



## 2.2 DESCRIPCIÓN DEL CUADRO METODOLÓGICO

En el diagrama 4 se muestra la metodología seguida para la realización del presente estudio, la cual consta de un objetivo general y de cinco objetivos particulares; éstos últimos cuentan con una serie de actividades y en conjunto buscan dar solución al objetivo planteado inicialmente (objetivo general).

El objetivo general consiste en desarrollar la validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida con la finalidad de emplear dicha técnica analítica para la detección de adulteraciones en alimentos producidas por proteína de soya. Para lograr lo anterior se parte, como se menciona en el objetivo particular 1, de la determinación del contenido de proteína presente en la muestra de aislado de soya que será utilizada a lo largo de la experimentación, para lo cual se utiliza el método micro-kjeldahl y la prueba se efectuará por triplicado. Una vez que se sabe el porcentaje de proteína que posee la muestra, este valor se toma como referencia para poder calcular la cantidad de muestra de aislado de soya que se requiere para realizar los ensayos electroforéticos.

El siguiente paso en la metodología corresponde al objetivo particular 2 y consiste en establecer un intervalo de concentraciones de proteína de soya en el cual los perfiles electroforéticos obtenidos estén claramente definidos, ya que dicho intervalo será utilizado para efectuar la validación. Para lograr lo anterior es necesario preparar los reactivos que se emplearán para realizar las corridas electroforéticas y del mismo modo, partiendo de los cálculos realizados en el objetivo particular 1, preparar las concentraciones de aislado de soya con las cuales se efectuará la electroforesis en gel de acril-bisacrilamida. Después de haber obtenido los perfiles electroforéticos, se procede a la determinación de sus correspondientes pesos moleculares, para lo que se requiere digitalizar los geles. Para realizar lo anterior se utilizó la cámara digital Kodak Digital Science DC120 y posteriormente, una vez que se cuenta con las imágenes digitalizadas, la interpretación de éstas se efectúa con el sistema de análisis EDAS 120, que es un software especializado en dicha tarea<sup>62</sup>; en caso de que las bandas electroforéticas no estén bien definidas y no sea posible su interpretación, es necesario replantear nuevas concentraciones de aislado de soya y repetir el ensayo

electroforético y la posterior lectura de los geles obtenidos. Dicho procedimiento se repite hasta encontrar el intervalo de concentraciones de muestra de aislado de soya en las que los perfiles electroforéticos estén bien definidos y legibles.

El objetivo particular 3 tiene como función principal obtener los datos que se requieren para realizar la validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, para lograr lo anterior es necesario efectuar, de acuerdo con la bibliografía, 20 repeticiones de la técnica de electroforesis bajo las mismas condiciones de trabajo para cada una de las concentraciones de aislado de soya establecidas en el objetivo particular 2.<sup>36</sup>

Una vez que se cuenta con los datos necesarios, el objetivo particular 4 busca utilizar dichos valores para efectuar, con ayuda del software MINITAB, las diferentes pruebas estadísticas que se requieren para la validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, tales como la prueba de hipótesis, coeficiente de variación, regresión lineal y correlación y coeficiente de variación, y el análisis de bloques aleatorios para que, con estos resultados se pueda determinar la exactitud, selectibilidad, rango, precisión, linealidad, repetibilidad y robustez del método analítico.

Finalmente, se procede al objetivo particular 5, en el cual se realiza el análisis de los resultados obtenidos en el objetivo particular 4 para con esto determinar que tan factible resulta el empleo de el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida para la detección de proteína de soya.

Después de analizar los resultados se establecen las conclusiones finales del trabajo, las cuáles van orientadas a establecer si el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida resulta ser una técnica efectiva en la detección de adulteraciones en alimentos originadas por la presencia de proteína de soya.



## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1 ESPECIFICACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra que se utilizará a lo largo de la experimentación se trata de un aislado de soya, el cuál fue proporcionado por la empresa "ALIMENTARIA MEXICANA BEKAREM, S.A. DE C.V." y cuyas especificaciones se muestran a continuación.<sup>59</sup>

TABLA 9. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AISLADO DE SOYA

COMPOSICIÓN (%)					
PROTEÍNA	HUMEDAD	CENIZAS	GRASA	FIBRA	pH
91.5 % <sup>*</sup>	5.0 %	3.8 %	0.5 %	0.2 %	6.8

\* = PORCENTAJE OBTENIDO EMPLEANDO UN FACTOR DE 6.25  
Alimentaria Mexicana Bekarem, Ficha Técnica De Proteína Aislado De Soya 590

Durante la experimentación el aislado de soya será sometido, en primera instancia, a una cuantificación de su contenido proteico mediante el método micro-Kjeldahl y de esta manera corroborar el contenido de proteína indicado en la ficha técnica del producto, para posteriormente determinar su perfil electroforético mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y de ésta manera, contar con los elementos necesarios para efectuar la validación de dicho método.

### 2.3.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS CON EL MÉTODO MICRO-KJELDAHL

Como se mencionó anteriormente, la determinación del porcentaje de proteína en la muestra se realizó empleando el método de micro-kjeldahl, el cuál es considerado como la técnica más confiable en lo que a determinación de nitrógeno total se refiere, por lo que se incluye en métodos oficiales y reglamentarios y está aprobada por organizaciones internacionales y así mismo, frecuentemente se utiliza como referencia para evaluar técnicas alternas para la determinación de proteína.<sup>11, 12</sup>

En la tabla 10 se enlistan los reactivos y cantidades de éstos que se requieren para efectuar la técnica micro-kjeldahl para la determinación del contenido de proteína en la muestra de aislado de soya.

**TABLA 10. REACTIVOS UTILIZADOS PARA EL MÉTODO MICRO-KJELDAHL**

REACTIVOS	CANTIDAD
Sulfato de cobre	0.2 g
Sulfato de sodio anhidro	1.5 g
Ácido sulfúrico concentrado	2 ml
Muestra (aislado de soya)	0.1 g
Hidróxido de sodio al 40%	15 ml
Ácido bórico al 4%	50 ml
Mezcla de indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol	3 gotas
Ácido clorhídrico 0.01 N	El necesario para la titulación

Pearson D. Técnicas De Laboratorio Para El Análisis De Alimentos. Ed. Acribia (1998), p. 11

Esta metodología se fundamenta en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos y de otro tipo, tales como el sulfato de cobre y el sulfato de sodio anhidro, que tienen como función reducir el nitrógeno de la muestra hasta amoniaco, el cual queda en solución en forma de sulfato de amonio. El digerido, una vez alcalinizado con hidróxido de sodio al 40%, se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoniaco, mismo que es recolectado en una cantidad estándar de ácido bórico al 4% y finalmente se titula con ácido clorhídrico 0.01 N para obtener así el contenido de nitrógeno total presente en la muestra.<sup>11, 13</sup>

Ésta determinación se realizó por triplicado de acuerdo con lo establecido en la bibliografía, en la cual se recomienda que las mediciones se deben llevar a cabo varias veces (generalmente 3 o más).<sup>1, 16, 20</sup>

### 2.3.3 PERFILES ELECTROFORÉTICOS

Debido a que se utilizará como muestra un aislado proteínico de soya, el perfil electroforético que se busca en cada una de las repeticiones que se efectuarán es el correspondiente al inhibidor de tripsina BOWMAN-BIRK, el cual, por bibliografía, se sabe que es característico de la soya y presenta un peso molecular aproximado de 8 kilodaltones, por lo que la banda de interés en cada gel obtenido será la que se aproxime a dicho valor.

Como se mencionó en el capítulo 1, para determinar el peso molecular de un determinado compuesto, como en este caso, en que lo que se busca es identificar la banda característica de la proteína de soya, es necesario en primera instancia, realizar una comparación entre la muestra problema y una muestra de pesos moleculares conocidos (también conocida como marcador de pesos moleculares) para posteriormente utilizar una curva patrón a partir de la cual se pueda obtener, mediante una interpolación, los pesos moleculares de la muestra problema, dicha curva se construye a partir de los valores proporcionados por el marcador de pesos moleculares.

En el presente trabajo se utilizó un marcador de pesos moleculares de marca BioRad, cuyo intervalo de pesos moleculares que presenta resulta útil para efectuar la identificación de la banda de interés.

En las siguientes secciones se describe el procedimiento a seguir para efectuar la técnica SDS-PAGE.

#### 2.3.3.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

La electroforesis en gel de poliacrilamida requiere de ciertos reactivos, cuya preparación se describe a continuación:<sup>19, 63</sup>

➤ **Solución amortiguadora 4x pH = 8.8**

**TABLA 11. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA pH= 8.8**

REACTIVO	CANTIDAD
Tris-OH	9.083 g (1.5 M)
SDS 20%	1.0 ml
Agua desionizada	*Cbp. 50 ml

\*Cbp. = Cuanto baste para.

La tabla 11 muestra los compuestos necesarios para preparar 50 ml de esta solución amortiguadora. Para preparar 5 ml de SDS al 20 % se debe pesar 1g de SDS y se disuelve con 4 ml de agua desionizada, dicha mezcla se adiciona a un matraz volumétrico de 50 ml y posteriormente se agrega agua desionizada hasta el aforo.

Para preparar esta solución amortiguadora se pesa el Tris-OH, el cual va a ser disuelto en 40 ml de agua desionizada, una vez concluido lo anterior, se toma 1 ml. del SDS al 20% y se mezcla con el Tris-OH, se ajusta el pH a 8.8 y finalmente dicha mezcla se vierte en un matraz volumétrico de 50 ml y se adiciona agua desionizada hasta aforar. Conservar a una temperatura de 4°C (durante 30 días como máximo).<sup>19, 63</sup>

➤ **Solución amortiguadora 4x pH = 6.8**

**TABLA 12. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA pH= 6.8**

REACTIVO	CANTIDAD
Tris-OH	3.028 g (0.5 M)
SDS 20%	1.0 ml
Agua desionizada	*Cbp. 50 ml

\*Cbp. = Cuanto baste para.

La tabla 12 muestra los compuestos necesarios para preparar 50 ml de ésta solución amortiguadora. El procedimiento para conformar este reactivo es el mismo que el que se siguió en la solución amortiguadora anterior, excepto que, el pH en esta ocasión se ajusta a 6.8. Conservar a una temperatura de 4°C (durante 30 días como máximo).<sup>19, 63</sup>

➤ **Solución amortiguadora de corrida 10x**

**TABLA 13. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CORRIDA 10x**

REACTIVO	CANTIDAD
Glicina	36 g
Tris-OH	7.5 g
SDS	2.5 g
Agua desionizada	Cbp. 250 ml

\*Cbp. = Cuanto baste para.

En primera instancia es necesario preparar la solución de corrida madre (1x), (cuyos reactivos se muestran en la tabla 13) para que, a partir de ésta, se pueda obtener la solución 10x.

La preparación comienza pesando la glicina, el tris-OH y el SDS para posteriormente disolver dichos compuestos poco a poco en 240 ml de agua desionizada. Una vez hecho lo anterior se ajusta el pH de la solución a 8.3 y se procede a aforar a 250 ml con agua desionizada, obteniendo así la solución 1x, de la cual se van a tomar 50 ml y se adicionarán a un matraz volumétrico de 500 ml, mismo que se afora con agua desionizada formando así la solución de corrida 10x. Conservar a una temperatura de 4°C (durante 30 días como máximo) en un frasco ámbar.<sup>19, 63</sup>

➤ **Acril-bisacrilamida 30%**

**TABLA 14. FORMULACIÓN DE LA ACRIL-BISACRILAMIDA 30%**

REACTIVO	CANTIDAD
Archilamida	60 g
Bisacrilamida	1.74 g
Agua desionizada	Cbp. 200 ml

\*Cbp. = Cuanto baste para.

La tabla 14 muestra los reactivos necesarios para obtener acril-bisacrilamida 30%. El procedimiento a seguir para esto consiste en pesar las cantidades indicadas en la tabla de la acrilamida y la bisacrilamida y diluir ambos compuestos con 190 ml de agua desionizada, para finalmente verter la solución en un matraz volumétrico de 200 ml y de nueva cuenta con agua desionizada llevar al aforo. Conservar a una temperatura de 4°C (durante 30 días como máximo) en un frasco ámbar.<sup>19, 63</sup>

➤ **Persulfato de amonio**

**TABLA 15. FORMULACIÓN DEL PERSULFATO DE AMONIO**

REACTIVO	CANTIDAD
Persulfato de amonio	1.25 g
Agua desionizada	Cbp. 10 ml

\*Cbp. = Cuanto baste para.

En la tabla 15 se enlistan los compuestos requeridos para obtener la solución de persulfato de amonio. En primera instancia es importante mencionar que este componente, debido a su propiedad higroscópica, debe someterse a un secado durante 3 horas a una temperatura de 40°C. Una vez realizado lo anterior, se pesa la cantidad indicada de persulfato de amonio y se disuelve en 8 ml de agua desionizada, finalmente se adiciona esta solución a un matraz volumétrico de 10

ml y se afora con agua desionizada. Conservar a una temperatura de 4°C en un frasco ámbar.<sup>19, 63</sup>

➤ **TEMED**

**TABLA 16. FORMULACIÓN DEL TEMED AL 8.4%**

REACTIVO	CANTIDAD
TEMED	0.42 ml
Agua desionizada	Cbp. 5 ml

\*Cbp. = Cuanto basta para.

En la tabla 16 se muestra la cantidad de TEMED que se requiere, misma que se disuelve en 4 ml de agua desionizada para finalmente llevar esta solución al afore con agua desionizada en un matraz de 5 ml. Conservar a una temperatura de 4°C en un frasco ámbar.<sup>19, 63</sup>

➤ **Solución amortiguadora de muestra**

**TABLA 17. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA**

REACTIVO	CANTIDAD
Solución amortiguadora de muestra	950 µl
Mercaptoetanol	50 µl

Para este reactivo es necesario mezclar los volúmenes mencionados en la tabla 17 de la solución de muestra y el mercaptoetanol. Conservar en un frasco ámbar a una temperatura de congelación.<sup>19, 63</sup>

➤ **Solución teñidora**

**TABLA 18. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN TEÑIDORA**

REACTIVO	CANTIDAD
Azúl de Coomassie R-250	0.25 g
Ácido acético glacial	10 ml
Metanol	50 ml
Agua destilada	Cbp. 100 ml

\*Cbp. = Cuanto baste para.

En la tabla 18 se enlistan los reactivos requeridos para la solución teñidora. El procedimiento consiste en pesar la cantidad marcada de azul de Coomassie y mezclarla con los volúmenes mencionados de ácido acético y metanol, finalmente se lleva al aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 ml. Conservarlo en un frasco ámbar a temperatura ambiente.<sup>19, 63</sup>

➤ **Solución desteñidora**

**TABLA 19. FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN DESTENIDORA**

REACTIVO	CANTIDAD
Metanol	250 ml
Agua destilada	200 ml
Ácido acético	50 ml

La tabla 19 muestra los volúmenes de metanol y ácido acético que se requieren para la solución desteñidora, los cuáles deben mezclarse y vertirse en un matraz volumétrico de 500 ml para finalmente adicionar el agua destilada que se requiera para llegar al aforo. Conservarlo en un frasco ámbar a temperatura ambiente.<sup>19, 63</sup>



### 2.3.3.2 MANEJO DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS

Una vez que se cuenta con los reactivos necesarios para desarrollar la técnica, el paso siguiente consiste en la preparación de los geles (la cuál se describe en la sección 2.3.3.3) y su respectivo montaje en la cámara de electroforesis, cuyo funcionamiento se detalla en el apéndice A.<sup>63</sup>

### 2.3.3.3 FORMULACIÓN DE LOS GELES DE ACRIL-BISACRILAMIDA

Como se mencionó en la sección de antecedentes, para lograr una mejor separación y visualización de las bandas electroforéticas, en la fase experimental se correrán las muestras en geles de poliacrilamida al 12%. Es importante mencionar que la preparación de ambos geles (separador y concentrador) se debe llevar a cabo en una superficie fría, esto con el fin de retardar el proceso de polimerización y la subsecuente gelificación. La formulación de estos geles es la siguiente:<sup>19, 63</sup>

#### ➤ Gel Separador

TABLA 20. FORMULACIÓN DEL GEL SEPARADOR

REACTIVO	CANTIDAD
Solución amortiguadora pH=8.8	2500 $\mu$ l
Acril-bisacrilamida	3755 $\mu$ l
Agua desionizada	3745 $\mu$ l
TEMED	100 $\mu$ l
Persulfato de amonio	200 $\mu$ l

La tabla 20 muestra los reactivos y cantidades de éstos que se emplean para obtener el gel separador.

En un vaso de precipitado de 50 ml se adicionan las cantidades señaladas anteriormente de los reactivos, en el estricto orden en que se enlistan,

obteniendo así una solución que debe vertirse entre los cristales de la cámara de electroforesis, donde finalmente se llevará a cabo la gelificación de ésta.<sup>19, 63</sup>

### ➤ Gel Concentrador

TABLA 21. FORMULACIÓN DEL GEL CONCENTRADOR

REACTIVO	CANTIDAD
Solución amortiguadora pH=6.8	1500 µl
Acril-bisacrilamida	1000 µl
Agua desionizada	3500 µl
TEMED	40 µl
Persulfato de amonio	80 µl

En la tabla 21 se muestran los reactivos que se utilizan para obtener el gel concentrador, cuyo procedimiento es el mismo que el del gel separador.<sup>19, 63</sup>

#### 2.3.3.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez que se cuenta con los geles dentro de la cámara de electroforesis, se lleva a cabo la preparación de la muestra del aislado de soya, cuyo procedimiento se describe a continuación:

En los tubos Eppendorf se colocan 15 µl de la dilución que conforma la muestra de aislado de soya y 15 µl de la solución amortiguadora de muestra, cuya preparación se describió en el apartado anterior. Este procedimiento se repite para cada una de las muestras que van a ser analizadas en la validación, cuyas concentraciones son 0.5, 1, 2 y 3 µg de aislado de soya / µl. Posteriormente, dichas muestras se someten al calor a temperatura de ebullición en baño maría durante 4 minutos exactos. Transcurrido este tiempo se toman 15 µl de la muestra y se colocan en los carriles del gel con una micropipeta automática.

Finalmente se cierra la cámara de electroforesis de la manera en que se describe en el anexo 1 y para de esta forma realizar la corrida aplicando una corriente constante de 120 volts durante 1.5 hrs.

Una vez transcurrido este tiempo, los geles se extraen de los cristales y se realiza el revelado de las bandas electroforéticas, lo cual se logra al someter los geles a un proceso de tinción durante 12 hrs. con una solución de azul de Coomassie, y posteriormente, con la solución desteñidora, se realiza la decoloración del gel.

### **2.3.3.5 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMA Y MÁXIMA**

Para establecer las concentraciones mínima y máxima con las cuales se trabajará para realizar la validación, fue necesario en primera instancia ratificar el contenido de proteína de la muestra reportado por el proveedor (91.5%), lo cual se llevó a cabo mediante el método micro-Kjeldahl. Dichos cálculos se describen con más detalle en la sección de resultados.

Una vez que se contó con este valor y sabiendo que la técnica de tinción que se empleará en la electroforesis será la de azul de Coomassie, la cuál, de acuerdo con la bibliografía, requiere de 2-10 $\mu$ g de muestra por banda<sup>6</sup>, se efectuaron los cálculos para establecer las concentraciones bajo las cuáles se trabajó y finalmente se realizó una corrida de ensayo con dichas concentraciones, esto con el fin de corroborar si la banda de interés se aprecia claramente. En caso contrario, se replantearon los cálculos, solo que esta vez con otras concentraciones de muestra y se volvió a efectuar la electroforesis a estas nuevas concentraciones. Este ciclo se aplicó a un total de 21 concentraciones de aislado de proteína de soya diferentes, hasta encontrar el intervalo de concentraciones bajo las cuales se logró la identificación de la banda correspondiente a la soya.

Después de que se realizaron los ensayos electroforéticos necesarios para establecer las concentraciones de proteína con las cuáles se decidió trabajar para efectuar la

validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, se procedió a la repetición de los perfiles electroforéticos para de esta forma contar con datos suficientes para aplicar las pruebas estadísticas que se requieren en la validación. Al respecto, se corrieron un total de 20 geles, cada uno de éstos conformado por 8 carriles en los que se colocan las distintas concentraciones de muestra de aislado de soya establecidas previamente.

La secuencia de cálculo y procedimiento que se realizó para preparar las diluciones correspondientes a las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  se desglosa a continuación:

1.- Pesar 1.2 g de aislado de soya y disolverlo en 50 ml de agua desionizada, para obtener una solución de proteína de soya de 0.02 g / ml, la cual es la dilución 1.

$$\frac{1.2 \text{ g}}{50 \text{ ml}} = \frac{0.02 \text{ g}}{\text{ml}} \dots\dots\dots(1)$$

2.- Tomar 0.25 ml de la dilución 1, lo que equivale a 0.005 g / ml, y disolver en 10 ml de agua desionizada, obteniendo así la primer muestra a una concentración de 0.5  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

$$\begin{aligned} 1 \text{ ml de dilución (1)} & \text{-----} 0.02 \text{ g de proteína} \\ 0.25 \text{ ml de dilución (1)} & \text{-----} X \\ X & = 0.005 \text{ g de proteína} \end{aligned}$$

$$\frac{0.005 \text{ g}}{10 \mu\text{l}} = \left( \frac{0.0005 \text{ g}}{\text{ml}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \left( \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) \left( \frac{1 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \right) = \frac{0.5 \mu\text{g}}{\mu\text{l}}$$

3.- Tomar 0.5 ml de la dilución 1, lo que equivale a 0.01 g / ml, y disolver en 10 ml de agua desionizada, obteniendo así la segunda muestra a una concentración de 1  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

1 ml de dilución (1) -----0.02 g de proteína

0.5 ml de dilución (1) ----- X

X = 0.01 g de proteína

$$\frac{0.01 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = \left( \frac{0.001 \text{ g}}{\text{ml}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \left( \frac{1000 \text{ } \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) \left( \frac{1 \text{ ml}}{1000 \text{ } \mu\text{l}} \right) = 1 \text{ } \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

4.- Tomar 1 ml de la dilución 1, lo que equivale a 0.02 g/ ml, y disolver en 10 ml de agua desionizada, obteniendo así la tercera muestra a una concentración de 2  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

1 ml de dilución (1) -----0.02 g de proteína

$$\frac{0.02 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = \left( \frac{0.002 \text{ g}}{\text{ml}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \left( \frac{1000 \text{ } \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) \left( \frac{1 \text{ ml}}{1000 \text{ } \mu\text{l}} \right) = 2 \text{ } \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

5.- Tomar 1.5 ml de la dilución 1, lo que equivale a 0.03 g/ ml, y disolver en 10 ml de agua desionizada, obteniendo así la cuarta muestra a una concentración de 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

1 ml de dilución (1) -----0.02 g de proteína

1.5 ml de dilución (1) ----- X

X = 0.03 g de proteína

$$\frac{0.03 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = \left( \frac{0.003 \text{ g}}{\text{ml}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \left( \frac{1000 \text{ } \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) \left( \frac{1 \text{ ml}}{1000 \text{ } \mu\text{l}} \right) = 3 \text{ } \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 PROTEÍNA

Como se mencionó en el capítulo anterior, la fase experimental inició con la determinación del porcentaje de proteína contenido en la muestra de aislado de soya a partir de la técnica micro-kjeldahl, la cuál se realizó por triplicado y cuyos resultados obtenidos se muestran a continuación (tabla 22):

TABLA 22. CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LA MUESTRA

MUESTRA	PROTEÍNA (%)*	$\bar{X}$	S	C.V.
1	91.38 %	91.08 %	0.254	0.27 %
2	90.94 %			
3	90.94 %			

\* = UTILIZANDO FACTOR DE CONVERSIÓN DE 6.25

$\bar{X}$  = VALOR DE LA MEDIA

S = VALOR DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR

C.V. = VALOR DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN

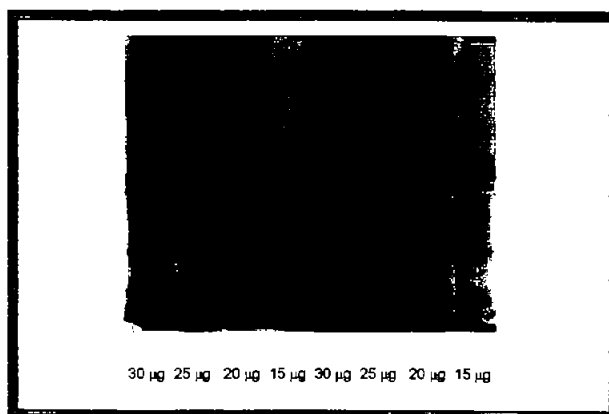
En los resultados del contenido de proteína, que se obtuvieron con el método micro-kjeldahl y que se muestran en la tabla 22, se observa que, de acuerdo con la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación reportado (C.V.), la dispersión que se presenta entre dichos resultados es mínima, lo cual indica que existe repetibilidad entre éstos. Del mismo modo, se encuentra cierta concordancia entre el valor promedio ( $\bar{X}$ ) y el que se reporta en la ficha técnica de la muestra de soya que está siendo analizada, la cual indica un contenido de 91.5% de proteína. Dicha similitud muestra que, de acuerdo con lo reportado en la sección de antecedentes (página 12), en donde se establece que un aislado de proteína de soya debe contener un mínimo de 90% de fracción protéica<sup>5</sup>, la muestra estudiada cumple con este parámetro, por lo cual, se considera como un aislado proteico.

### 3.2 GELES DE ACRIL-BISACRILAMIDA

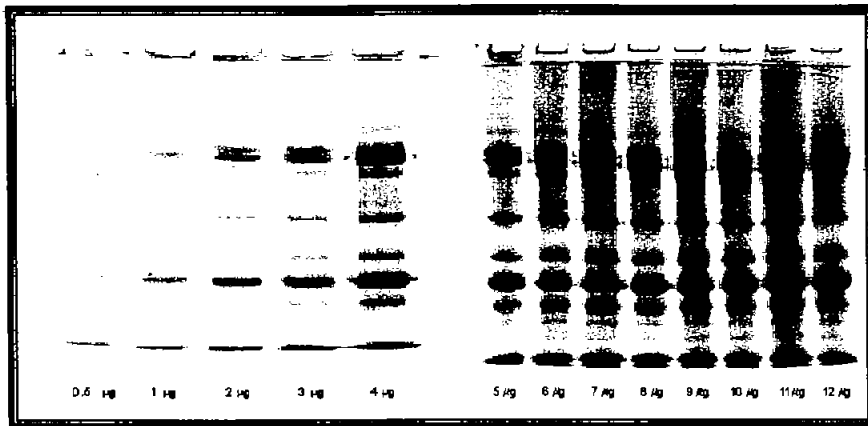
El conocer el contenido proteico de la muestra resulta un parámetro importante, ya que a partir de éste es posible establecer las concentraciones que se utilizarán a lo largo de la electroforesis, para lo cuál se requiere realizar ensayos electroforéticos previos, cuya finalidad radica en hallar las concentraciones de aislado de proteína de soya mínima y máxima bajo las cuales se aprecia bien el bandeo correspondiente. Lo anterior se obtuvo mediante la realización de corridas electroforéticas a 21 diferentes concentraciones, hasta encontrar aquellas en las que la banda de interés (inhibidor de tripsina = 8Kda) se apreció claramente.

A continuación se muestra uno de los geles obtenidos de los ensayos efectuados para las concentraciones de 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ . (Fig. 2).

Fig. 2 Ensayos iniciales para establecer las concentraciones

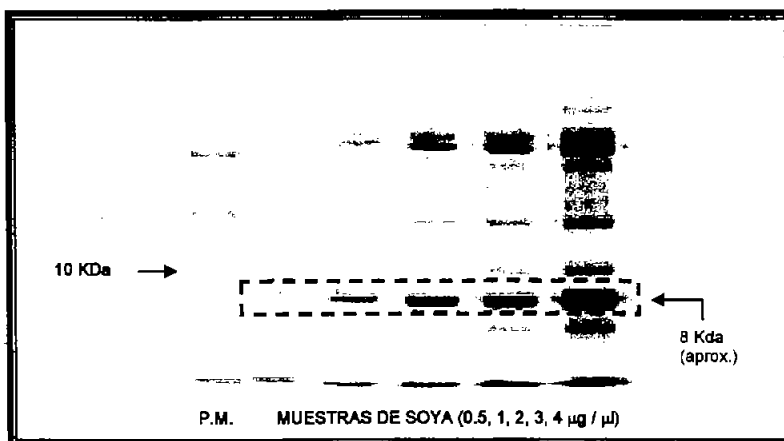


En la imagen anterior se muestra uno de los primeros ensayos realizados a algunas concentraciones propuestas, las cuáles no son las adecuadas, debido a que no se logra apreciar la banda de interés y esto es debido a que en las muestras existe un exceso de proteína, por lo que fue necesario ir disminuyendo las concentraciones de experimentación, hasta que finalmente se efectuó un ensayo con las concentraciones de 0.5 a 4  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  y de 5 a 12  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ . Los geles obtenidos se muestran a continuación (Figs. 3 y 4).

Figs. 3 y 4 Ensayos con las concentraciones de 0.5 a 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y de 5 a 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 

Como se observa en las figuras anteriores, los perfiles electroforéticos que se obtuvieron a las concentraciones mencionadas son claramente perceptibles, con lo cual ya es posible reconocer la banda de interés para el presente trabajo, misma que corresponde al inhibidor de tripsina, cuyo peso molecular aproximado es de 8 kilodaltones y que se identificó a partir de la comparación que se realizó entre los perfiles obtenidos de la soya con los pertenecientes al marcador de pesos moleculares (Fig. 5).

Fig. 5 Análisis electroforético para la identificación de la banda de interés



P.M. = PERFIL CORRESPONDIENTE AL MARCADOR DE PESOS MOLECULARES

BANDA DE INTERÉS (INHIBIDOR DE TRIPSINA = 8 Kda)

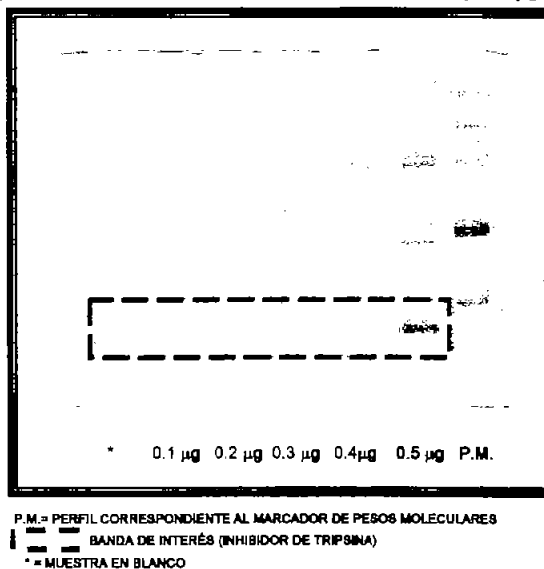


En la figura anterior se muestra la comparación realizada entre los perfiles electroforéticos de la soya y el marcador de pesos moleculares, identificando así la banda correspondiente al inhibidor de tripsina a las diferentes concentraciones, la cual se localiza dentro del marco punteado.

Es importante mencionar que aún cuando en los geles de las figuras 4 y 5 se visualiza la banda de importancia, dicho perfil es más claro en la primera imagen.

Así mismo, con el fin de ratificar la concentración mínima a la cual la banda de interés se visualiza, se efectuaron otros ensayos electroforéticos en los que se emplearon concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  y un carril más en los que sólo se colocó la solución amortiguadora de muestra (muestra en blanco). En la siguiente figura (fig. 6) se muestran los bandeos obtenidos a estas concentraciones.

Fig. 6 Ensayos con las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  y el blanco



Como se observa en la figura anterior, la banda del inhibidor de tripsina sólo es visible a la concentración de 0.5  $\mu\text{g}$  de aislado de soya /  $\mu\text{l}$ , ya que en los demás carriles se

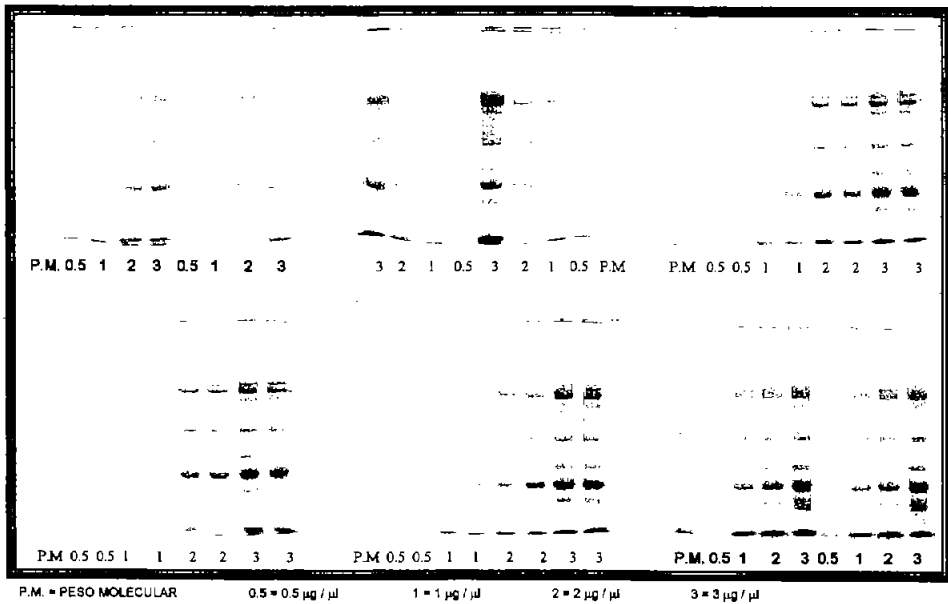
muestran bandeos que no corresponden al que es de nuestro interés y cuya definición es deficiente.

Por lo anterior, se estableció que, debido a la mayor nitidez que presentaron en las bandas electroforéticas, se emplearán las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g}$  de proteína de soya /  $\mu\text{l}$  al efectuar las corridas para la validación del método de electroforesis en gel de poliacrilamida. Al respecto es importante mencionar que no se seleccionaron concentraciones intermedias debido a que no se percibió diferencia alguna en la claridad y coloración de las bandas electroforéticas correspondientes a éstas concentraciones intermedias con respecto a la banda obtenida de la concentración inmediata inferior o superior; no ocurriendo lo mismo con el bandeo resultante a las concentraciones 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$ , ya que en éstos si se aprecian ciertas diferencias en la intensidad de coloración entre una concentración y otra.

Como ya se mencionó, una vez que se contó con las concentraciones de soya adecuadas, se realizaron 20 repeticiones del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida para con esto contar con datos suficientes para efectuar la validación.

Las siguientes figuras corresponden a algunos de los geles obtenidos a lo largo de las repeticiones (figs. 7 a 12).

Figs. 7 a 12. Geles obtenidos en las repeticiones



En las figuras anteriores se muestran algunos de los geles obtenidos durante las corridas electroforéticas realizadas a las concentraciones de aislado de proteína de soya de 0.5, 1, 2, 3 µg / µl. Como se puede observar, la clara definición de las bandas electroforéticas a las diferentes concentraciones que se manejaron es constante en cada uno de los geles, lo cuál resulta positivo, toda vez que esto hace posible la correcta interpretación de los geles, ya que de lo contrario, el programa que se utiliza para la obtención de los pesos moleculares podría proporcionar resultados erróneos.

Por otro lado, se presenta una diferencia en cuanto a la intensidad de coloración de las bandas de aislado de soya a las diferentes concentraciones manejadas. Como se observa, existe una relación entre la concentración de soya y la coloración presente en la banda electroforética, es decir, el bandeado correspondiente a una concentración de 0.5 µg / µl presenta una menor intensidad en la coloración que el de la concentración de 1 µg / µl, y así continúa gradualmente hasta la concentración de 3 µg de proteína de soya / µl. Es importante mencionar que al igual que la definición, la intensidad en la coloración es un factor importante durante la interpretación de los geles, ya que de

haber un exceso o bien, una falta de pigmentación en las bandas electroforéticas que están siendo analizadas, puede traer como consecuencia una lectura de pesos moleculares equivocada. Tomando en cuenta lo anterior, se decidió que las bandas que presentan una mejor definición y coloración son las que corresponden a las concentraciones de aislado de proteína de soya de 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ , ya que a las concentraciones de 0.5 y 1  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ , la banda de interés apenas fue perceptible, por lo que podrían presentarse problemas durante la interpretación de ésta debido a la baja coloración que presentó.

Después de haber realizado las repeticiones antes mencionadas (20), en las que se corrió paralelamente con la muestras de soya un marcador de pesos moleculares Standard comercial, se llevó a cabo la lectura de los pesos moleculares para cada gel obtenido, para lo cual fue necesario en primera instancia digitalizarlos y posteriormente efectuar la interpretación de las bandas electroforéticas mediante el uso de un software especializado (Kodak Digital Science EDAS 120), el cuál estructura una curva patrón a partir de los valores reportados para el marcador de pesos moleculares empleado en la experimentación. Dicha curva es empleada por el mismo programa para extrapolar las bandas electroforéticas de la muestra problema consiguiendo así el registro de sus respectivos pesos moleculares.<sup>62</sup>

En la siguiente tabla (tabla 23) se muestran los pesos moleculares que corresponden a la banda de interés (inhibidor de tripsina), de cada uno de los geles obtenidos y a las distintas concentraciones que se manejaron (0.5, 1, 2, 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ).

TABLA 23. PESOS MOLECULARES DE LA BANDA DE INHIBIDOR DE TRIPSINA

PESOS MOLECULARES (Kda) A DIFERENTES CONCENTRACIONES			
0.5 µg / µl	1 µg / µl	2 µg / µl	3 µg / µl
8.012	8.011	8.011	8.010
8.000	8.000	8.000	8.000
7.976	7.977	7.979	7.979
7.973	7.973	7.973	7.972
7.984	7.983	7.984	7.983
8.053	8.052	8.053	8.053
8.043	8.045	8.044	8.046
7.793	7.793	7.792	7.792
8.000	8.000	8.000	8.001
7.975	7.976	7.976	7.976
8.019	8.018	8.018	8.018
7.961	7.960	7.961	7.961
8.019	8.018	8.018	8.018
7.960	7.959	7.958	7.958
7.957	7.957	7.957	7.957
7.928	7.929	7.929	7.930
7.956	7.956	7.957	7.957
8.000	7.999	7.999	8.000
8.133	8.133	8.133	8.133
8.000	8.001	8.000	8.000
8.000	7.999	8.000	8.000
8.059	8.058	8.058	8.058
7.879	7.878	7.877	7.877
7.984	7.983	7.983	7.984
8.000	7.998	7.998	7.999
8.000	7.999	7.999	8.000
8.003	8.002	8.001	8.001
8.012	8.012	8.012	8.012
7.994	7.994	7.993	7.992
7.975	7.974	7.973	7.973
8.012	8.010	8.010	8.012
8.000	7.998	8.000	8.000
7.975	7.975	7.976	7.977
7.997	7.998	7.998	7.998
8.051	8.051	8.052	8.052
7.993	7.993	7.993	7.992
8.000	8.001	8.002	8.002
8.120	8.118	8.117	8.119
7.996	7.997	7.997	7.997
8.029	8.030	8.030	8.031
x = 7.99552 S = 0.05487	x = 7.99520 S = 0.05476	x = 7.99528 S = 0.05485	x = 7.99550 S = 0.05502

### 3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRIL-BISACRILAMIDA

Una vez que se tuvieron los pesos moleculares correspondientes al inhibidor de tripsina presente en las muestras, con ayuda del software estadístico MINITAB, se aplicaron a dichos valores las pruebas estadísticas requeridas para evaluar cada uno de los parámetros que se determinan en la validación del método de electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual se considera un método analítico de categoría 1. Éstos parámetros y las pruebas estadísticas correspondientes se enlistan a continuación:

- **Exactitud, intervalo y selectibilidad:** Para determinar estos factores se emplea la prueba de hipótesis.
- **Linearidad:** Se obtiene al calcular la regresión lineal y correlación de los valores obtenidos en las repeticiones.
- **Precisión:** Este elemento se evalúa a través del coeficiente de variación.
- **Repetibilidad y robustez:** El análisis de varianza (ANOVA) es la herramienta estadística que se emplea para establecer estos parámetros.

#### 3.3.1 EXACTITUD, INTERVALO Y SELECTIBILIDAD

Esta herramienta estadística tiene como finalidad comprobar alguna de las afirmaciones que se hacen acerca de una propiedad de un conjunto de datos, para lo cual se requiere en primera instancia establecer dichas aseveraciones, las cuáles se conocen como hipótesis nula ( $H_0$ ) e hipótesis alternativa ( $H_1$ ).<sup>18, 45, 46</sup>

De acuerdo con el objetivo experimental planteado, se establecen como hipótesis lo siguiente:

$$H_0: \mu = 8 \text{ Kda}$$

$$H_1: \mu \neq 8 \text{ Kda}$$

Considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  se obtienen los resultados que se muestran en la tabla 24.

TABLA 24. RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDIENTES A LA PRUEBA DE HIPÓTESIS

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA	MEDIA (X)	DESV. STD. (S)	INT. DE CONFIANZA (95%)	PUNTAJE Z	VALOR P
0.5	7.99552	0.05487	7.9785-8.0125	- 0.52	0.606
1.0	7.99520	0.05476	7.9782-8.0121	- 0.55	0.580
2.0	7.99528	0.05485	7.9782-8.0122	- 0.54	0.586
3.0	7.99550	0.05502	7.9784-8.0125	- 0.52	0.605

La tabla 24 muestra los valores correspondientes a la media, desviación estándar, intervalo de confianza, puntaje Z y valor P para las distintas concentraciones de muestra de aislado de soya utilizadas en la experimentación.

Como se observa, los valores promedio o medias obtenidas en las diferentes concentraciones no presentan una diferencia significativa entre sí y, al mismo tiempo, cada uno de éstos valores se encuentra cercano al valor promedio planteado en la hipótesis nula ( $H_0: \mu = 8 \text{ Kda}$ ).

Por otro lado, los valores de desviación estándar obtenidos en cada concentración, indican que la variación existente entre los pesos moleculares reportados y la media obtenida es prácticamente nulo.

El intervalo de confianza con un grado de significancia de  $\alpha=0.05$ , indica que existe una confianza del 95% de que los límites dados por el intervalo de datos correspondientes a los pesos moleculares obtenidos en las distintas concentraciones estudiadas, contienen el valor de la media.

Por otro lado, existen diversas técnicas para realizar la prueba de hipótesis, algunas de éstas son el método tradicional y el que se basa en el valor de P. El primer método consiste en utilizar el valor o puntaje Z como dato estadístico de prueba, mismo que se compara con una región crítica, la cual se calcula con base en el nivel de significancia;

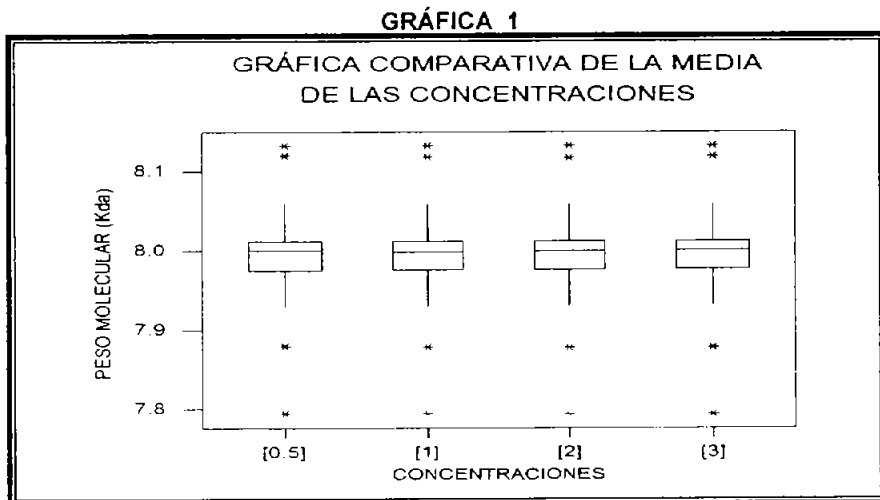
si Z está dentro de la zona crítica se rechaza la hipótesis nula, pero si Z no está en esta zona, la hipótesis nula se acepta.<sup>18</sup>

El segundo método es el que se empleó en este trabajo y consiste en calcular e interpretar el valor de P, el cual mide la confianza para rechazar o aceptar la hipótesis nula de acuerdo al siguiente parámetro:<sup>18</sup>

- Rechazar la hipótesis nula: Si el valor P es menor que el nivel de significancia  $\alpha$ , o igual a él.
- Se acepta la hipótesis nula: Si el valor P es mayor que el nivel de significancia  $\alpha$ .

Dado que el valor de P obtenido a las distintas concentraciones es mayor que el nivel de significancia de 0.05 utilizado, se acepta la hipótesis nula, con lo cual se establece que hay suficientes indicios para apoyar la afirmación que el peso molecular obtenido con el método de electroforesis en gel de poliacrilamida en todas las repeticiones realizadas a las distintas concentraciones de aislado de soya es de 8 Kda.

La gráfica 1 muestra un comparativo entre los valores de la media ( $\bar{X}$ ) a las diferentes concentraciones que se manejan (0.5 – 3.0  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ).

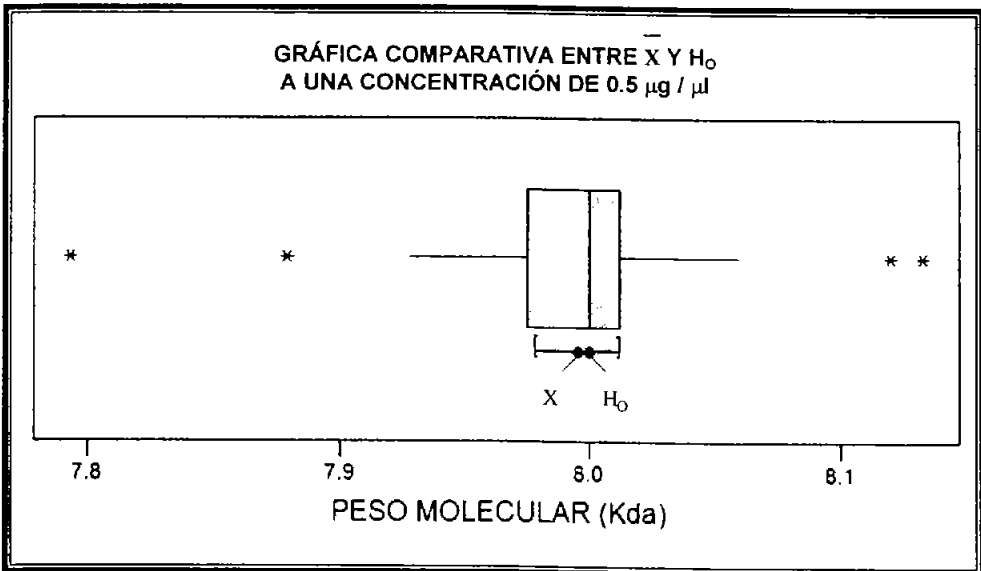




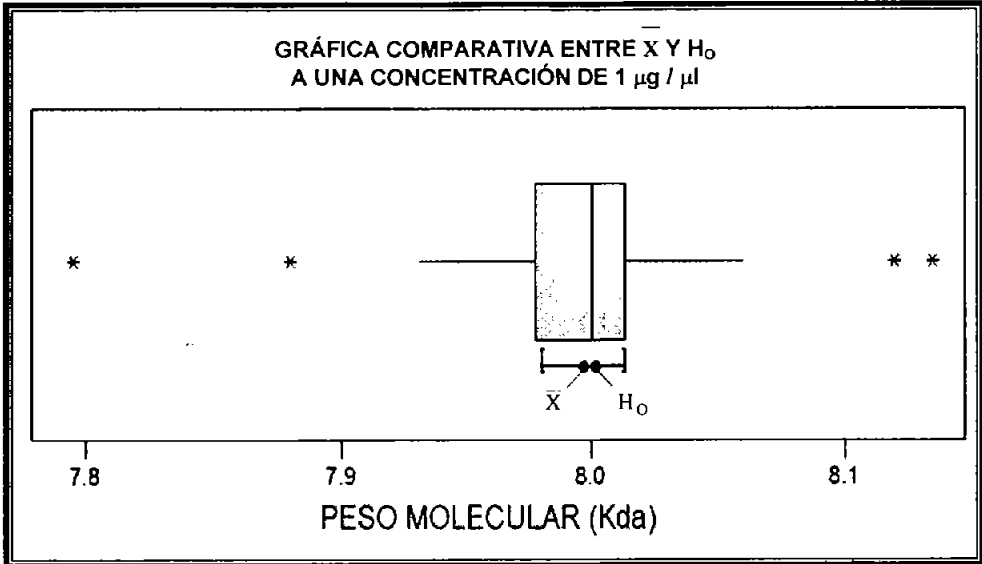
La gráfica anterior muestra que los valores promedios o medias obtenidas a partir de los pesos moleculares reportados para las muestras de aislado de soya a concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ , son aproximadamente iguales y la dispersión de los datos es muy similar, por lo que no se muestran diferencias notables entre los pesos moleculares obtenidos a las distintas concentraciones, es decir, a partir de esta información se establece que las muestras de aislado de soya que se analizaron a las distintas concentraciones son iguales y no muestran diferencias significativas, por lo que, del mismo modo, los pesos moleculares correspondientes a la banda de interés que se obtuvieron en todas las repeticiones y a las diferentes concentraciones son prácticamente iguales y coinciden con el valor esperado (8 Kda).

En las gráficas siguientes se muestra la variación existente entre el valor calculado de la media y la hipótesis nula en cada una de las concentraciones (gráficas 2, 3, 4 y 5).

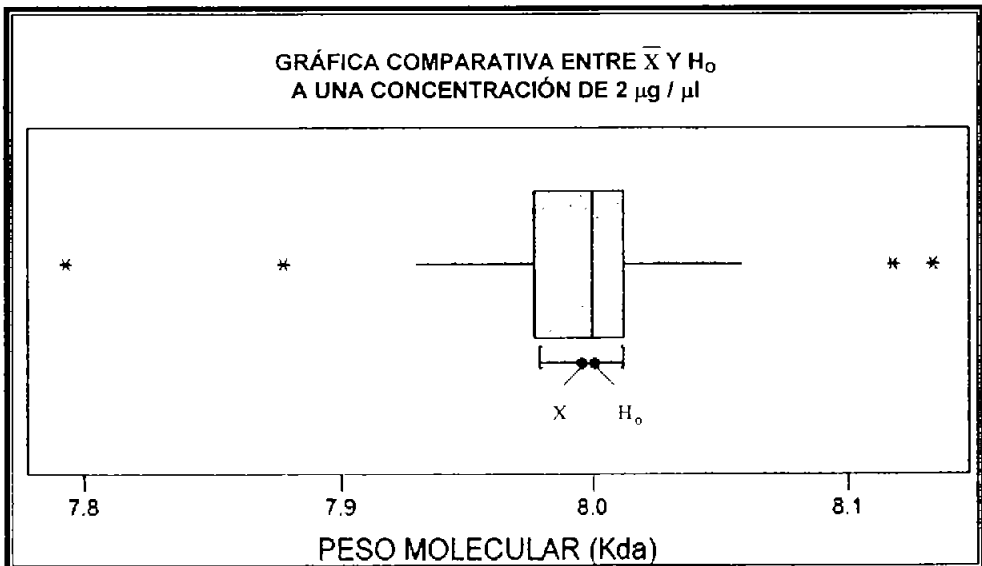
GRÁFICA 2



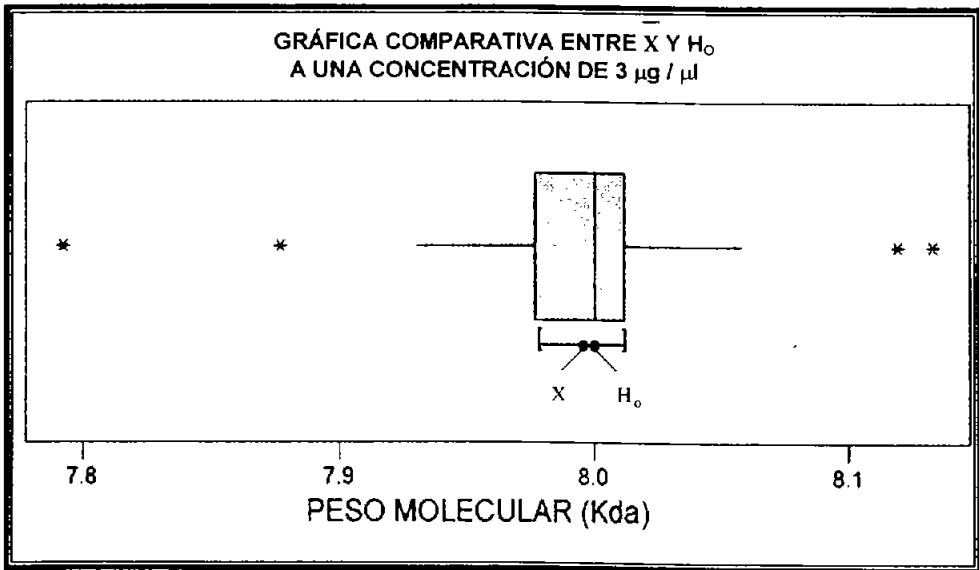
GRÁFICA 3



GRÁFICA 4



GRÁFICA 5



Como se puede observar, las gráficas anteriores tienen prácticamente el mismo comportamiento y muestran, de manera individual para cada concentración de aislado de soya analizada, la variación existente el valor de la media ( $\bar{X}$ ) y la hipótesis nula planteada ( $H_0$ :  $\mu = 8 \text{ Kda}$ ). Como se puede observar, no hay variaciones significativas entre éstos dos valores, por lo que éstos gráficos corroboran la afirmación de que la media de los pesos moleculares reportados a las distintas concentraciones es aproximadamente de 8 Kda, el cuál es el valor esperado; por lo tanto, de acuerdo con lo anterior, se establece que es posible trabajar con cualquiera de las concentraciones planteadas (0.5, 1, 2 y  $3 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ ), ya que al no existir grandes diferencias entre ellas, el uso de cualquiera de éstas resulta indistinto, por lo que independientemente de la concentración que se maneje, se obtendrá el mismo resultado.

Como se mencionó anteriormente, dentro de la validación la prueba de hipótesis tiene la finalidad de evaluar la selectibilidad, exactitud y rango que desarrolla un método analítico. Para este caso en particular, debido a la sensibilidad que presenta, el método de electroforesis en gel de acril-biscarilamida es utilizado como un método de

separación, por lo que para llevar a cabo la técnica no se requiere de una muestra pura, debido a que es capaz de realizar la separación de las diferentes moléculas de una misma muestra de acuerdo al peso molecular que poseen y es ahí en donde se involucra la selectibilidad del método, ya que una vez que se sabe el peso molecular del analito de interés, que para este estudio fue el inhibidor de tripsina, cuyo peso molecular es de 8 Kda, es posible identificar en la interpretación que se realiza del gel de acril-bisacrilamida la banda que se ajusta al peso molecular que posee el analito que está siendo estudiado. Dado que los resultados de la prueba de hipótesis muestran que a lo largo de las repeticiones de las corridas electroforéticas que se realizaron a las diferentes concentraciones (0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) siempre se obtuvo un peso molecular prácticamente igual al esperado (8 Kda), se deduce que debido a la buena selectibilidad del método fue posible identificar en todas las corridas el analito de interés.

Por otro lado, dado que la exactitud que posee un método se define como la cercanía que existe entre el valor obtenido del método a evaluar y un valor que es considerado como verdadero<sup>7, 28, 60</sup>, el resultado de la prueba de hipótesis es indicativo de la gran exactitud que desarrolla el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, ya que como se observa en la tabla 24, los resultados de las medias obtenidos a las diferentes concentraciones son prácticamente iguales al valor esperado (8Kda), lo cual habla de la exactitud que posee el método en sí mismo, independientemente de la concentración que se utilice, es decir, esta prueba demuestra que el método analítico que está siendo validado presenta una misma exactitud para las diferentes concentraciones con las que se trabajó (0.5, 1. 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ).

Otro parámetro importante a evaluar mediante la prueba de hipótesis es el intervalo que posee el método analítico, el cuál se define como el conjunto de concentraciones dentro del cual se presentan valores aceptables de precisión, exactitud y linealidad.<sup>7, 28, 60</sup>. A éste respecto, dado que los resultados que se obtuvieron a las diferentes concentraciones que se analizaron son prácticamente los mismos, se infiere que el rango de concentraciones que es posible manejar para una correcta evaluación de los

pesos moleculares está a las concentraciones que se encuentran entre 0.5 y 3.0  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  de aislado de proteína de soya.

### 3.3.2 LINEARIDAD

La correlación tiene como función principal determinar la existencia de algún tipo de relación entre dos variables, y de haber ésta, cuantifica la intensidad de la misma mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. Para efectuar dicho análisis es necesario establecer la hipótesis nula y la hipótesis alternativa, las cuáles giran en torno al valor del coeficiente de correlación ( $r$ ) obtenido a partir del gráfico de los valores que están siendo estudiados, que, para este caso en particular son los pesos moleculares a las distintas concentraciones vs. Las repeticiones del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida ejecutadas.<sup>18, 46, 47, 48, 52</sup>

Se establecen como hipótesis nula y alternativa las siguientes afirmaciones:

$H_0: r = 0$  (no hay correlación lineal significativa)

$H_1: r \neq 0$  (correlación lineal significativa)

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del análisis de correlación (Tabla 25).

TABLA 25. RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	COEF. DE CORRELACIÓN ( $r$ )	VALOR P
0.5	0.228	0.157
1	0.228	0.158
2	0.226	0.160
3	0.229	0.155

Ya que el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) determina la existencia de la relación entre dos variables, en este caso en particular, se busca establecer si existe

cierta relación entre el número de repeticiones efectuadas de la prueba de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida a las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  y los pesos moleculares obtenidos en dichas repeticiones.

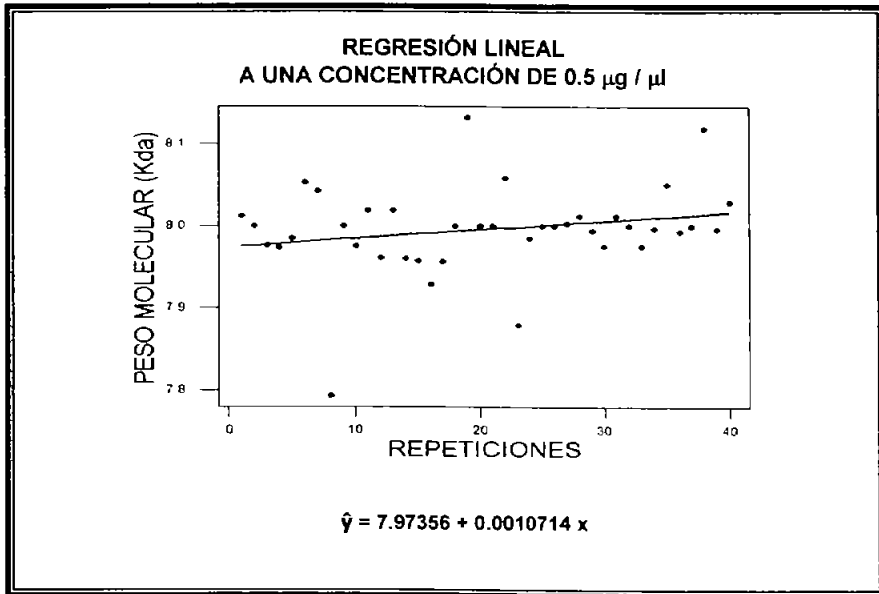
Para interpretar los valores de  $r$  calculados, se sigue el siguiente criterio:<sup>18</sup>

Si el valor absoluto del valor calculado de  $r$  excede el valor de la tabla B.1 (apéndice B), en el que se muestran los valores críticos para el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ), se concluye que existe una correlación lineal significativa. En caso contrario, no hay suficientes indicios para apoyar la conclusión de que existe dicha correlación.

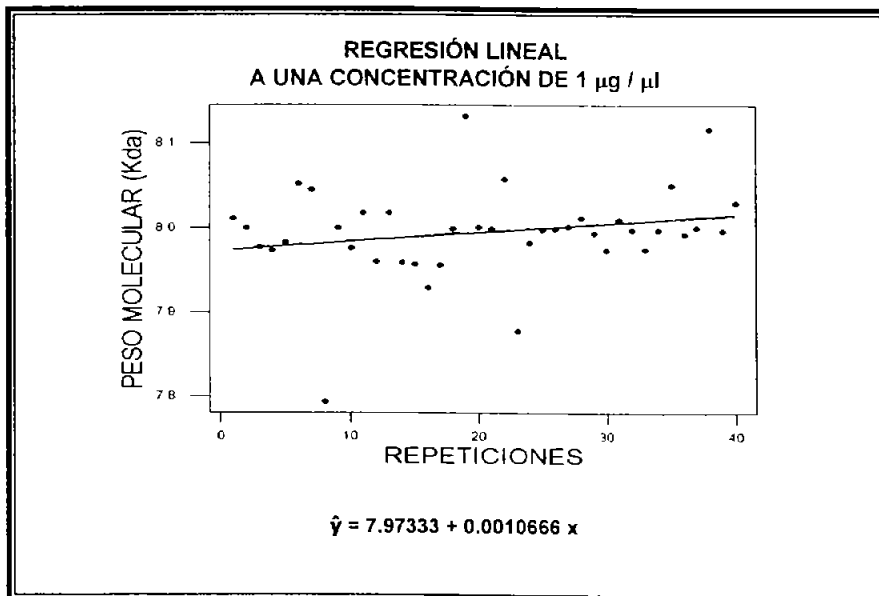
La tabla B.1 establece que para un número de 40 muestras analizadas y empleando un nivel de significancia de 0.05 el valor crítico de  $r$  es 0.312. Por lo que, dado que los valores de  $r$  obtenidos a las diferentes concentraciones, mismos que se muestran en la tabla 25, son menores que 0.312, se concluye que no existen suficientes indicios para rechazar la hipótesis nula, debido a esto, se presume que no existe relación lineal entre el número de repeticiones efectuadas de la prueba de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida a las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  y los pesos moleculares obtenidos en dichas repeticiones, es decir, los resultados descritos anteriormente muestran que no existe relación alguna entre el número de corridas electroforéticas que se realicen a las concentraciones trabajadas y los pesos moleculares obtenidos en cada una de éstas, por lo que, independientemente de la cantidad de veces que se repita una corrida a cualquiera de las concentraciones estudiadas (0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ), el peso molecular reportado siempre será el mismo.

A continuación se muestran las gráficas de regresión lineal obtenidas a las diferentes concentraciones (gráficas 6, 7, 8 y 9).

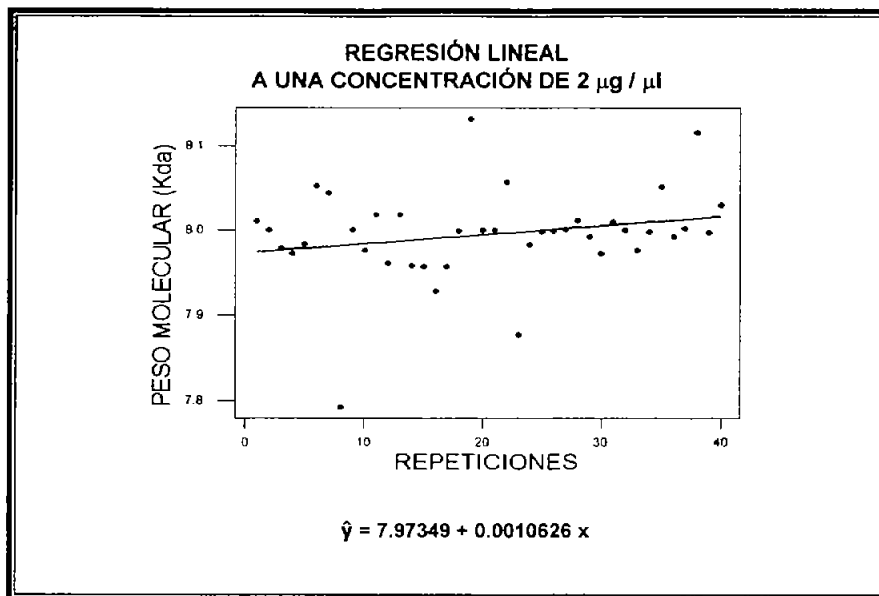
GRÁFICA 6



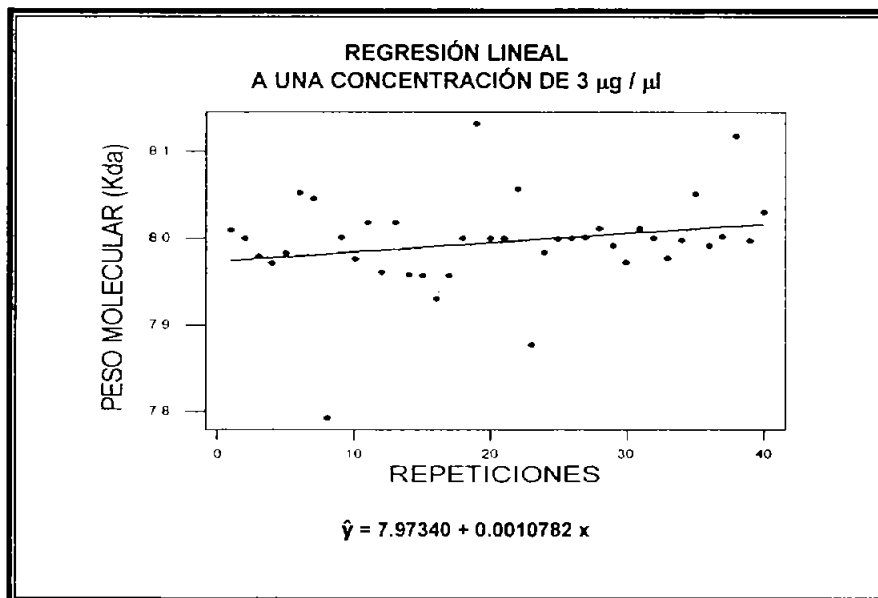
GRÁFICA 7



GRÁFICA 8



GRÁFICA 9





Las gráficas mostradas anteriormente presentan un comportamiento similar y corresponden a la representación gráfica de la relación existente entre el número de repeticiones realizadas y los pesos moleculares reportados a las diferentes concentraciones estudiadas. Se observa que no existe una relación lineal entre los valores con respecto al número de repeticiones, puesto que independientemente del número de corridas efectuadas, éstos se encuentran dispersos dentro de un rango que va de los 7.8 a los 8.1 Kda aproximadamente, por lo que esto ratifica el hecho de que los pesos moleculares obtenidos a las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  de aislado de soya, se mantienen prácticamente constantes, sin importar el número de repeticiones efectuadas.

Del mismo modo, en cada una de las gráficas se reporta la ecuación de regresión correspondiente, la cual describe la relación entre las variables  $x$  (variable independiente) y  $\hat{y}$  (variable dependiente). Estas ecuaciones corresponden al formato general de  $\hat{y} = b_0 + b_1x$ , en donde  $b_0$  corresponde a la ordenada al origen de la ecuación de regresión, y  $b_1$  representa la pendiente de dicha ecuación y representa el cambio marginal de la variable  $\hat{y}$  cuando la variable  $x$  cambia una unidad.<sup>18</sup>

Las ecuaciones obtenidas a las diferentes concentraciones coinciden en mostrar que el valor de  $b_1$  es prácticamente nulo, lo cual significa que los pesos moleculares obtenidos en cada uno de los ensayos a diferentes concentraciones con prácticamente los mismos.

Por lo anterior se establece que no existe un comportamiento lineal en el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, lo cual resulta positivo, ya que esto es indicativo de que sin importar la concentración con la que se trabaje (0.5, 1, 2 o 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) o el número de repeticiones que se efectúe de dicho método analítico, se espera obtener siempre la correcta identificación del analito de interés.

### 3.3.3 PRECISIÓN

Esta herramienta se expresa como porcentaje y sirve para describir y comparar la variabilidad o dispersión existente entre conjuntos de datos.<sup>18, 46, 50</sup>

Los coeficientes de variación obtenidos a las distintas concentraciones se muestran en la tabla 26.

**TABLA 26. COEFICIENTES DE VARIACIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES**

	0.5 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	1 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	2 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	3 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )
<b>MEDIA</b>	7.9955	7.9952	7.9953	7.9955
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	0.0549	0.0548	0.0549	0.0550
<b>COEF. DE VARIACIÓN</b>	0.6866%	0.6854%	0.6866%	0.6878%

Como se puede apreciar en los resultados mostrados en la tabla 26, los coeficientes de variación obtenidos a las diferentes concentraciones estudiadas son muy similares entre sí, lo cual indica que al no haber variaciones significativas entre ellos el comportamiento de las muestras es el mismo sin importar la concentración de la que se trate.

Por otro lado, se observa que la dispersión existente entre los pesos moleculares en cada una de las concentraciones es menor al 1%, lo cual es muestra clara de un comportamiento constante en cada una de las repeticiones, es decir, la variación existente entre los valores reportados no es significativa por lo tanto los resultados obtenidos a lo largo de las repeticiones y a las distintas concentraciones manejadas (0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) son los mismos.

En lo relacionado con la validación, el coeficiente de variación nos indica la precisión del método que está siendo validado, la cuál se define como la diferencia o dispersión que se presenta entre los resultados obtenidos de varios ensayos de una muestra que se prepara bajo las mismas condiciones.<sup>7, 28, 60</sup> Por lo anterior y tomando como base los resultados obtenidos a partir de esta técnica estadística se deduce que, dado que la

variación existente entre los pesos moleculares reportados a las diferentes concentraciones estudiadas es prácticamente nula, el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida presenta una precisión deseable tanto para el número de ensayos que se realicen como para las distintas concentraciones con las que se trabaje, de tal forma que independientemente del número de repeticiones que se realice a cualquiera de las concentraciones manejadas (0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ), los pesos moleculares obtenidos serán prácticamente iguales.

### 3.3.4 REPETIBILIDAD Y ROBUSTEZ

El análisis de la varianza de las muestras es un método utilizado para efectuar la comparación entre las medias de distintas poblaciones.

Para realizar dicha comparación es necesario partir del establecimiento de una hipótesis nula y su alternativa correspondiente, las cuáles involucran a las medias de las poblaciones que están siendo evaluadas.<sup>18, 43, 46, 49, 51</sup>

Las hipótesis establecidas son las siguientes:

$$H_0: \mu_{0.5} = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$H_1$ : Al menos una media es diferente

En la tabla 27 se resumen los resultados obtenidos del análisis de varianza realizado a las muestras de aislado de soya a las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

TABLA 27. ANÁLISIS DE VARIANZA A DISTINTAS CONCENTRACIONES

	GRADOS DE LIBERTAD (DF)	SUMA DE CUADRADOS (SS)	MEDIA DE CUADRADOS (MS)	VALOR F	VALOR P
TRATAMIENTO	3	0.00000	0.00000	0.00	1.000
ERROR	156	0.46978	0.00301		
TOTAL	159	0.46979			

En la tabla 27 se muestra el valor P obtenido para cada una de las concentraciones analizadas (0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ), el cuál, como se mencionó anteriormente, tiene como finalidad medir la confianza para rechazar o aceptar la hipótesis nula de acuerdo con el nivel de significancia que se maneje, mismo que para este caso en particular es de 0.05.

Debido a que el valor de P obtenido a las distintas concentraciones es significativamente mayor que el nivel de significancia, se acepta la hipótesis nula, con lo cual se establece que no existen diferencias significativas entre los valores de las medias reportados a las distintas concentraciones, por lo que, de lo anterior se deduce que los pesos moleculares obtenidos en las repeticiones y a las concentraciones estudiadas son prácticamente iguales entre sí (8 Kda. aproximadamente) y debido a ello resulta factible utilizar de forma indistinta cualquiera de éstas concentraciones, ya que se obtendrá el mismo resultado.

El análisis de varianza es una técnica estadística de suma utilidad en la validación, ya que a partir de ésta se evalúa la repetibilidad, reproducibilidad y robustez de un método analítico. En lo referente a la primera, la cual se define como la cercanía que existe entre los resultados obtenidos de mediciones sucesivas realizadas por un mismo operador bajo las mismas condiciones experimentales<sup>7, 28, 60</sup>, los resultados de las desviaciones estándar calculadas a las diferentes concentraciones manejadas que se muestran en la tabla 28, son un claro indicativo de la poca dispersión que presentan los valores obtenidos durante las repeticiones con respecto a la media, por lo que resulta factible aseverar que el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida posee una repetibilidad favorable, por lo que, mientras el método se ejecute bajo las mismas condiciones experimentales se espera que los resultados obtenidos en las distintas mediciones y a las concentraciones estudiadas sean los mismos. En cuanto a la reproducibilidad, misma que determina que tanta dispersión existe entre los resultados obtenidos en los diversos ensayos realizados por diferentes analistas, para este caso en particular no puede ser evaluada, ya que sólo se cuenta con los datos reportados por un analista. Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de

varianza, la robustez que presenta el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida es adecuada, ya que al ser ésta la habilidad que posee un método para no mostrar cambio alguno en los resultados al realizar la prueba con pequeños cambios en los parámetros, los datos estadísticos muestran que aún cuando se variaron las concentraciones de aislado de proteína de soya, los pesos moleculares reportados a las diferentes concentraciones estudiadas fueron los mismos.

## 4. RECOMENDACIONES Y CONCLUSIONES

### 4.1 RECOMENDACIONES

Tomando como base la metodología experimental planteada para este trabajo así como los resultados obtenidos a partir de ella, se sugiere que, en lo referente a la fase experimental, se preste especial cuidado en la preparación de los reactivos que se requieren para efectuar la electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, debido a que de esto depende que se desarrolle sin problema alguno la corrida electroforética, por lo que se convierte en un factor crítico a controlar. Algunas de las dificultades que se pudieran presentar como consecuencia de una mala preparación de reactivos son, entre otros, una mala polimerización de los geles que se utilizan (gel concentrador y separador), lo cual puede deberse a un error durante la preparación del persulfato de amonio o TEMED, o también por una mala estandarización de pH en las soluciones amortiguadoras. Esta polimerización deficiente puede traer como consecuencia el hecho de que no se logre la gelificación de las soluciones a partir de las cuales se obtienen los geles que sirven de soporte a las muestras, o bien pueden existir problemas en cuanto a la correcta separación de la muestra a lo largo del gel debido a una mala distribución de los poros que conforman el gel separador. De igual manera, se debe tener la precaución de realizar correctamente la estandarización de pH a la solución amortiguadora de corrida, ya que, de no ser así, un pH erróneo puede provocar un sobrecalentamiento durante la ejecución de la corrida electroforética, lo cual puede traer como consecuencia la desnaturalización de las proteínas presentes en la muestra que está siendo analizada debido al exceso de calor, o bien dicho incremento en la temperatura puede dañar la cámara de electroforesis.

Por otro lado, ya que el propósito principal por el cual se desarrolló este trabajo de tesis fue validar un método analítico que sirviera como herramienta para poder detectar adulteraciones en los alimentos y debido a que dichas anomalías comúnmente se realizan por la adición de aislado protéico de soya, fue que se eligió trabajar con muestras de éste aislado; no obstante se puede llegar a efectuar una adulteración con algún otro tipo de proteína de soya, por lo que, resulta factible recomendar un estudio

acerca del comportamiento que desarrollan otras presentaciones de proteína de soya con el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida.

## 4.2 CONCLUSIONES

La técnica de micro-kjeldahl fue útil para la determinación del contenido de proteína de soya presente en la muestra empleada, el cual fue del 91.08%. Dicho valor obtenido corroboró la información proporcionada en la ficha técnica de dicha muestra, en la que se hacía la aseveración de que la muestra de soya empleada en el estudio se trataba de un aislado proteico de soya. Del mismo modo, el resultado obtenido a partir de esta técnica se convirtió en un elemento base para la subsecuente experimentación, ya que mediante éste fue posible calcular el peso de muestra de aislado de soya requerido para efectuar la electroforesis en gel de acril-bisacrilamida.

Por otro lado, se realizaron corridas electroforéticas a un total de 21 concentraciones de aislado de proteína de soya con el fin de hallar aquellas en las que se obtenía un bandeo legible en los geles de acril-bisacrilamida, encontrando que las más adecuadas fueron las de 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g}$  de proteína de soya /  $\mu\text{l}$ .

Así mismo, se encontró que concentraciones menores a 0.5  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$  no producen bandas legibles y, de igual forma, concentraciones mayores producen bandas electroforéticas coleadas no definidas.

Las concentraciones recomendadas para una mejor interpretación de los geles son las de 2 y 3  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$ .

Del análisis estadístico aplicado a los resultados obtenidos para efectuar la validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, se obtuvo lo siguiente: Con base en la prueba de hipótesis, en la que se aceptó la hipótesis nula, se infiere que este método analítico posee una adecuada selectibilidad y exactitud y que el rango de concentraciones que es posible utilizar para una correcta interpretación de los geles está entre las concentraciones de 0.5 a 3  $\mu\text{g}$  de proteína de soya /  $\mu\text{l}$ .



La regresión lineal y correlación demostraron que los pesos moleculares reportados a lo largo de las repeticiones no son proporcionales al número de ensayos efectuados, es decir, son independientes entre sí.

En lo referente al coeficiente de variación, se establece que el método analítico sujeto de estudio presenta una precisión adecuada para el análisis de las muestras de aislado proteico de soya, dado que los pesos moleculares registrados a lo largo de la experimentación son constantes.

Finalmente, el análisis de varianza muestra que, debido a que no se rechazó la hipótesis nula, el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida posee una repetibilidad y robustez convenientes para realizar el análisis de una muestra de aislado de proteína de soya a diferentes concentraciones.

Por todo lo anterior y de acuerdo con el objetivo general del presente estudio, se deduce que la electroforesis en gel de acril-bisacrilamida resulta ser un método efectivo para determinar la presencia de aislado de proteína de soya en alimentos, lo cuál resulta ser una herramienta muy útil para identificar posibles adulteraciones en éstos.

---

## 5. LITERATURA CONSULTADA

### > LIBROS

1. **Ayres, Gilbert H.** (1970). "Análisis Químico Cuantitativo". Ed. Harla, 2ª edición, México, p.138.
2. **Baduí Dergal, Salvador.** (1993). "Química De Los Alimentos". Ed. Pearson Educación, 3ª edición. México, p.452-456, 617-635.
3. **Bagasra, Omar.** (1997). "In situ PCR Techniques". Ed. Wiley-Liss, 1a edición, U.S.A., p. 1-11, 13-15.
4. **Bohinski, Robert C.** (1978). "Bioquímica". Fondo Educativo Interamericano, México, p. 30-33.
5. **Cheftel, Jean-Claude, Cuq, Jean-Louis y Lorient, Denis.** (1989). "Proteínas Alimentarias". Ed. Acribia, Zaragoza España, p. 49-102.
6. **Creighton, T. E.** (1989). "Protein Structure. A Practical Approach". Ed. IRL Press, England, p. 1-19, 225-250.
7. **Garfiel, Frederick M. et al.** (2000). "Quality Assurance Principles For Analytical Laboratories". AOAC International, 3ª edición. U.S.A. p.74-76, 116-122.
8. **Gordon, A. H.** (1975). "Electroforesis De Proteínas En Geles De Poliacrilamida Y De Almidón". Ed. El Manual Moderno. México.
9. **Grace, Eric S.** (1997). "Biotechnology Unzipped. Promises & Realities". Ed. Joseph Henry Press, U.S.A., p. 31-32, 52-53.

10. **Hettiarachchy, Navam S.** (1994). "Protein Functionality in Food Systems". Ed. Marcel Dekker Inc. U.S.A. p. 311-321.
11. **Kirk, R. S., Sawyer, R., Egan, H.** (1999). "Composición y Análisis de Alimentos de Pearson". Ed. CECOSA. México, p. 19-25.
12. **Nollet, Leo M. L.** (1996). "Handbook of Food Análisis. Vol. 1". Ed. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. p. 246-307.
13. **Pearson D.** (1998). "Técnicas De Laboratorio Para El Análisis De Alimentos". Ed. Acibia, Zaragoza España. p. 9-12.
14. **Rakosky, Joseph Jr.** (1989). "Protein Additives In Foodservice Preparations". Ed. Van Nostrand Reinhold. U.S.A. p. 3-10, 36-37.
15. **Rosemberg, Ian M.** (1996). "Protein Analysis And Purification Benchtop Techniques". Ed. Birkhäuser. U.S.A. p. 5-16, 55-76.
16. **Skoog, Douglas A.** (2000). "Fundamentos De Química Analítica". Ed. Reverté, S.A. 4ª edición, España, p. 42.
17. **Swartz, Michael y Krull, Ira S.** (1997). "Analytical Method Development And Validation". Ed. Marcel Dekker. U.S.A.
18. **Triola, Mario F.** (2000). "Estadística Elemental". Ed. Pearson Educación, 7a edición, México. p. 342-409, 476-531, 572-607.
19. **Vázquez, A. A.** (2002). "Evaluación De La Calidad Proteica En Salchichas Comerciales Tipo Viena Expendidas En La Ciudad De México". Tesis. FES-Cuautitlán. UNAM. p.29-46.

20. **Watty B. Margarita.** (1982). "Química Analítica". Ed. Athambra Mexicana, 1a edición, México, p. 27.

➤ **REVISTAS**

21. **Bean Scott R. y Lookhart George L.** (2001). "High-Performance Capillary Electrophoresis Of Meat, Dairy And Cereal Proteins". *Electrophoresis*. Vol. 22, p. 4207-4215.

22. **Bhaduri S. y Cottrell B.** (2001). "Sample Preparation Methods For PCR Detection Of Escherichia Coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, And Listeria Monocytogenes On Beef Chuck Shoulder Using A Single Enrichment Medium". *Molecular and Cellular Probes*. Vol. 15, p. 267-274.

23. **Chapman, K. G.** (1991). "A History of Validation in the United States: Part I". *Pharmaceutical Technology*. Vol. 15, No. 10, p. 82-96.

24. **Chapman, K. G.** (1991). "A History of Validation in the United States: Part II". *Pharmaceutical Technology*. Vol. 15, No. 11, p. 54-70.

25. **Colgan, S. et al.** (2001). "Development Of A DNA-Based Assay For Species Identification In Meat And Bone Meal". Department of Agricultural and Food Engineering, Irlanda.

26. **Delano, James et al.** (2004). "Use Of An Intron Region Of A Chloroplast Trna Gene (Trnl) As A Target For PCR Identification Of Specific Food Crops Including Sources Of Potential Allergens". Canadian Food Inspection Agency, Canada.

27. **Giese, James.** (2002). "Testing For Adulterated Foods". *Food Technology*. Vol. 56, No. 2, p. 66-68.

28. **Green, J. Mark.** (1996). "A Practical Guide To Analytical Method Validation". Analytical Chemistry. Vol. 68, p. 305A-309A.
29. **Hokanson Gerard C.** (1994). "A Life Cycle Approach To The Validation Of Analytical Methods During Pharmaceutical Product Development. Part I". Pharmaceutical Technology. No. 9, p. 118-130.
30. **Hokanson Gerard C.** (1994). "A Life Cycle Approach To The Validation Of Analytical Methods During Pharmaceutical Product Development. Part II". Pharmaceutical Technology. No. 10, p. 92-100.
31. **Ingianni, A. et al.** (2001). "Rapid Detection Of Listeria Monocytogenes In Foods by A Combination Of PCR And DNA Probe". Molecular and Cellular Probes. Vol 15, p. 275-280.
32. **Jeng, Shih-Tong et al.** (2001). "Detection Of The Genetically Modified Soybeans In Processed Foods". Food & Fertilizer Technology Center. Taipei, Taiwan.
33. **Joachim, Ermer** (2001). "Validation In Pharmaceutical Analysis. Part I", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 24, p.755-767.
34. **Laemmli, V. K.** (1970). "Clavage of Structural Proteins. The Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature. Vol. 227, p. 680-685.
35. **Lazar, Max S.** (1993). "Concepts For The Process Validation Of Bulk Pharmaceutical Chemicals (BPC)". Pharmaceutical Technology. Vol.17, No. 12, p. 32-40.
36. **Lee, Martin L., Taylor Mary, Kantrowitz Julia.** (1988). "Statistical Evaluation of Quality Control Tests", Pharmaceutical Technology. Vol 12, No 9, p. 108-120.

37. **Lin, Hsu-Yang.** (2001). "Detection Of Genetically Modified Soybeans By PCR Method And Immunoassay Kits". *Journal of food and drug analysis*. Vol. 9, No. 3, p. 160-166.
38. **Menter, Paul.** (2000). "Acrylamide Polimerization. A Practical Approach", Bio-Rad Laboratories. U.S.A.
39. **Olsen, John Elmerdahl.** (2000). "DNA-Based Methods For Detection Of Food-Borne Bacterial Pathogens". *Food Research International*. Vol. 33, p. 257-266.
40. **Powledge, Tabitha M.** (1996). "The Polymerase Chain Reaction". *Breakthroughs in science. FASED Journal*.
41. **Rybicki, Ed. y Purves, Maud.** (1996). "SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)". Dept. Microbiology. University of Cape Town. South Africa.
42. **Wood, Roger** (1999). "How To Validate Analytical Methods", *Analytical Chemistry*. Vol. 18, No. 9/10. p. 624-631.

#### > PÁGINAS ELECTRÓNICAS

43. <http://math.upr.clu.edu/~edgar/lec192.pdf>
44. <http://www.estadistico.com/arts.html?20011008>
45. <http://www.itch.edu.mx/academic/industrial/estadistica1/cap02.html>
46. <http://www.minitab.com/support/docs/rel14/MeetMinitab14.pdf>
47. [http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Actividad\\_4.pdf](http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Actividad_4.pdf)

48. [http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Actividad\\_5.pdf](http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Actividad_5.pdf)
49. <http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/ANOVA.pdf>
50. [http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Estad\\_Descriptiva.pdf](http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Estad_Descriptiva.pdf)
51. <http://www.uv.es/~lejarza/anova/anova.html>
52. <http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/RegresionLineal.pdf>

➤ **NORMAS OFICIALES MEXICANAS**

53. **Norma Mexicana. NMX-EC-17025-IMNC-2000.** "Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de ensayo y de Calibración".
54. **Norma Oficial Mexicana. NOM-034-SSA1-1993.** "Bienes y servicios. Productos de la carne. Carne molida y carne molida moldeada. Envasadas. Especificaciones sanitarias".
55. **Norma Oficial Mexicana. NOM-119-SSA1-1994.** "Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza".
56. **Norma Oficial Mexicana. NOM-122-SSA1-1994.** "Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias".
57. **Norma Oficial Mexicana. NOM-145-SSA1-1995.** "Bienes Y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Especificaciones sanitarias".

58. **Secretaría de Salud.** "Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios".

➤ **GUÍAS Y MANUALES**

59. **Alimentaria Mexicana Bekarem, S.A. de C.V.** (2003). Ficha técnica de proteína aislado de soya 590.

60. **Eurachem Guide.** (1998). "The Fitness for Purpose of Analytical Methods". A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Reino Unido.

61. **Food and Drug Administration.** (1987). "Guideline on General Principles of Process Validation". U.S.A.

62. **Kodak Digital Science EDAS 120.** "Instruction Manual".

63. **Mini-Protean 3 Cell.** "Instruction Manual", Bio-Rad Laboratories. Catalog Numbers 165-3301, 165-3302. U.S.A.



## 6. APÉNDICES

### APÉNDICE A

#### MANUAL DE USO DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS

Para la fase experimental se utilizó la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN 3 de la marca BIO-RAD, cuyo funcionamiento se describe a continuación.

##### A.1 COMPONENTES DE LA CÁMARA

- **Plato separador:** Es la placa de cristal más grande en cuyos extremos se encuentran fijos los separadores de cuyo grosor depende el espesor que se obtiene del gel (Fig. 13).



Fig. 13 Plato separador

- **Plato pequeño:** Es la placa de cristal chica (Fig. 14), la cual junto con el plato separador conforman el contenedor del gel (Fig. 15).

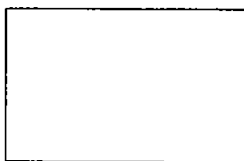


Fig. 14 Plato pequeño

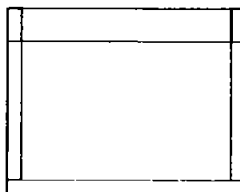


Fig. 15 Contenedor del gel

- **Armazón de formación:** Se utiliza durante la formación del gel para alinear y sujetar el cristal separador y el cristal pequeño para formar el contenedor del gel (Fig 16).

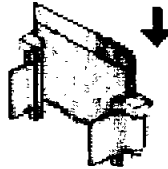


Fig. 16 Armazón de formación del gel

- **Plataforma de formación:** Esta plataforma asegura el ensamblaje formado por el armazón de formación y el contenedor del gel durante la formación de este último (Fig. 17).

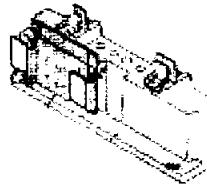


Fig. 17 Plataforma de formación

- **Tapa plástica de amortiguador:** Es un molde plástico que se utiliza como parte del ensamblaje de la cámara en el caso de que se desee correr un solo gel (Fig. 18).

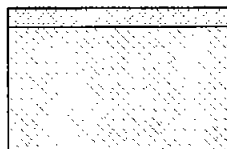


Fig. 18 Tapa plástica de amortiguador

- **Monta-electrodos:** En esta pieza se ensamblan en cada extremo los cristales contenedores de los geles. En el centro se encuentran los electrodos y en parte superior se localizan sus conexiones, el ánodo y cátodo, los cuáles se identifican con el color rojo y negro respectivamente (Fig. 19).

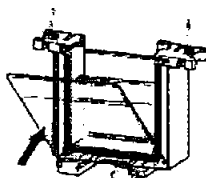


Fig. 19 Monta-electrodos

- **Marco sujetador:** Esta cavidad tiene como función principal sujetar en su interior el monta-electrodos con los contenedores de geles (Fig. 20), formando así el ensamble interno de la cámara de electroforesis.

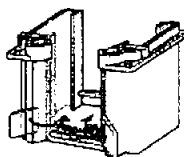


Fig. 20 Marco Sujetador

- **Mini tanque:** Esta parte guarda el ensamble interno de la cámara que se formó con las piezas anteriormente descritas a lo largo de la electroforesis (Fig. 21).

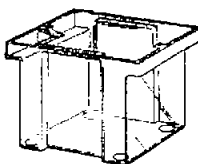


Fig. 21 Mini Tanque

En la siguiente figura (Fig. 22) se muestra un esquema general de las piezas que componen la cámara de electroforesis y su correspondiente ensamble.

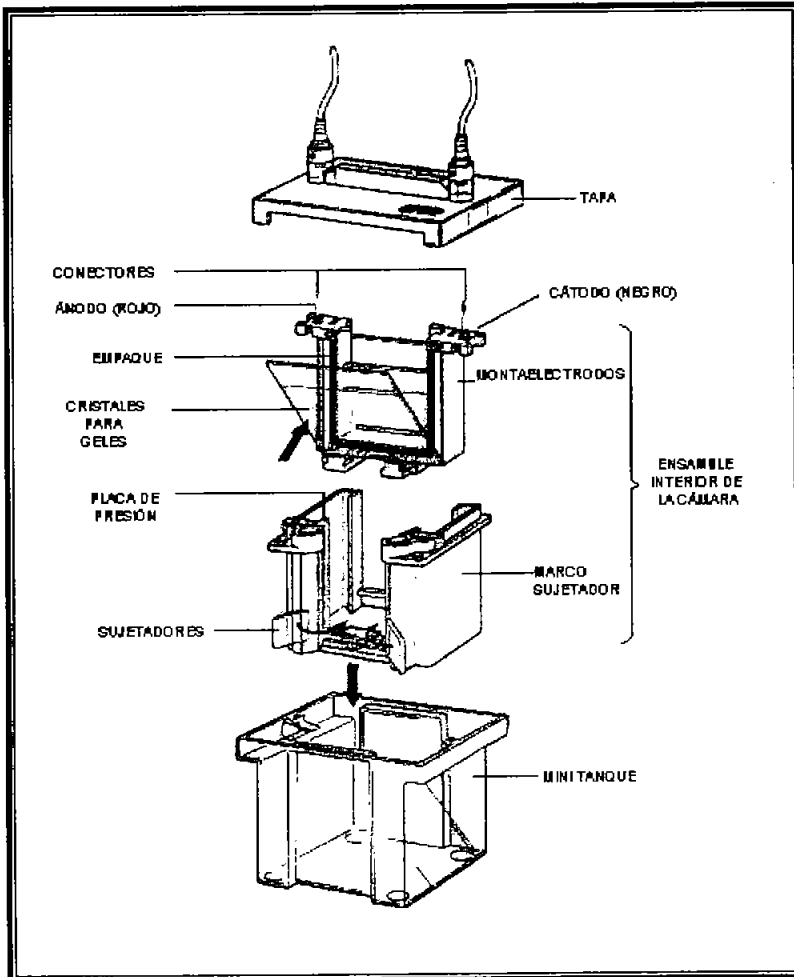


Fig. 22 Ensamble de la cámara de electroforesis BIO-RAD

## A.2 GUÍA DE USO

### ➤ PREPARACIÓN DEL CONTENEDOR DEL GEL

1.- Colocar el plato pequeño encima del plato separador (Fig. 23).

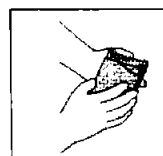


Fig. 23 Ensamble de los cristales

2.- Deslizar ambos platos dentro del armazón de formación, de tal forma que el cristal pequeño quede al frente. Asegurarse que ambas placas estén bien niveladas (Fig. 24).

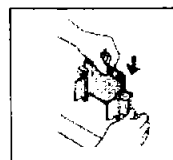


Fig. 24 Ensamble de los cristales dentro del armazón de formación

3.- Asegurar los cristales con los sujetadores de presión del armazón (Fig. 25).

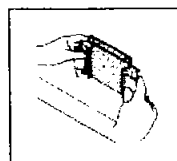


Fig. 25 Fijar los cristales al armazón

4.- Colocar el armazón en la plataforma de formación y sujetarlo con las pinzas que se encuentran en la parte superior de esta última y presionarán los cristales firmemente hacia abajo contra el empaque, el cual actúa como gel tapón para impedir algún derrame (Fig. 26). Acto seguido, con ayuda de una micro-pipeta, se vierte el gel separador; una vez que gelificó, se coloca el gel concentrador en estado acuoso (ver capítulo 2 sección 2.3.3.3) y, antes de que éste polimerice, se coloca en el borde superior el peine que formará los carriles donde se colocarán las muestras.

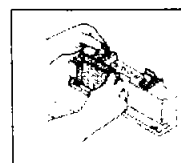


Fig. 26 Ensamble del armazón en la plataforma

➤ **ENSAMBLE DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS**

5.- Una vez que se preparó el gel y éste polimerizó dentro de los cristales, se deben extraer los cristales contenedores del gel del armazón de formación (fig. 27).

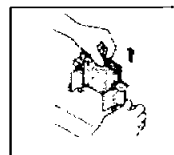


Fig. 27 Extraer los cristales del armazón

6.- Colocar los cristales a cada lado del monta-electrodos, o bien, en el caso de que se desee correr un solo gel, colocar en el otro extremo la tapa plástica del amortiguador (Fig. 28).

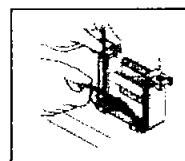


Fig. 28 Colocar los cristales en el monta-electrodos

7.- Deslizar el monta-electrodos dentro del marco sujetador (Fig. 29).

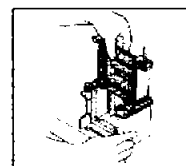


Fig. 29 Ensamble del monta-electrodos dentro del marco sujetador

8.- Presionar el monta-electrodos hacia abajo mientras se asegura al marco sujetador. Entre los cristales verter solución amortiguadora de corrida hasta el borde de los cristales. Con una micro-pipeta colocar la muestra (ver capítulo 2 sección 2.3.3.4) en cada uno de los carriles que se formaron en el gel (Fig. 30).



Fig. 30 Asegurar el monta-electrodos dentro del marco sujetador

9.- Introducir la cámara interna al mini-tanque, verter solución amortiguadora de corrida hasta cubrir los seguros de la cámara interna. Tapar la cámara de tal forma que coincidan los colores de los electrodos con los de la tapa (rojo y negro). Conectar la cámara a la fuente de poder y regular al voltaje deseado (Fig. 31).

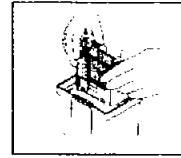


Fig. 31 Colocar la cámara interna dentro del mini-tanque

## APÉNDICE B

**TABLA B.1 VALORES CRÍTICOS PARA EL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON  $r$**

<b>n</b>	<b><math>\alpha = 0.05</math></b>	<b><math>\alpha = 0.01</math></b>
4	0.950	0.999
5	0.878	0.959
6	0.811	0.917
7	0.754	0.875
8	0.707	0.834
9	0.666	0.798
10	0.632	0.765
11	0.602	0.735
12	0.576	0.708
13	0.553	0.684
14	0.532	0.661
15	0.514	0.641
16	0.497	0.623
17	0.482	0.606
18	0.468	0.590
19	0.456	0.575
20	0.444	0.561
25	0.396	0.505
30	0.361	0.463
35	0.335	0.430
40	0.312	0.402
45	0.294	0.378
50	0.279	0.361
60	0.254	0.330
70	0.236	0.305
80	0.220	0.286
90	0.207	0.269
100	0.196	0.256

Triola, Mario F. ESTADÍSTICA ELEMENTAL. Pearson Educación Tabla A-6



## 6. APÉNDICES

### APÉNDICE A

#### MANUAL DE USO DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS

Para la fase experimental se utilizó la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN 3 de la marca BIO-RAD, cuyo funcionamiento se describe a continuación.

#### A.1 COMPONENTES DE LA CÁMARA

- **Plato separador:** Es la placa de cristal más grande en cuyos extremos se encuentran fijos los separadores de cuyo grosor depende el espesor que se obtiene del gel (Fig. 13).

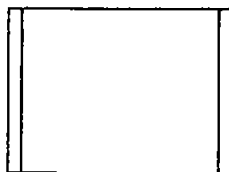


Fig. 13 Plato separador

- **Plato pequeño:** Es la placa de cristal chica (Fig. 14), la cual junto con el plato separador conforman el contenedor del gel (Fig. 15).



Fig. 14 Plato pequeño

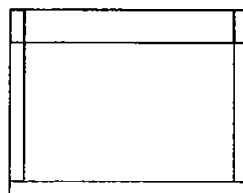


Fig. 15 Contenedor del gel

- **Armazón de formación:** Se utiliza durante la formación del gel para alinear y sujetar el cristal separador y el cristal pequeño para formar el contenedor del gel (Fig 16).

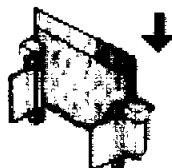


Fig. 16 Armazón de formación del gel

- **Plataforma de formación:** Esta plataforma asegura el ensamblado formado por el armazón de formación y el contenedor del gel durante la formación de este último (Fig. 17).

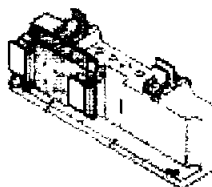


Fig. 17 Plataforma de formación

- **Tapa plástica de amortiguador:** Es un molde plástico que se utiliza como parte del ensamblado de la cámara en el caso de que se desee correr un solo gel (Fig. 18).

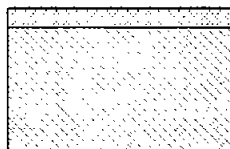


Fig. 18 Tapa plástica de amortiguador

- **Monta-electrodos:** En esta pieza se ensamblan en cada extremo los cristales contenedores de los geles. En el centro se encuentran los electrodos y en parte superior se localizan sus conexiones, el ánodo y cátodo, los cuáles se identifican con el color rojo y negro respectivamente (Fig. 19).

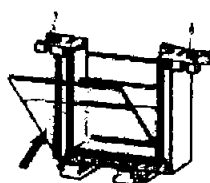


Fig. 19 Monta-electrodos

- **Marco sujetador:** Esta cavidad tiene como función principal sujetar en su interior el monta-electrodos con los contenedores de geles (Fig. 20), formando así el ensamble interno de la cámara de electroforesis.

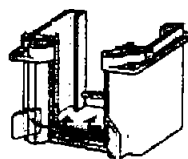


Fig. 20 Marco Sujetador

- **Mini tanque:** Esta parte guarda el ensamble interno de la cámara que se formó con las piezas anteriormente descritas a lo largo de la electroforesis (Fig. 21).

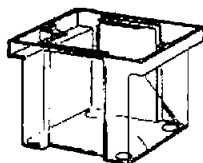


Fig. 21 Mini Tanque

En la siguiente figura (Fig. 22) se muestra un esquema general de las piezas que componen la cámara de electroforesis y su correspondiente ensamble.

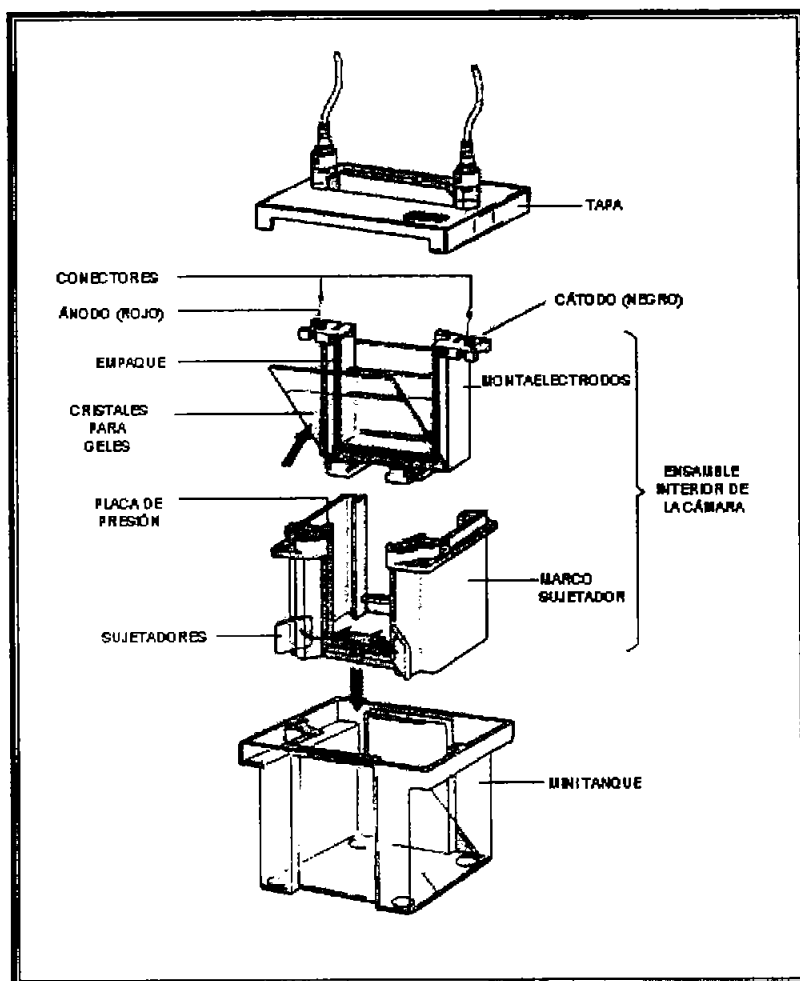


Fig. 22 Ensamble de la cámara de electroforesis BIO-RAD

## A.2 GUÍA DE USO

### ➤ PREPARACIÓN DEL CONTENEDOR DEL GEL

1.- Colocar el plato pequeño encima del plato separador (Fig. 23).

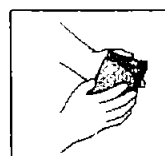


Fig. 23 Ensamble de los cristales

2.- Deslizar ambos platos dentro del armazón de formación, de tal forma que el cristal pequeño quede al frente. Asegurarse que ambas placas estén bien niveladas (Fig. 24).

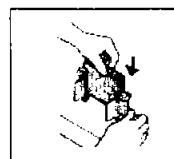


Fig. 24 Ensamble de los cristales dentro del armazón de formación

3.- Asegurar los cristales con los sujetadores de presión del armazón (Fig. 25).

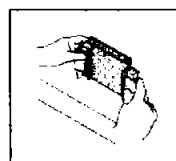


Fig. 25 Fijar los cristales al armazón

4.- Colocar el armazón en la plataforma de formación y sujetarlo con las pinzas que se encuentran en la parte superior de esta última y presionarán los cristales firmemente hacia abajo contra el empaque, el cual actúa como gel tapón para impedir algún derrame (Fig. 26). Acto seguido, con ayuda de una micro-pipeta, se vierte el gel separador; una vez que gelificó, se coloca el gel concentrador en estado acuoso (ver capítulo 2 sección 2.3.3.3) y, antes de que éste polimerice, se coloca en el borde superior el peine que formará los carriles donde se colocarán las muestras.



Fig. 26 Ensamble del armazón en la plataforma

➤ **ENSAMBLE DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS**

- 5.- Una vez que se preparó el gel y éste polimerizó dentro de los cristales, se deben extraer los cristales contenedores del gel del amazón de formación (fig. 27).

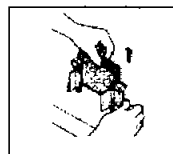


Fig. 27 Extraer los cristales del amazón

- 6.- Colocar los cristales a cada lado del monta-electrodos, o bien, en el caso de que se desee correr un solo gel, colocar en el otro extremo la tapa plástica del amortiguador (Fig. 28).

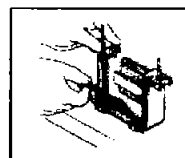


Fig. 28 Colocar los cristales en el monta-electrodos

- 7.- Deslizar el monta-electrodos dentro del marco sujetador (Fig. 29).

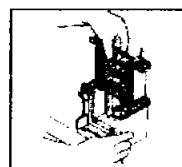


Fig. 29 Ensamble del monta-electrodos dentro del marco sujetador

- 8.- Presionar el monta-electrodos hacia abajo mientras se asegura al marco sujetador. Entre los cristales verter solución amortiguadora de corrida hasta el borde de los cristales. Con una micro-pipeta colocar la muestra (ver capítulo 2 sección 2.3.3.4) en cada uno de los carriles que se formaron en el gel (Fig. 30).



Fig. 30 Asegurar el monta-electrodos dentro del marco sujetador

9.- Introducir la cámara interna al mini-tanque, verter solución amortiguadora de corrida hasta cubrir los seguros de la cámara interna. Tapar la cámara de tal forma que coincidan los colores de los electrodos con los de la tapa (rojo y negro). Conectar la cámara a la fuente de poder y regular al voltaje deseado (Fig. 31).

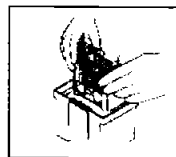


Fig. 31 Colocar la cámara interna dentro del mini-tanque

## APÉNDICE B

**TABLA B.1 VALORES CRÍTICOS PARA EL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON  $r$**

$n$	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
4	0.950	0.999
5	0.878	0.959
6	0.811	0.917
7	0.754	0.875
8	0.707	0.834
9	0.666	0.798
10	0.632	0.765
11	0.602	0.735
12	0.576	0.708
13	0.553	0.684
14	0.532	0.661
15	0.514	0.641
16	0.497	0.623
17	0.482	0.606
18	0.468	0.590
19	0.456	0.575
20	0.444	0.561
25	0.396	0.505
30	0.361	0.463
35	0.335	0.430
40	0.312	0.402
45	0.294	0.378
50	0.279	0.361
60	0.254	0.330
70	0.236	0.305
80	0.220	0.286
90	0.207	0.269
100	0.196	0.256

Triola, Mario F. ESTADÍSTICA ELEMENTAL. Pearson Educación Tabla A-6