



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTILÁN

“CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE SOYA CON LA METODOLOGÍA DE ELECTROFORÉISIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA APLICANDO UN SOFTWARE COMERCIAL (Kodak Edas 120).”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

I N G E N I E R A E N A L I M E N T O S

P R E S E N T A N :

BASALDUA LICEA MARLENE GUADALUPE

TÉLLEZ SÁNCHEZ VERÓNICA

A S E S O R E S :

DRA. SARA ESTHER VALDÉS MARTÍNEZ

DRA. CAROLINA MORENO RAMOS



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Cuantificación de proteína de soya con la metodología de electroforesis en geles de poliacrilamida aplicando un software comercial (Kodak Edas 120)

Que presenta la pasante: Verónica Téllez Sánchez

Con número de cuenta: 300064263 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 ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 30 de agosto de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	Dra. Sara Esther Valdes Martínez	
1er SUPLENTE	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
2do SUPLENTE	M. en T.A. Omar Reyes Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Cuantificación de proteína de soya con la metodología de electroforesis en geles de poliacrilamida aplicando un software comercial (Kodak Edas 120)

Que presenta la pasante: **Marlene Guadalupe Basaldua Licea**
Con número de cuenta: 404058359 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 ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 30 de agosto de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	Dra. Sara Esther Valdes Martínez	
1er SUPLENTE	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
2do SUPLENTE	M. en T.A. Omar Reyes Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm



Dedicatorias y Agradecimientos

Verónica

Dedicatorias

A dios por permitirme cerrar un ciclo más de mi vida, y por darme la fe y fortaleza para seguir adelante, pero sobre todo esta vida que es la mejor que pudo haber escogido para mí

A mi tía Male (†) porque partiste antes de que vieras este proyecto concluido, por ser un ejemplo de fortaleza pero sobre todo por ser una persona de luz que siempre me dio palabras de aliento y fortaleza, esto es para ti, donde quiera que estés. TE AMO TIA.

A mi mami, por darme la vida, por ser un ejemplo de amor y por ser mi mejor amiga. Por darme siempre palabras de aliento cuando ya no podía, gracias por ser la luz que guía mi camino, no sería nada sin tu presencia en mi vida. TE AMO MAMITA.

A mi papi, por ser un ejemplo de sencillez, por depositar toda tu confianza en mí, pero sobre todo por amarme incondicionalmente y porque eres un súper papá, por darme el mejor consejo en la vida, que ser humilde y sencilla me abre las puertas al mundo. Te amo papá, espero que estés orgulloso de mí.

Agradecimientos

A mis hermanos: Ale, por ser parte de mi vida y por ayudarme en todo lo que he y sigo necesitando porque eres una persona excelente que en todo momento me ha mostrado su apoyo por eso y mucho más, gracias hermana por estar siempre a mi lado. Te amo.

A Pablo, hermano gracias por ser mi cómplice en todo, por las risas compartidas, las comiditas, por estar siempre a mi lado, hermano estoy muy orgullosa de ti, gracias por todo, te amo gusano del mal.

A mis tías Lucy y Paz por darme palabras de aliento y estar conmigo siempre, a mis primas Paty, Diana, Mary, Sandy, Moni, Fer, China y Pichus, mi primo Luis, por ser parte de mi vida y pasar los mejores momentos de esta a su lado, porque he descubierto que la locura es un símbolo de alegría, amor, confianza, apoyo y complicidad pero sobre todo de un gran apoyo incondicional en las buenas y en las malas, gracias por ser parte de esta gran familia que amo con todo mi ser y por darme a los sobrinitos más lindos y bellos del mundo, los adoro.

A mis sobrinitos en especial a Bryan, por ser un ejemplo de verdadera fortaleza, por ser un hombrecito con el corazón y grandeza de mil hombres, eres un verdadero ejemplo de vida, te amo mucho mi niño, también a Vale, Nao, Toñito, Natis y Fabio, por hacerme la tía mas feliz del mundo y por llenar mi vida de sonrisas, cariños, besos y verdadero amor puro. Los amo mis niños.

A mi madrina Sandra por apoyarme en los momentos más difíciles, pero sobre todo por escucharme siempre, por darme consejos, cariño y palabras de aliento. Gracias la quiero mucho.

Al clan Ángeles-Téllez por hacerme sentir parte de algo tan maravilloso como con ustedes, son mis cómplices en las mejores aventuras y desveladas que he tenido, por ser parte de esta hermandad que nos unirá por siempre, gracias Pablo, Corne, Anibal, José, Melina, Areli, Wera, Betox, los amo mucho.

A rizo, amiga mil gracias por ser mi cómplice en este proyecto, por ser mi doctora particular, mi confidente, en pocas palabras mi todo, sin ti esto nunca hubiera sido culminado, gracias amiga por estar siempre ahí, por ser la parte cuerda de la relación, por ayudarme a dar ese plus y dar palabras de aliento para siempre seguir adelante. Gracias amiga por ser parte de mi vida. Gracias por ser parte de mi otra familia. Te quiero harto y amo amiga.

A mi chiquita mami, por estar siempre a mi lado, por escucharme y darme palabras de aliento, amistad, amor, cariño, porque aunque estemos lejos siempre estás en mi mente y en un lugar muy especial en mi corazón, eres una de esas personitas que hace que la vida se disfrute siempre al 1000 a tu lado, eres como uno de los mejores sueños que tengo en esta vida, porque aunque seamos tan parecidas esas



pequeñas diferencias que tenemos hacen que esto sea único y te adore cada día más, amiga te amo de una forma inexplicable, juntas para siempre. Gracias por ser parte fundamental de mí otra familia pero sobre todo porque cuando te he necesitado más que nunca siempre estás ahí para mí. Besos nena. Escucha, Piensa y Siente.....Yue.

A Hule, amigo mil gracias por ser parte de vida, eres una súper personita que ha dejado una gran huella en mi corazón y mi vida, eres uno de mis mejores amigos, gracias por darme tu confianza y cariño, pero sobre todo por escucharme siempre y darme consejos para salir adelante, te has convertido en una parte importante de mi vida, eres un miembro honorario de mi otra familia, te amo mucho Werito. Espero que esto siga hasta el fin de nuestros días.

A Jhon, gracias por ser parte de mis mejores amigos, te convertiste con el paso del tiempo en un ser muy especial para mí, gracias por tenerme siempre la confianza y cariño que siempre me has demostrado, gracias por todas las pato-aventuras que compartimos junto con toda la banda, te convertiste en uno de los miembros fundamentales de mi segunda familia, por todo eso y mucho más, gracias amigo te quiero hartito.

A Vale y Wera, por ser como mis hermanas, amigas, confidentes, y más por ser dos personitas que en las buenas y en las malas siempre estuvieron para mí, no tengo palabras para describir lo que han sido en mi vida, simplemente han sido las mejores amigas, las amo zorrueles del mal.

A toda la banda (28), Lalo (ratita), Carlos (papasote), Argel, José Luis (pelos), Hule, Jhon, Carlos (carl), Rulis, Paty, Bety, Rizo, Mich, Wera, Vale y a todos aquellos que en este momento no recuerdo pero que hicieron la estancia en la escuela el mejor lugar para poder encontrar a mi otra familia y por hacer que fueran tiempos inolvidables, gracias amigos los quiero.

Y a la generación 28 por hacer la estancia la mejor de todas, gracias por ser parte de mi vida y de momentos inolvidables.

A mis eternas, Ary, Yaz, Lucy, Nan, Nat y Bere amigas gracias por todo el tiempo que han compartido a mi lado y por ser el verdadero símbolo y significado de amistad, las quiero, espero que sigamos juntas para siempre.

Iván, amigo después de mil años la deuda ha sido saldada, cumplí hasta el final. Gracias porque aún después del tiempo transcurrido seguimos fieles como el primer día que empezamos con esta linda amistad. Te quiero mucho amigo por seguir a mi lado.

A Eric, mi vida contigo comprobé que las segundas partes son mejor. Gracias por estar siempre a mi lado, por el apoyo incondicional que me has brindado a cada momento y a lo largo de esta hermosa travesía que has decidido caminar a mi lado, te amo de una forma extraterrenal, eres mi alma gemela, gracias por compartir las alegrías, tristezas, llanto, carcajadas, juegos, caminatas en pocas palabras por estar ahí y demostrarme lo mucho que me amas,... somewhere over the rainbow, Bluebirds fly, for my and you....simplemente TE AMO. P3E*

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a la mejor casa de estudios de México y por sentirme orgullosa de poder decir con la frente en alto que soy de sangre azul y piel dorada. Goya....

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 por aceptarme y darme la mejor enseñanza que pude haber recibido en la vida pero sobre todo porque en sus aulas y patios pude conocer a mi segunda familia que son mis amigos, gracias por hacer de mí una persona de criterio y sabiduría irrepetible.

A todos mis profesores que durante toda la carrera dieron lo mejor de ellos para formarme como una profesional preparada y lista para devorar al mundo entero, me llevo lo mejor de ustedes. Gracias.

A la doctora Sara por brindarme la oportunidad de conocerla un poco más y darme la confianza para echar a andar y concluir este proyecto, no tengo palabras para agradecer lo que ha hecho por mí. Gracias la quiero mucho.



A Caro por ser una de las partes fundamentales de este proyecto, sin tu ayuda jamás hubiéramos concluido esto, gracias por abrirme tu corazón y tu alma, te has convertido en una amiga. Te quiero mucho chaparrita.

A los sinodales, Doc. Montiel, Doc. Paty Miranda, Prof. Paty Zúñiga y al Prof. Omar Reyes, por tomar parte de su valioso tiempo para revisar este proyecto, sin su ayuda no se hubiera podido llegar a algo mejor. GRACIAS.

A Sergio, gracias por estar siempre para escucharme, darme consejos, guiarme y hasta enseñarme, porque empezamos como dos desconocidos y terminamos siendo amigos, espero que siga por mucho tiempo más, gracias por todo, te quiero.

A la prof. Cortazár, por siempre brindarme su apoyo y palabras de aliento, por darme una mano amiga que siempre estuvo para mí, pero sobre todo por demostrarme que es una personita con excelente calidad humana, GRACIAS la quiero mucho.

Al doctor Arjona a la futura doctora Rosalía y a la prof. Martha por su apoyo y confianza incondicional, pero sobre todo por brindarme su amistad y apoyarme en cada momento de dificultad que se me presento por todo esto y mucho más GRACIAS. Los quiero mucho y aprecio.

**Marlene Guadalupe****Dedicatorias**

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño:

A ti dios que me diste la oportunidad de vivir y la fortaleza para seguir.

A ustedes mis lindos padres

A mi mama María Hilaria por darme la vida, por todas tus enseñanzas, valores y amor que día a día me brindas, por apoyarme y estar a mi lado y por alentarme en los momentos más difíciles. Todo lo que soy te lo debo a ti.

A mi papa José Guadalupe que por su amor, paciencia, comprensión y apoyo incondicional, estoy donde ahora estoy. Gracias por la educación, valores y ejemplo de vida que has sido. Es un regalo que les tenía pendiente. Misión cumplida.

Los Amo

A mis hermanos Maricela y Carlos que sin su apoyo y enseñanza no se que hubiera sido de mí, porque a pesar de los problema para mí son una familia maravillosa.

A mis sobrinitos José Carlos y Karla Fernanda por todo el cariño, ternura y alegrías que me brindan cada día.

A mis tíos Dionisio, tía Chivis y Rogelio por todo su amor, ternura y apoyo moral, por confiar siempre en mí.

A mis amigos Rulito, Elizabeth, Eva, Jahira, janeth, Luis, wera y vale por ser los más grandes amigos que he tenido, por siempre contagiarme su alegría a través de sus ocurrencias y por estar siempre conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. Siguen ustedes.

A Iván, Javier, Jacobo y Mónica por brindarme su amistad y cariño pero sobretodo por los ánimos para seguir adelante.

A vero por compartir este reto conmigo, gracias amiga por llegar en el momento justo para rescatarme y por enseñarme lo valioso que es la amistad, sin ti esto no hubiera sido tan divertido. Gracias amiga. Te quiero. Y sabes eres bien chicles bomba.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de ser azul y oro y sentir el orgullo universitario. Goya

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme los mejores momentos en sus instalaciones.

A la Dra. Sara por darnos la oportunidad y confianza para concluir esta etapa.

A la Dra. Carolina, a la futura Dra. Rosalí, al Dr. Arjona, Sergio y a la profesora Martha por no solo ser una guía, sino también por ser amigos y un apoyo moral en los momentos de frustración.

A los sinodales, Doc. Montiel, Doc. Paty Miranda, Prof. Paty Zúñiga y al Prof. Omar Reyes, por el tiempo dedicado a la revisión de este proyecto y por hacernos ver que todo puede mejorar. Gracias

Gracias a aquellos que directa o indirectamente participaron leyendo, opinando, corrigiendo y dando su opinión.

Gracias por todo.



En conclusión

Gracias a todos los hombres y mujeres que influyeron en nosotras para llegar hasta aquí; incluso aquellos que intentaron impedir nuestro paso, pues nos obligaron a hacer el camino más amplio.

Con cariño Flaca y China



ÍNDICE GENERAL

Índice general	I
Índice de tablas	III
Índice de figuras	IV
Índice de gráficas	V
Resumen	VI
1. Antecedentes	2
1.1.La soya	2
1.1.1 Derivados de la soya	7
1.1.2 Propiedades funcionales de los derivados de soya	10
1.1.3 Soya como aditivo en los alimentos	12
1.1.4 Normatividad de los aditivos	14
1.2 Técnicas empleadas para la detección de soya en alimentos	17
1.2.1 Electroforesis	17
1.2.1.1 Electroforesis en gel de acril-bisacrilamida	18
1.2.1.2 Parámetros de control en la electroforesis en gel de acril-bisacrilamida	21
1.2.1.3 Métodos de cuantificación de proteína	26
1.3 Validación	27
1.3.1. Tipos de validación	29
1.3.2. Desarrollo del método de validación	31
2. Desarrollo metodológico	36
2.1 Objetivos	36
2.2 Cuadro metodológico	37
2.3 Descripción del cuadro metodológico	38
2.4 Materiales y métodos	40
2.4.1 Especificación de la muestra	40
2.4.2 Determinación de proteína	40
2.4.3 Perfiles electroforéticos	41
2.4.3.1 Preparación de reactivos	43



2.4.3.2 Preparación de la muestra	44
2.4.3.3 Montaje de la cámara	44
2.4.3.4 Formulación de los geles Acril-bisacrilamida	45
3Análisis de resultados y discusión	47
3.1 Resultados de la determinación de proteína por la técnica de Micro-Kjeldahl	47
3.2 Geles obtenidos de las corridas electroforéticas	47
3.3 Exactitud, Selectibilidad e Intervalo de confianza	53
3.4 Linealidad y curva estándar	57
3.5 Repetibilidad	59
4 Recomendaciones	63
5 Conclusiones	65
6 Literatura consultada	67
7 Anexos	74
Anexo A	75
Anexo B	80
Anexo C	82
Anexo D	87
Anexo E	89
Anexo F	92
Anexo G	94
Anexo H	99



Índice de tablas

Tabla 1. Composición química de la soya y de sus partes en base seca	3
Tabla 2. Perfil de aminoácidos de proteínas comerciales de soya	4
Tabla 3. Propiedades de los inhibidores de tripsina	5
Tabla 4. Composición de los diferentes derivados de soya	7
Tabla 5. Propiedades funcionales de las proteínas de soya en los alimentos	11
Tabla 6. Clasificación de los métodos analíticos	30
Tabla 7. Tecnicas y herramientas estadísticas aplicadas a la validación	33
Tabla 8. Composición química del aislado de soya	40
Tabla 9. Marcador de pesos moleculares	43
Tabla 10. Contenido de proteína de la muestra de aislado de soya	47
Tabla 11. Resultados de los perfiles electroforéticos a la diferentes concentraciones	50
Tabla 12. Resultados obtenidos de la validación a las diferentes concentraciones	52
Tabla 13. Resultados obtenidos correspondientes a la prueba de hipótesis	54
Tabla 14. Formulación de la solución buffer de electroforesis 10X	75
Tabla 15. Formulación de la solución teñidora	76
Tabla 16. Formulación de la solución desteñidora	76
Tabla 17. Solución amortiguadora de muestra	77
Tabla 18. Lista de reactivos usados en electroforesis con características toxicas y quimicas	78



Índice de figuras

Figura 1. Representación de la separación de proteínas de acuerdo al tamaño y diferencia de peso molecular al aplicar una corriente eléctrica en un tiempo determinado	18
Figura 2. Gel de electroforesis en SDS-PAGE para proteínas mostrando el efecto “smiling”	25
Figura 3. Marcador de peso molecular de marca BIO-RAD	42
Figura 4-7. Geles obtenidos durante la experimentación	48
Figura 8. Gel de Acril-bisacrilamida con concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya	56
Figura 9. Gel de Acril-bisacrilamida con concentración de 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya	56
Figura 10. Gel de Acril-bisacrilamida con concentración de 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya	56
Figura 11. Gel de Acril-bisacrilamida con concentración de 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya	56
Figura 12. Componentes de la cámara de electroforesis vertical	81
Figura 13. Modo de ensamblar los vidrios y espaciadores de una cámara de electroforesis vertical	82
Figura 14. Procedimiento para el ensamblaje de un modelo de cámara de electroforesis vertical	83
Figura 15. Sistema de electroforesis vertical ensamblado	84
Figura 16. Montaje del sistema para la lectura de los geles con el Software comercial (Kodak Edas 120)	92
Figura 17. Escala de colores para calibración de la cámara	93
Figura 18. Base sostenedora aislante de luz sobre la pantalla de luz delimitando el gel a revisar	93
Figura 19. Base aislante para geles	94
Figura 20. Cámara para el Software comercial (Kodak Edas 120)	94
Figura 21. Desglose del análisis realizado a un gel	96
Figura 22-39. Imágenes de los geles obtenidos por el método de electroforesis	99

**Índice de gráficos**

Gráfico 1. Representación de la regresión lineal del método de electroforesis y curva estándar 58

Gráfico 2. Representación grafica de la Repetibilidad a la concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya 59

Gráfico3. Representación grafica de la Repetibilidad a la concentración de 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya 60

Gráfico 4. Representación grafica de la Repetibilidad a la concentración de 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya 60

Gráfico 5. Representación grafica de la Repetibilidad a la concentración de 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya 61



Resumen

Por la necesidad de asegurar la calidad de los productos alimenticios, ha sido necesario incorporar a las buenas prácticas de manufactura diversas herramientas analíticas que ayuden a constatar que los alimentos cumplan con los requerimientos establecidos en la normatividad, entre ellas, la posible sustitución total o parcial de componentes de alto valor comercial tales como las proteínas, por lo anterior es importante contar con técnicas que sirvan como herramientas en la detección de estas anomalías, además de que estas técnicas permitan cuantificar el contenido de los aditivos usualmente empleados como adulterantes, como la proteína de soya, en productos alimenticios, siendo una de estas técnicas, la electroforesis en geles de acril-bisacrilamida, la cual ha sido estudiada desde hace más de dos décadas.

Debido a esto es común encontrar adulteraciones intencionadas con este ingrediente con diversos fines, lo que es un fraude para el consumidor.

La finalidad principal del presente trabajo fue el estudio del comportamiento del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida frente a muestras de aislado proteico de soya para la obtención de la curva estándar, la cual pudiese ser utilizada de referencia en el equipo Kodak Edas 120, para la cuantificación del contenido de soya en alimentos, dando con ello una herramienta de detección y cuantificación de posibles adulteraciones con este aditivo.

Se realizó la determinación del porcentaje de proteína presente en el aislado proteico de soya, para corroborar si la cantidad de proteína corresponde a lo establecido por el proveedor.

Se emplearon diferentes concentraciones de muestra (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en 59 repeticiones de los perfiles electroforéticos para que de esta manera se pudiera contar con los resultados necesarios para la validación y obtención de la curva estándar.



Finalmente, con la aplicación del tratamiento estadístico, de cada uno de los componentes que integran la metodología de la validación, obteniendo la curva estándar que permitirá identificar y cuantificar el contenido de soya en diferentes matrices de alimentos, dando una herramienta para la identificación de posibles adulteraciones.





1. ANTECEDENTES

En la actualidad uno de los aditivos más utilizados en la industria alimentaria es la proteína de soya, ya que es un aditivo que proporciona numerosas propiedades funcionales a algunos alimentos tales como los embutidos, salchichas, pan, algunos lácteos, entre otros, además de que esta proteína es capaz de incrementar las propiedades nutrimentales de los mismos. Lo anterior puede ser contraproducente, debido a que los productores pueden exceder en el uso de este aditivo dando con ello emplear menos la materia prima logrando así un producto de bajo costo y baja calidad.

1.1 LA SOYA

La soya es el representante más importante de las leguminosas debido a su alta concentración de proteínas y composición balanceada de aminoácidos, mostrando un gran potencial en la sustitución de proteínas en alimentos.

La producción de soya representa una alternativa para la gran deficiencia que existe de las proteínas convencionales, como las de la leche, la carne y el huevo. Por problemas de disponibilidad de alimentos de origen animal y por razones de salud, en los últimos años han surgido diversas tecnologías que permite la incorporación de proteínas (como aditivos que proporcionan una propiedad funcional al alimento). Esta leguminosa además de nutritiva, es un alimento muy versátil y con ella se pueden preparar yogures, salchichas, hamburguesas, patés, galletas y muchos otros preparados, sobre todo en países de desabasto de proteína de origen animal.⁴¹

La soya o frijol de soya (*Glycinemax*) pertenece a las leguminosas, aunque por su elevado contenido de aceite se incluye también, junto con la canola, el algodón, el girasol, la aceituna y el cacahuate, en las oleaginosas. En forma general, la soya está anatómicamente constituida por tres fracciones principales: la cascarilla, el hipocotíleo y el cotiledón. Su composición química varía dependiendo del tipo de



cultivo, de suelo, temperatura, etc, sin embargo a continuación se muestra su composición promedio (Tabla1).¹

TABLA 1. Composición química de la soya y de sus partes en base seca (%)

	CONSTITUYENTE DE LA SEMILLA (%)	PROTEINA (N*6.25) (%)	HIDRATOS DE CARBONO TOTALES (%)	GRASAS (%)	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, 2006, Química De Los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana ,4ª Ed. pág. 634.

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 hipocotíleo, 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 4.8.¹

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 cisteína 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 que son deficientes en lisina. En la tabla 2 se muestra el perfil de aminoácidos correspondiente a la proteína de soya.¹

TABLA 2. Perfil de aminoácidos en proteínas comerciales de soya
(gramos de aminoácidos por 100 g. de proteína)

AMINO ACIDO	HARINA DESGRASADA	CONCENTRADOS	AISLADOS
Isoleusina	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
Cisteína	1.2	1.6	1.0
Fenilalanina	5.3	5.3	5.5
Treonina	4.2	4.3	3.7
Triptófano	1.4	1.4	1.3
Valina	4.9	5.0	4.8

Badui D. Salvador, 2006, Química De Los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana, 4a Ed., pág. 635.

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 (100 g. de proteína).

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 la del flujo de hormonas 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 3.¹



TABLA 3. Propiedades de los inhibidores de tripsina

PROPIEDADES	KUNITZ	BOWMAN-BIRK
Punto isoeléctrico	4.5	4.2
Peso molecular (daltones)	21,500	7,975
No. De amino ácidos	197	72
Estabilidad a la temperatura, a los ácidos y a la pepsina	inestable	-----
Hipertrofia pancreática	positiva	Positiva

Badui D. Salvador, 2006, Química De Los Alimentos, Alhambra Mexicana, 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, como lo son las hemaglutininas, 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 la elaboración de dietas balanceadas para animales como aves, cerdos y ganado, sin embargo, desde 1950 se introdujo su uso al área de la alimentación humana, haciéndose su uso más extenso en la producción de sus derivados (concentrados y aislados), mismos que se utilizan en la elaboración de alimentos para el hombre. ⁷



Propiedades nutricionales de la soya

Tanto las proteínas como el aceite que se obtienen de la semilla de soya, tienen gran demanda debido a sus diversos usos potenciales, ya sea a nivel industrial como para la alimentación animal y del hombre. Tal es así que, actualmente, representa el cultivo del cual el hombre obtiene la mayor cantidad de productos derivados, con múltiples aplicaciones para su vida y el medio donde se desenvuelve. La concentración proteica de la soya es la mayor de todas las legumbres. Pero no sólo es importante por la cantidad, sino que también lo es por su calidad.³¹

Por lo general, las proteínas provenientes de los alimentos de origen vegetal tienen un bajo contenido de aminoácidos sulfurados (metionina y cisteína). La soya, en cambio, contiene estos aminoácidos en cantidad suficiente para satisfacer los requerimientos del adulto normal. La buena digestibilidad de la proteína de la soya, siempre que esté correctamente procesada, en una dieta que incorpora un 60% del total de proteínas, permite en adultos la misma regeneración muscular –luego de un ejercicio físico intenso– que la que aportaría idéntica cantidad de carne.^{1,7}

La proteína de soya tiene importantes beneficios para la salud como:

1. Incrementa la población de bifidobacterias en el colon, lo cual contribuye a suprimir el efecto de las bacterias con actividad putrefacta.
2. Disminuye los metabolitos tóxicos y enzimas perjudiciales para el organismo.
3. Previene la diarrea patogénica y autógena por el mecanismo antagonista de bifidobacterias en el colon.
4. Previene la constipación, dada su producción de altos niveles de ácidos grasos de cadena corta.
5. Tiene una función de protección hepática al reducir los metabolitos tóxicos.
6. Reduce la presión sanguínea.
7. Tiene efectos anticancerígenos.
8. Beneficiosa en diabéticos ya que disminuyen la carga renal.
9. La proteína de soja disminuye el colesterol.³¹



1.1.1 DERIVADOS DE LA SOYA

A partir de esta leguminosa se han elaborado diversos productos comerciales clasificados de acuerdo a su contenido de proteínas; las que contienen menos son las harinas enteras, luego las desgrasadas parcial o totalmente, la siguen los concentrados y, por último, los aislados.³¹

La manera en que el frijol de soya se procesa, determina tanto las características funcionales y nutricionales de los productos finales como su uso para diversas aplicaciones en otros alimentos.⁴

En la tabla 4 se muestra la composición de los diferentes derivados de la soya.

TABLA 4. Composición de los diferentes derivados de la soya

	HARINAS		CONCENTRADOS			AISLADOS
	Sin grasa	Con grasa	alcohol	ácido	Calor húmedo	
Proteínas	41.5	53.0	66.0	67.0	70.0	93.0
Grasa	21.0	1.0	0.3	0.4	1.2	0.0
Humedad	5.0	5.0	6.7	5.2	3.1	4.7
Fibra cruda	2.1	2.9	3.5	3.4	4.5	0.2
Cenizas	5.2	6.0	5.6	4.8	3.8	3.8
ISN	---	---	5.0	7.0	3.0	85.0

(Badui D. Salvador, 2006, Química De Los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana, 4a Ed, pág.637)

Para fabricarlos es preciso romper el arreglo interno ordenado de las células del cotiledón, para separar adecuadamente los diferentes constituyentes; cada uno de



estos derivados tiene ciertas características y propiedades funcionales que pueden aprovecharse en la producción de otros alimentos más complejos y elaborados. En la obtención de aceite de soya; el “residuo” es el harina desengrasada que se utiliza para la elaboración de alimentos balanceados y de derivados proteínicos para consumo humano como las harinas, los concentrados y los aislados, de acuerdo con la metodología que se describe a continuación. ¹

Harinas

Las harinas son la forma menos refinada de la soya; se pueden fabricar con toda su grasa, y parcial o totalmente desengrasadas, ya sea como hojuelas, gránulos o polvo; contienen un mínimo de 40 % de proteínas.

Durante su producción es preciso controlar los tratamientos térmicos, ya que la proteína es muy sensible y se puede desnaturalizar; para determinar la intensidad del calentamiento, se emplean los índices de solubilidad de nitrógeno (ISN) y el de dispersabilidad de proteína (IDP). Por definición el ISN es el porcentaje del nitrógeno total que es soluble en agua en determinadas condiciones de extracción, mientras que el IDP es el porcentaje de la proteína total que es dispersable en agua. ^{1,17}

Concentrados

Estos productos son más refinados que las harinas y contienen un mínimo de 65% de proteínas; en su manufactura se eliminan menos de la mitad de los hidratos de carbono. Para su elaboración se pueden seguir tres diferentes procesos; el primero utiliza una solución de etanol al 80% para quitar ciertas fracciones solubles como lo son los oligosacáridos, parte de las cenizas y otras sustancias de peso molecular bajo; en estas condiciones las proteínas y los polisacáridos precipitan debido a que son insolubles en alcohol y se pueden recuperar para obtener un concentrado proteínico como residuo final. ^{1, 17}



El segundo proceso implica una extracción de las proteínas en su punto isoeléctrico en el que las globulinas y los polisacáridos se insolubilizan y precipitan, y posteriormente se neutralizan y se secan. El tercer método utiliza calor húmedo para desnaturalizar e insolubilizar los polipéptidos de la harina, seguido de un lavado con agua para eliminar los azúcares y otras moléculas pequeñas. En general tiene un sabor y un olor menos intenso que las harinas, ya que durante las etapas de manufactura se eliminan algunos de los compuestos responsables del sabor como por ejemplo, las lipoxigenasas. Debido a su contenido de polisacáridos, los concentrados retienen más agua y producen geles más firmes.^{1, 17}

Aislados

Estos productos son la forma comercial más purificada de las proteínas de soya, ya que contienen 90% o más de ellas.

Al igual que sucede con los concentrados, los diferentes aislados comerciales tienen aproximadamente la misma composición química; sin embargo, sus propiedades físicas y funcionales pueden variar, e incluso se pueden diseñar con los métodos de modificación.

Los aislados de soya tienen características tales como alta solubilidad, poder emulsificante, absorción de agua y los lípidos, que son de gran utilidad en la industria de alimentos.^{9,17}

Desde la década de 1970 se desarrollaron técnicas para fabricar fibrilados a partir de los aislados; estos materiales con características fibrosas o de hilo, capaces de imitar la textura de los tejidos animales. Con estas proteínas fibriladas como base, y con la adecuada adición de grasas, colorante, nutrimentos, saborizantes, etc., se pueden desarrollar productos con formas y tamaños que semejen las estructuras de filetes de pescado, de pollo, de res, etc.¹



La incorporación en diversos productos cárnicos como jamones o embutidos, permite lograr una estructura más suave y adicionar mayores cantidades de agua y lípidos. Si estas manipulaciones se hacen con el fin de mejorar la calidad del producto son lícitas y beneficiosas.⁹

1.1.2 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS DERIVADOS DE SOYA.

Las propiedades funcionales de las distintas formas comerciales de soya (harinas con o sin grasa, aislados, texturizados, extruidos, etc.) varían de acuerdo con su composición química y método de obtención, y en consecuencia, su empleo se limita a ciertos productos alimenticios en donde se desarrollan y se aprovechan verdaderamente dichas propiedades.¹⁷

El contenido proteico es particularmente importante para desarrollar dichas propiedades, aunque también pueden influir otros constituyentes, como los hidratos de carbono.

Se emplean en la elaboración de diversos derivados cárnicos (salchichas, mortadelas, albóndigas, jamones, hamburguesas, entre otros), ya que ayudan a formar emulsiones estables, pues cuando gelifican producen una estructura firme; en la panificación (pasteles, galletas, donas, harinas preparadas, etc.) y en pastas tipo macarrones; en la industria láctea (sustitutos de leche de vaca, quesos procesados y frescos, etc.); en sustitutos de leche humana; en complementos alimenticios; en dulces y confitería; en líquido viscoso (cremas, sopas, etc.); debido a que produce espumas estables, se usan como sustitutos de la clara de huevo en helados y merengues.³⁶

Las propiedades funcionales incluyen su capacidad como emulsionante, espesante, hidratante, gelificante, espumante, formador de películas, promotor de la viscosidad, termoplástico, etc.; en la tabla 5 se presentan algunas de las aplicaciones de los derivados de soya en la industria de los alimentos y 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.³⁶

De igual forma, se puede observar en dicha tabla, los derivados de la soya utilizados principalmente en la industria de los cárnicos.

TABLA 5. Propiedades funcionales de las proteínas de soya en los alimentos

PROPIEDADES FUNCIONALES	FORMA DE PROTEÍNA	SISTEMA UTILIZADO
Emulsificación		
Formación	H, C, A	Salchichas, embutidos
Estabilización	H, C, A	Productos batidos, como crema chantilly, postres congelados, embutidos en general
Absorción de grasa		
Promoción	H, C, A	Salchichas, embutidos y hamburguesas
Prevención	H, A	Donas y bollos
Absorción de agua		
Absorción	H, C	Pasteles, panes y pastas
Retención	H, C	Pan y pasteles
Textura		
Viscosidad	H, C, A	Sopas y salsas
Gelificación	A	Sustitutos de carne molida
Formación de fibras	A	Sustitutos de carne
Formación de masas	H, C, A	Productos de panificación
Formación de películas	A	Salchichas y salami
Adhesión	C, A	Embutidos y carnes frías
Cohesión	H, A	Productos horneados, macarrones y sustitutos de carne
Elasticidad	A	Productos horneados y sustitutos de carne
Controlo del color		
Blanqueado	H	Pan
Oscurecimiento	H	Pan y derivados
Solubilidad	H, C, A	Bebidas fortificadas
Aeración	A	Productos batidos y confituras

H= harina, C = concentrado, A = aislado

(Badui D. Salvador, 2006 Química De Los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana, 4ª Ed, pág. 645.)

1.1.3 LA SOYA COMO ADITIVO EN LOS ALIMENTOS



La normatividad que rige la producción de estos alimentos estipula un intervalo permitido de dichos compuestos en algunos alimentos y su ausencia en otros, buscando con esto posibles adulteraciones. El precio final de un alimento está integrado por diversos costos, tales como materia prima, transformación, distribución, conservación, entre otros, en ocasiones se encuentra en el mercado productos cuyo valor total es por debajo del costo de la materia prima correspondiente, con lo que en dicho precio no se aprecia ese valor agregado, por lo que hace suponer la posible adición de aditivos, como es el caso de la proteína de soya, en cantidades superiores a las permitidas por ley, lo cual constituye un fraude para el consumidor y una violación a la normatividad vigente.

Dentro del rubro de las proteínas utilizadas como aditivos, la proteína de soya es probablemente la más empleada, ya que, aunque inicialmente la soya era utilizada para consumo animal, su uso se ha diversificado y hoy en día los subproductos de ésta leguminosa, tales como harina, concentrados y aislados, 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 como emulsificante, estabilizante, gelificante, viscosidad, textura y absorción de agua entre otras, que aportan a los alimentos en que se emplean.

ADITIVO.

Los aditivos alimentarios son sustancias que se añaden a los alimentos intencionadamente con el fin de modificar sus propiedades, técnicas de elaboración, conservación o mejorar su adaptación al uso a que estén destinados. En ningún caso tienen un papel enriquecedor del alimento. En aquellos casos en los que la sustancia añadida es eliminada, o la cantidad de ella que queda en el alimento no tiene función alguna, no se considera un aditivo sino un agente auxiliar de fabricación.

Se entiende por **aditivo alimentario** cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico



en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye “contaminantes” o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.³⁰

Según la legislación de la secretaria de salud “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)⁴³

Para efectos del presente trabajo, se considera aditivo alimentario a aquella sustancia que se añade a los alimentos y bebidas intencionalmente con el fin de modificar sus propiedades, conservación o mejora para el uso que estén destinados y está prohibido su uso para ocultar defectos de calidad.

Clasificación de los aditivos alimentarios.

- Sustancias que impiden las alteraciones químicas biológicas (antioxidantes, sinérgicos de antioxidantes y conservadores).
- Razones económicas y sociales
- Razones Psicológicas y tecnológicas
- Razones nutricionales
- Sustancias estabilizadoras de las características físicas (emulsificantes, espesantes, gelificantes, antiespumantes, antiapelmazantes, humectantes antiaglutinantes, reguladores de pH) correctoras de las cualidades plásticas. (mejoradores de la panificación, correctores de la vinificación, reguladores de la maduración).



- Sustancias modificadoras de los caracteres organolépticos (colorantes, potenciadores del sabor, edulcorantes artificiales, aromas).⁵²

Deben emplearse bajo las condiciones ya mencionadas, sin rebasar los niveles permitidos por ley.

Las principales funciones de los aditivos alimentarios son:

- asegurar la inocuidad del alimento
- contribuir a la conservación
- hacer posible la disponibilidad de alimentos fuera de temporada
- aumentar o mantener el valor nutritivo
- potenciar la aceptación del consumidor
- facilitar la preparación del alimento.⁵²

1.1.4 NORMATIVIDAD DE LOS ADITIVOS

El uso generalizado que la industria alimentaria actualmente hace de tipo de sustancias obliga a establecer mecanismos de control que regulen su correcta utilización y que permitan verificar sus resultados. Para que una sustancia sea admitida como aditivo debe estar bien caracterizada químicamente y no debe superar los controles toxicológicos establecidos por parte de los organismos sanitarios correspondientes. Asimismo, ha de demostrarse la necesidad de su aplicación de modo tal que su uso suponga ventajas tecnológicas y beneficios para el consumidor. Los motivos por los que deberá establecerse dicha necesidad son:¹

- Conservar la calidad nutritiva de un alimento.
- Proporcionar alimentos con destino a un grupo de consumidores con necesidades dietéticas especiales.



- Aumentar la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades organolépticas.
- Favorecer los procesos de fabricación, transformación o almacenado de un alimento, siempre que no se enmascare materias primas defectuosas o prácticas de fabricación inadecuadas.⁵¹

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.¹

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:⁴³

“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)⁴³

“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”.⁴³



Además de que en la industria alimentaria se deben seguir un conjunto de normas y actividades, conocidas como Buenas Prácticas de Manufactura, que garanticen que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas, evitando así posibles fraudes.

Es frecuente encontrar en el mercado productos que presentan en su formulación un excedente, no reportado, en lo que a aditivos se refiere, esto constituye una violación a la legislación y un engaño para el consumidor que las autoridades deben controlar. Aditivos tales como las proteínas y sus derivados, confieren al alimento características deseables a un menor costo y es común que se empleen a concentraciones que rebasan los permitidos por la ley.

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 entre estos:²

1.2. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA DETECCIÓN DE SOYA EN ALIMENTOS

1.2.1 ELECTROFORÉISIS



El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular.¹⁵

Una electroforesis desnaturalizante o SDS-PAGE(por sus siglas en inglés "*polyacrylamide gel electrophoresis*"), la más común, rápida, sensible y capaz de dar un alto grado de resolución empleada en el presente trabajo, es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDSPAGE), es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1.4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.^{3, 8, 10, 15, 20, 22, 28, 38}

En la figura 1 se muestra una representación de cómo se da la separación de proteínas según su tamaño aplicando una corriente eléctrica en geles de acril-bisacrilamida.

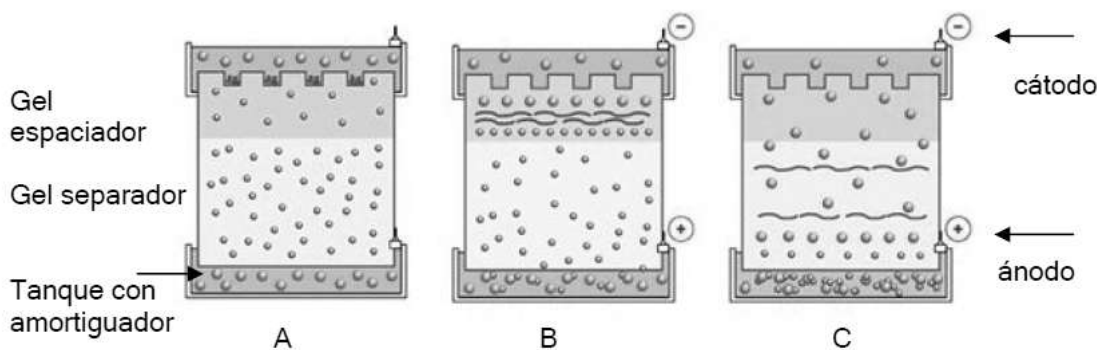


Figura 1. Representación de la separación de proteínas de acuerdo al tamaño y diferencia de peso molecular al aplicar una corriente eléctrica en un tiempo determinado (electroforesis en gel de acril- bisacrilamida). A. Los geles espaciador y separador se encuentran a diferentes concentraciones. En el gel espaciador se forman los pocillos donde se deposita la muestra a correr, los cuales se encuentran sumergidos en una solución amortiguadora. B. Con la aplicación del voltaje constante las proteínas de la muestra entran al gel espaciador, acomodándose para entrar al gel separador. C. Separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular.⁵³

1.2.1.1 ELECTROFORÉISIS EN GEL DE ACRIL-BISACRILAMIDA

Es un método analítico, de alto poder resolutivo, que combina la migración de un campo eléctrico y el tamizado molecular a través del gel de corrida.^{39, 42}

Esta modalidad electroforética se utiliza para conseguir las máximas resoluciones. Consiste en concentrar una fina capa de muestra (1-2 mm de espesor) de partida convirtiéndola en una zona ultra fina (de 1 a 100 μm de espesor). Debe hacerse notar que el sistema de geles se prepara en una columna vertical y consiste en tres regiones distintas: la superior o gel de muestra, la intermedia o gel espaciador y la inferior o gel separador. El gel espaciador y el que contiene la muestra están menos concentrados (tienen mayor tamaño de poro) que el gel separador y se preparan en una solución amortiguadora de baja fuerza iónica y a distintos pH.²³

El tamaño de poro de los geles superior e intermedio permite una mayor movilidad de las partículas de la muestra que el gel separador. En el gel separador, la movilidad está restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros del gel. Así, si se requiere resolver componentes de



muy alto PM, se utilizan geles al 5% o al 7,5%, mientras que los geles de poro menor, ej. 15-20% son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas.
23, 53

Los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de ~10.000-90.000 Daltons. Por otro lado, la baja fuerza iónica crea una resistencia eléctrica mayor, de modo que el campo eléctrico (V/cm) es mayor en las regiones superiores que en la inferior, con lo que se contribuye a aumentar la movilidad en los geles de la muestra y espaciador frente al gel separador. Los valores relativos del pH tienen un efecto semejante sobre la movilidad. La rápida penetración de la muestra a través de los geles superiores permite que ésta se acumule en el límite entre el gel espaciador y el separador. Sin embargo, los diferentes componentes, además de acumularse se apilan por orden de movilidades.⁵³

Por otra parte, mientras las moléculas avanzan a través del gel separador, las diversas zonas se separan de acuerdo con su movilidad. Al final del proceso se extrae el gel del tubo de vidrio y se procede, por diversos métodos, a la identificación de las zonas.

Colorantes

Tinción con azul de coomassie

La tinción con azul de Coomassie permite detectar concentraciones de hasta 0.2 a 0.6 μg de proteína, y es cuantitativo (lineal) hasta 15 a 20 μg . Se emplea habitualmente en soluciones de metanol-acético y se destiñe por difusión en soluciones de isopropanol-acético.⁵⁴

El Azul de Coomassie es un colorante con una sensibilidad de 1 g/mm^2 . Se utiliza comúnmente para teñir intensamente fijándose a las bandas de proteínas pero no al gel. El método de tinción es adecuado para todas las proteínas aunque la cantidad de colorante ligado puede variar de una proteína a otra en una forma



que parece estar relacionada con la proporción de aminoácidos básicos en la proteína.^{19, 33}

Tinción con plata

Es una alternativa a la tinción rutinaria de geles de proteínas (así como de ácidos nucleicos y lipopolisacáridos) por su facilidad de uso y su gran sensibilidad (entre 50 y 100 veces más sensible que la tinción con Azul de Coomasie) sin embargo es de una toxicidad alta.^{21, 54}

Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica.

Algunas características importantes de la electroforesis en geles de acril-bisacrilamida son:

- Los geles suprimen las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura, lo cual es un requerimiento para una separación más efectiva.
- Los geles sirven de tamices moleculares que favorecen la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través de él, mientras que las moléculas mucho mayores que los poros del gel permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaños intermedios se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad.
- Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como iniciador el ión persulfato (S_2O_8) que se añade en forma de persulfato amónico. En algunas situaciones, como por ejemplo en el isoelectroenfoco en el que la presencia de persulfato puede interferir con la electroforesis se emplean riboflavina y TEMED.



- Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.
- La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).
- La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poli-acrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.
- El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.⁵⁴

1.2.1.2. PARÁMETROS DE CONTROL EN LA ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRIL-BISACRILAMIDA

En el método de electroforesis se pueden presentar variaciones debidas a la falta de control de algunos parámetros. Uno de ellos y quizás el más importante, es el cuidado que se debe de tener con los reactivos que se van a utilizar para elaborar los geles, ya que pequeñas variaciones en pH o presencia de contaminantes pueden ocasionar diversos problemas como una deficiente polimerización del gel ocasionando una mala migración de la proteína a lo largo de la electroforésis.

A continuación se enlistan algunos de los factores de control en la electroforésis.

a) PUREZA DE LOS REACTIVOS

La pureza de los reactivos es importante puesto que de esto depende en gran parte de la eficiente polimerización del gel acril-bisacrilamida, dando como resultado geles poco uniformes y propiciando problemas a lo largo de la electroforesis.³¹



1.- **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.³¹

2.- **Ácido Acrílico:** Este componente puede co-polimerizar con la acrilamida y biscacrilamida 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.³¹

3.- **Poliacrilamida lineal:** Este componente, que se produce como consecuencia de una auto polimerización 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.³¹

4.- **Contaminantes iónicos:** Éstos incluyen tanto inhibidores como aceleradores de la polimerización.³¹

5.- **Iniciadores de reacción:** La solución TEMED es 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.³¹



b) TIPO DE INICIADOR Y CONCENTRACIÓN

El tipo de iniciador a emplear es importante y su concentración son factores importantes a considerar, en este sentido se debe prestar atención a la concentración del componente iniciador que se agrega, ya que de éste dependerán las características finales del gel obtenido. Por ejemplo, si se adiciona TEMED y persulfato de amonio en exceso, da como resultado un descenso en el tamaño promedio de las cadenas del polímero que se obtengan, 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 visualizaría la gelificación, dando la impresión de que no se llevó a cabo la polimerización.³¹

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 15-30 minutos después de haber adicionado los compuestos iniciadores. Si dicho fenómeno toma más de 30 minutos, los efectos inhibidores del oxígeno comenzarán a hacerse presentes.³¹

c) 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 entre 23 y 25 °C, debido a que en este rango de temperaturas 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.³¹

d) OXÍGENO

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.³¹

FACTORES QUE AFECTAN LA MIGRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

Los principales factores que afectan la migración de las proteínas durante la electroforesis son las siguientes:

Fuerzas del campo eléctrico:

Es la fuerza que determina el movimiento o migración de la proteína a través del campo eléctrico. Su unidad de medida es voltios.⁴⁹



Temperatura:

Depende básicamente del voltaje de la electroforesis, la concentración de las sales del buffer y del pH. Un aumento en la temperatura del buffer genera el efecto "sonrisa" o smiling.¹⁵

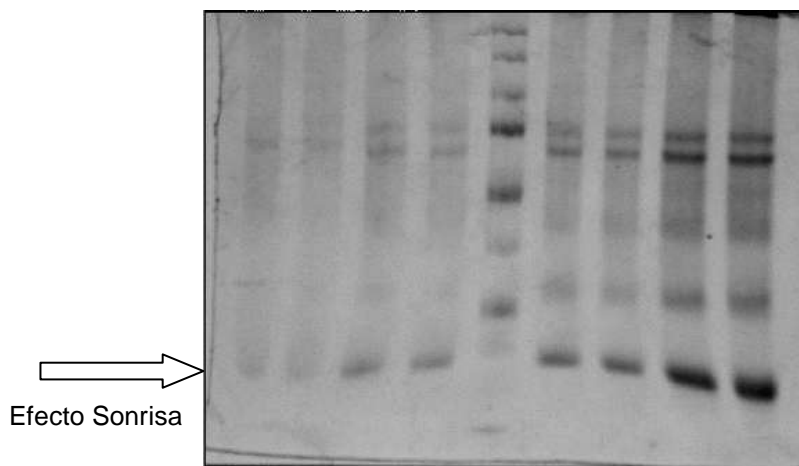


Figura 2. Gel de electroforesis en SDS-PAGE para proteínas mostrando el efecto "sonrisa" o smiling.

<http://www.cas.vanderbit.edu/bsci11a/protein-electro7protein-electro.htm>

Carga neta de la molécula:

La presencia de aminoácidos con grupos carga positiva y negativa otorga a una proteína una carga neta totalmente diferente a otra, compuesta por diferentes grupos de aminoácidos. Debido a que en la electroforesis, las muestras son sometidas a un determinado campo eléctrico, la migración de las proteínas en gel dependerá básicamente de su carga y no de su peso molecular. Para evitar este efecto, es importante igualar la carga de todas las proteínas aprovechando sus propiedades anfotéricas. En este sentido, el SDS evita el efecto de diferencias de carga entre las proteínas, a fin de favorecer la separación de esta únicamente por su peso molecular.⁴⁹



Tamaño y forma de la molécula:

Las proteínas tienen características moleculares que actúan como factores intrínsecos durante la electroforesis alterando su migración y generando bandas de diferente tamaño, y que no necesariamente van acorde al peso molecular real del polipéptido. Ciertas modificaciones postraduccionales, multimerización y formación de complejos con otro tipo de moléculas generan modificaciones en el tamaño de la proteína dando pesos moleculares aparentes en el momento del análisis.⁴⁹

1.2.1.3. Métodos de cuantificación de proteínas

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En la cromatografía se separan los componentes de las mezclas a medida que son transportadas por una fase fluida móvil a través de una fase estacionaria sólida o líquida, la separación de las moléculas se logra porque la movilidad de cada soluto depende de un equilibrio en la distribución entre la fase móvil y la estacionaria, y esta separación se puede realizar en función de sus cargas, masas, tamaños moleculares, la polaridad de sus enlaces y sus potenciales redox.

HPLC es una de las Técnicas del Laboratorio usadas como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. En esta técnica analítica, los pequeños problemas que presenta a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema.⁵⁵

Software Kodak Edas 120

El Software Kodak Edas 120 proporciona a los usuarios la documentación de geles y análisis de electroforesis. Tiene la capacidad de tomar una foto del gel de electroforesis, con vista previa en la pantalla en cuestión de segundos, con procesamiento y análisis de la imagen, y prepararla para su publicación o presentación con el ajuste de brillo /contraste, rotación y recorte. Posteriormente,



los usuarios tienen la opción de almacenar los datos y la imagen en el ordenador o la cámara, la importación en otro documento para su presentación o publicación. El EDAS 120 se compone de la cámara Kodak DC120 Cámara digital, Kodak 1D Análisis de Imagen Software versión Windows 1D v 2.0.2 y accesorios diseñados como una campana aislante de luz, base sostenedora delimitante del gel.²⁵

El componente clave del sistema EDAS 120 Kodak DC120 es la cámara digital. Capaz de capturar imágenes digitales con una resolución de más de 1 millón de píxeles. La resolución y la sensibilidad de la EDAS 120 cumplen con los beneficios que se deseen adquirir para el análisis de electroforesis en geles y ADN.

Proporciona a los usuarios mediciones de masa y peso molecular, y los datos de la intensidad y la región de interés de medición.²⁵

Cabe mencionar que el sistema descrito anteriormente y utilizado durante la experimentación del presente trabajo presenta limitantes, como la poca sensibilidad para detectar intensidad de color tenues, esto debido a que es una versión no muy reciente, sin embargo se logró un aprovechamiento de este en el análisis de los perfiles electroforéticos para llegar a los resultados obtenidos.

1.3. VALIDACIÓN

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 adulteraciones o alteraciones a lo largo de su proceso de manufactura. No solo basta con tener métodos de análisis sino que los resultados reportados a partir de estos deben de ser confiables, razón por la cual deben de ser sujetos de un proceso de validación.^{48, 51}



La validación de métodos es el proceso de establecer las características de desempeño y las limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden cambiar esas características, y en qué medida. Como alternativa, establece que es el proceso de verificar que un método es apropiado para un propósito dado, es decir, para usarse en la solución de un problema analítico particular.^{11, 12, 49}

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, dan como resultado de la obtención de un producto cuya calidad cumple con las especificaciones establecidas en la legislación vigente.⁶

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”.¹²

La aplicación de esta representa una importante inversión en la industria, debido a que mejora por un lado la productividad reduciendo costos de producción al mismo tiempo que asegura la confiabilidad del método o proceso.⁶

Se considera que un método analítico debe de 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.⁶

1.3.1. TIPOS DE VALIDACIÓN



Existen tres tipos de validación que son:

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. ⁶

Este tipo de validación involucra una secuencia de pasos que se enlistan a continuación:

- **Calificación de la instalación (IQ):** Se basa en el correcto funcionamiento de los equipos y materiales que se utilizan en el método.
- **Calificación del desempeño (OQ):** Se basa en el correcto funcionamiento de los equipos y materiales que se utilizan en el método.
- **Calificación del desempeño (PQ):** 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 determinadas²⁶

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 basado en la revisión y análisis de la información histórica acerca del producto. Esta validación se lleva a cabo con procesos establecidos con anterioridad. ^{6, 26}

Es común que al momento de validar un método se apliquen a este todas las pruebas estadísticas que se sugieren en las guías de validación, lo cual puede dar



como consecuencia una mala toma de decisiones o un retraso por aplicar técnicas estadísticas innecesarias, con el fin de evitar lo anterior es importante ajustar el diseño de validación y evaluación de resultados al proceso o método al que va a ser aplicado.

Para lograr esto, la USP (United States Pharmacopeia) establece tres categorías para clasificar a los métodos analíticos y sus pruebas estadísticas correspondientes.⁴⁴

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.⁴⁴

La clasificación de los métodos analíticos según la USP, se muestra en la tabla número 6.

TABLA 6. Clasificación de los métodos analíticos (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

*Pudiera ser requerido, dependiendo de la naturaleza de la prueba.

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

Swartz, Michael y Krull, Ira S. (1997). "Analytical Method Development And Validation". Ed. Marcel Dekker. U.S.A. Pag. 69

VALIDACIÓN CONCURRENTE



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.

1.3.2. DESARROLLO DEL MÉTODO DE VALIDACIÓN.

El paso inicial de la validación 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 cual 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. ^{18, 44}

En la etapa de validación, se deben de 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, de esto depende la aceptación por otras personas relacionadas al campo de estudios que concierne a dicho procedimiento. Las propuestas de validación se enlistan a continuación. ⁴⁴

Método del cero oculto: esta propuesta involucra a un solo analista, el cual utiliza el método con muestra de concentraciones o nivel conocido para de esta forma demostrar la recuperación, exactitud y precisión. Este método es rápido, sencillo y como primera aproximación o demostración de la validación eficaz con un mínimo de tiempo, personal y costo, resulta una opción viable para iniciar todo el proceso de validación.

Método oculto simple: esta técnica involucra a dos analistas, uno de los cuales prepara diversas muestras a diferentes niveles desconocidas para el otro investigador. Este 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. Se considera que esta prueba es mucho más confiable 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. Se considera que esta 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.⁴⁴

Una vez que se realizaron las repeticiones pertinentes de la técnica que está siendo validada, el siguiente paso a seguir es dar la aplicación de 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 y así poder establecer las pruebas que se requieren desarrollar.

En la tabla 7 se muestran las técnicas y herramientas que se aplican en la validación tomando en cuenta que para la validación del método de electroforesis en geles de acril-bisacrilamida se considera un método analítico de categoría 1. ^{11, 14, 16}

Tabla 7. Técnicas y herramientas estadísticas aplicadas a la validación.

TÉCNICA DE VALIDACIÓN	DEFINICIÓN	HERRAMIENTAS ESTADISTICAS
SELECTIBILIDAD	Se define como la capacidad de un método para identificar un analito específico aún 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.	Prueba de hipótesis
INTERVALO	Se define así al grupo de concentraciones dentro del cual se presentan valores aceptables de precisión, exactitud y linealidad.	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	Análisis de varianza



	obtiene a partir de la repetición del método con varias muestras preparadas de la forma en que el método lo señala.	
--	---	--

(Torralba P. N. (2004). "Validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida". Tesis. FES Cuautitlan. UNAM pg. 40, 41





2. DESARROLLO METODOLÓGICO

2.1 Objetivos

OBJETIVO GENERAL:

Validar la metodología de electroforesis en geles de acril-bisacrilamida (al 12%) a muestras de aislado de soya utilizando un software comercial (Kodak Edas 120), que permita cuantificar el contenido de soya en las bandas de los geles.

OBJETIVO PARTICULAR 1:

Corroborar la presencia de la banda característica de soya (inhibidor de tripsina) en 8kDa.

OBJETIVO PARTICULAR 2:

Leer las concentraciones 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya con el software Kodak Edas 120 y elaborar la curva estándar.

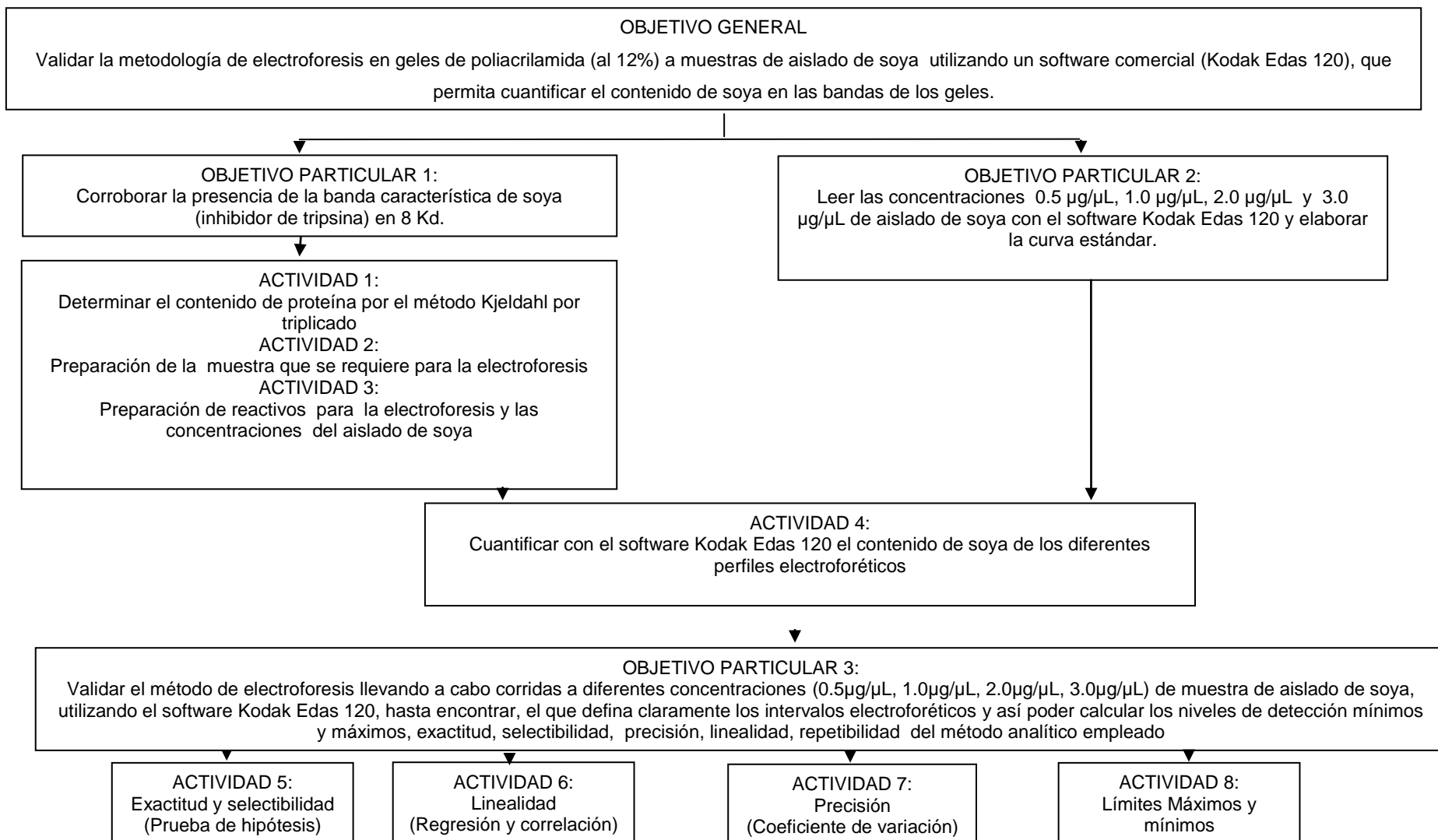
OBJETIVO PARTICULAR 3:

Validar el método de electroforesis llevando a cabo corridas a diferentes concentraciones (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de muestra de aislado de soya, hasta encontrar, el que defina claramente los intervalos electroforéticos y así poder calcular los niveles de detección mínimos y máximos, exactitud, selectividad, precisión, linealidad y repetibilidad del método analítico empleado.



3. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. Cuadro Metodológico





2.3. Descripción del cuadro metodológico.

Se muestra en el diagrama anterior la metodología que se siguió para la realización del presente trabajo, el cual consta de un objetivo general y tres objetivos particulares estos últimos cuentan con actividades previas para dar una solución al objetivo planteado al inicio.

El objetivo general se refiere a la validación de la metodología de electroforesis en geles de acril-bisacrilamida en muestras de aislado de soya utilizando un software comercial (kodak Edas 120) que permita cuantificar el contenido de soya en las bandas de los geles.

Para poder cumplir con lo anterior se parte del objetivo particular 1, donde se corroboró la presencia de la banda característica de soya (8kDa), para esto se llevó a cabo previamente las siguientes actividades:

ACTIVIDAD 1: Determinar el contenido de proteína por el método Kjeldahl por triplicado

ACTIVIDAD 2: Preparación de la muestra que se requiere para la electroforesis

ACTIVIDAD 3: Preparación de reactivos para la electroforesis y las concentraciones del aislado de soya.

El siguiente paso en la metodología corresponde al objetivo particular número 2, en el cual se leyeron las concentraciones 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya con el software Kodak Edas 120 y se elaboró la curva estándar, la cual ayudará a cuantificar el contenido de soya presente en los geles de acril-bisacrilamida, esto corresponde a la actividad 4.

Con lo anterior se llevó a cabo el objetivo particular 3, en el cual se realizaron, de acuerdo con la bibliografía, 59 corridas de muestras de la curva estándar de aislado de soya a diferentes concentraciones (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 3.0



$\mu\text{g}/\mu\text{L}$) bajo las mismas condiciones de trabajo para cada una de estas, para poder leerlos con la ayuda del software Kodak Edas 120.²⁷

Una vez que se cuenta con los datos necesarios, que se obtuvieron del objetivo particular 3 y de la actividad 4 se busca utilizar dichos valores para efectuar, con ayuda del software MINITAB, las diferentes pruebas estadísticas que se requieren para poder validar el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida. Entre las pruebas estadísticas aplicadas estuvieron la prueba de hipótesis, coeficiente de variación, regresión lineal, correlación y coeficiente de variación, para que, con estos resultados se pueda determinar la exactitud, selectibilidad, precisión, linealidad, repetibilidad, máximos y mínimos del método analítico.

Los resultados de todas las actividades que se llevaron a cabo, se analizaron para así poder llegar a las Conclusiones y Recomendaciones sobre el método de electroforesis para que con esto se determine que tan factible resulta este método en geles de acril-bisacrilamida para la detección y cuantificación de soya en diferentes matrices de alimentos.



2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 ESPECIFICACIÓN DE LA MUESTRA.

La muestra que se utilizó durante la experimentación en el presente trabajo, fue un aislado de soya, proporcionada por la empresa “Food Proteins, Corporation S.A de C.V.”¹³

Descripción del producto

El SUPRO 500E es una proteína Aislado de soya que provee textura y estabilidad a una gran variedad de sistemas cárnicos como es el caso de los productos emulsionados. El SUPRO 500E se hidrata rápidamente y forma emulsiones estables al calor, sus características, se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8.- Composición química del aislado de soya

Composición (%)	
Proteína	90.0 %
Humedad	6.0 %
Grasa	1.0 %
Cenizas	4.5 %
Sodio	1.2 %

“Food Proteins, Corporation S.A de C.V.” Ficha técnica SUPRO 500E Proteína aislado de soya.

2.4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

Determinación de proteínas con el método micro-Kjeldahl.

Durante la experimentación el aislado de soya fue sometido, en primera instancia, a una cuantificación de su contenido proteico mediante el método micro-Kjeldahl (el cual es la técnica oficial en lo que determinación de nitrógeno total en alimentos se refiere, por lo que se incluye en métodos oficiales) que 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 sulfato de sodio anhidro que tiene como función reducir el nitrógeno de la muestra hasta amoníaco, 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 amoníaco, mismo que es recolectado en una cantidad estándar de ácido bórico al 4% y finalmente se titula con ácido clorhídrico 0.01N para poder 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 cuyos resultados se muestran en la tabla 10 (pag.47)^{24,35, 40}

2.4.3. PERFILES ELECTROFORÉTICOS.

Debido a que se utilizó como muestra un aislado de soya, el perfil electroforético que se busca en cada una de las repeticiones que se efectuarán es el que corresponde al inhibidor de tripsina BOWMAN-BIRK, el cual, por bibliografía, se sabe que es característico de la soya, es menos lábil al calor (cuenta con 7 puentes disulfuro) y en el tratamiento térmico queda una muy pequeña acción residual, y presenta un peso molecular aproximado de 8 kDa, por lo que la banda de interés en cada gel obtenido será la que se aproxime a dicho valor.⁴⁵

Para la corroboración de la banda que corresponde al inhibidor de tripsina en la muestra de aislado de soya, es necesario realizar una comparación entre la muestra problema y una muestra de pesos moleculares conocidos (marcador de pesos moleculares) para posteriormente elaborar una curva patrón la cual 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, disponible en el laboratorio, de marca BioRad (Precision Plus Protein catálogo # 161-0373, con



tres bandas de referencia de 25kDa, 50kDa y 75kDa, que se muestran de un azul más intenso que las otras bandas) dentro del marcador la banda de 10 kDa es la que se tomo como referencia resultando útil para efectuar la identificación de la banda de interés.

En la figura 3 se muestra la imagen del bandeado del marcador de peso molecular de la marca BioRad, el cual se utilizó en la experimentación del método de electroforesis.

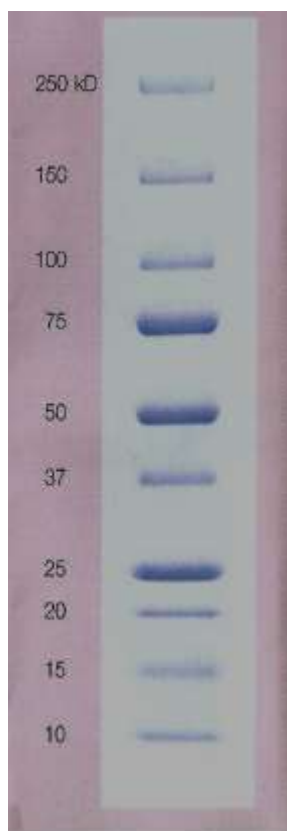


FIGURA 3. Marcador de peso molecular de marca Bio-rad

**TABLA 9.** Marcador de pesos moleculares

POLIPEPTIDO	PESO MOLECULAR (kDa)
Miosina	212
α 2-Macroglobulina	180
β -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
α -Lactoalbumina (Leche de Bovino)	14.4
Lisozima (Huevo Blanco)	14.3
Citocromo C	11.7
Aprotinina	6.5
Insulina B	3.5
Bacitrasina	1.45

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

En la tabla 9 se muestran los pesos moleculares en kilodaltones (kDa) correspondientes a ciertos polipéptidos presentes en un marcador de pesos moleculares que se emplean en la electroforesis

2.4.3.1 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Para llevar a cabo la electroforesis en gel de acril-bisacrilamida se requiere de la preparación de ciertos reactivos que se van a utilizar, estos deben ser preparados con suma atención y cuidado. Los cuales son:



- Solución amortiguadora pH 8.8
- Solución amortiguadora pH 6.8
- Solución amortiguadora 10x
- Acril-bisacrilamida al 30%
- Persulfato de amonio
- Solución amortiguadora de muestra
- Solución teñidora
- Solución desteñidora

El modo de preparación se describe en el ANEXO A.^{34, 49}

2.4.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En los tubos Eppendorf se colocan 50 μ L de la dilución que conforma la muestra de aislado de soya y 50 μ L de la solución amortiguadora de muestra (ANEXO A). Este procedimiento se repite para cada una de las muestras que van a ser analizadas en la validación, cuyas concentraciones son 0.5 μ g/ μ L, 1.0 μ g/ μ L, 2.0 μ g/ μ L, 3.0 μ g/ μ L. posteriormente, dichas muestras se someten al calor a temperatura de ebullición en baño maría durante 5min. Transcurrido este tiempo se toman 15 μ l de muestra y se colocan en los carriles del gel con una micro pipeta automática. El procedimiento completo se describe en el ANEXO E.⁴⁹

La secuencia de cálculo y procedimiento para la preparación de las diluciones correspondientes a las concentraciones de 0.5 μ g/ μ L, 1.0 μ g/ μ L, 2.0 μ g/ μ L y 3.0 μ g/ μ L se desglosa en el ANEXO E.⁴⁵

2.4.3.3 MONTAJE DE LA CÁMARA

Una vez que se cuenta con los reactivos necesarios para desarrollar la técnica, el paso a seguir consiste en la preparación de los geles y su respectivo montaje en la cámara de electroforesis, cuyo funcionamiento se detalla en el ANEXO C.⁴⁹



2.4.3.4 FORMULACIÓN DE LOS GELES DE ACRIL-BISACRILAMIDA.

Para lograr una mejor separación y visualización de las bandas electroforéticas, en la fase experimental es importante mencionar que la preparación de ambos geles (separador y concentrador) se debe llevar a cabo en condiciones de temperatura entre 20 y 25 °C esto con el fin de tener una óptima polimerización y la subsecuente gelificación. El modo de preparación de estos geles se describe en el ANEXO D.⁴⁹





3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados de la determinación de proteína por la técnica de micro-kjeldahl

TABLA 10: Contenido de proteína en la muestra aislado de soya determinada por micro-kjeldahl

Muestra	Datos (%)	X	S	C.V.
1	88.37	90.07	1.47	1.63
2	90.94			
3	90.91			

* = UTILIZANDO FACTOR DE CONVERSIÓN DE 6.25

X = Promedio

S = Desviación estándar

C.V.= Coeficiente de variación

Como se puede observar en la tabla anterior después de realizar los cálculos por el método de Micro-Kjeldahl, se puede notar que el valor obtenido es el mismo que se reporta en la ficha técnica de dicho producto.

3. 2 Geles obtenidos de las corridas electroforéticas

En base a la metodología se realizaron las repeticiones (59) de las corridas electroforéticas, en las cuales se corrió paralelamente con la muestra de aislado de soya un marcador de pesos moleculares estándar comercial.



Las siguientes figuras corresponden a algunas de los geles obtenidos a lo largo de las repeticiones (ANEXO H)

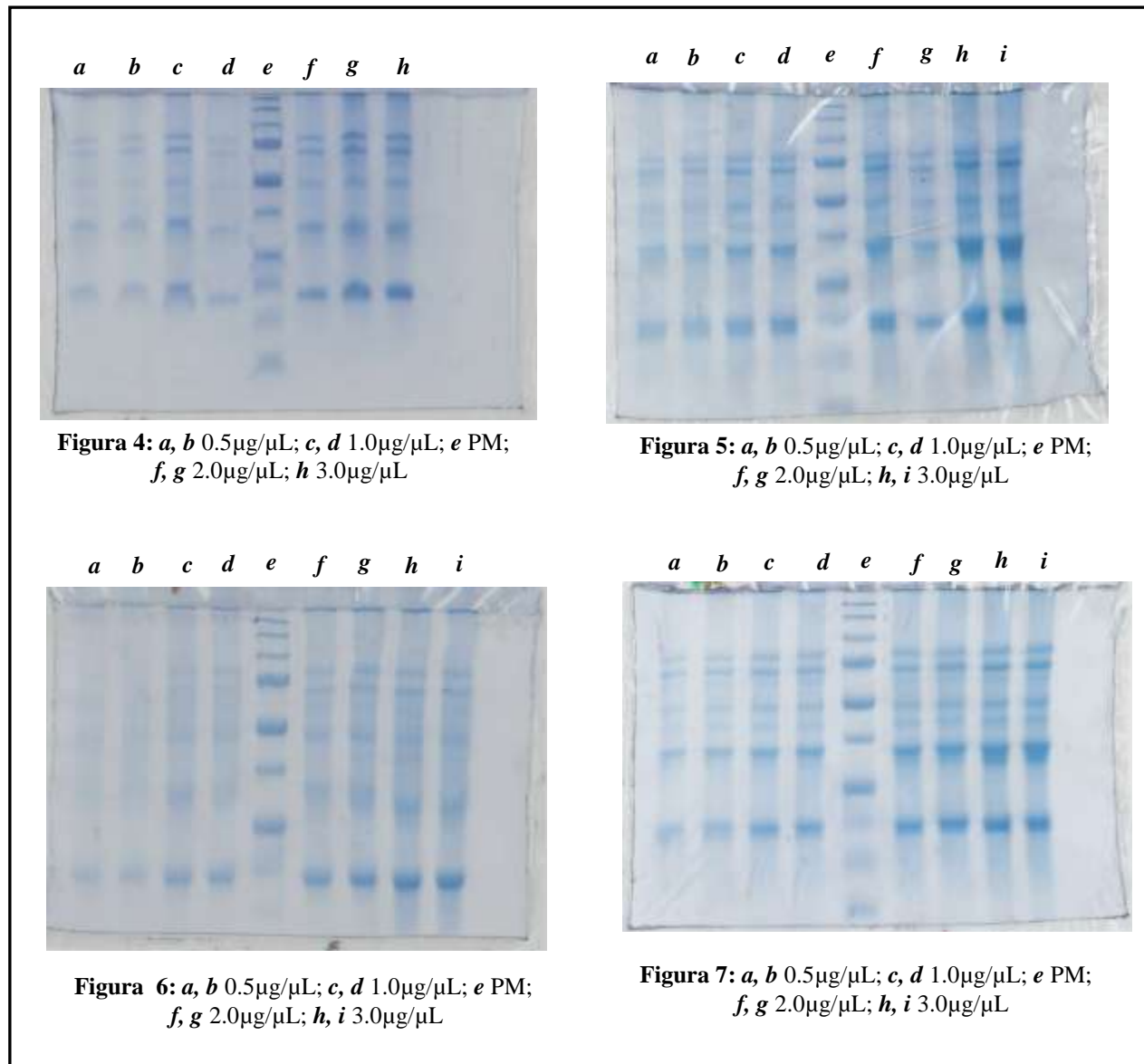


Figura 4-7: Geles obtenidos durante la experimentación

En las figuras anteriores se muestran algunos de los geles obtenidos durante las corridas electroforéticas realizadas a las concentraciones de aislado de soja de 0.5µg/µL, 1.0µg/µL, 2.0µg/µL y 3.0µg/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 cual resulta positivo, toda vez que esto hace posible la correcta interpretación de los geles, ya que de lo contrario, el programa que se utiliza 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 bandeo correspondiente a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ presenta una menor intensidad en la coloración que el de la concentración de 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y así continúa gradualmente hasta la concentración de 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En base a lo realizado en el método de electroforesis en geles de acril-bisacrilamida, con la ayuda del software Kodak Edas 120, se corroboró la presencia de la banda característica de aislado de soya con los resultados obtenidos de las concentraciones 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ donde se puede observar los niveles máximos y mínimos detectados por el software en las concentraciones mencionadas. Estos resultados se muestran en la tabla 11.

Debido al tratamiento de extracción industrial para la obtención de los subproductos de soya, se observó en los geles el perfil electroforético del aislado de soya con un rango de 8-50 kDa que corresponden a las fracciones de proteínas, dentro del rango se encuentra la banda de interés la cual corresponde al inhibidor de tripsina.

Los inhibidores de tripsina son generalmente proteínas de bajo peso molecular, estos inhibidores no son exclusivos de esta leguminosa ya que también se han identificado en otras y diversos cereales, tubérculos, frutas y verduras; sin embargo los inhibidores de la soya son característicos de la misma, siendo los más conocidos Kunitz (21.5 kDa) y de Bowman-Birk (8kDa). La literatura menciona que el Bowman-Birk es más resistente a la desnaturalización por calor (<80°C) que el Kunitz, por lo que en el perfil electroforético obtenido en este estudio la



banda de interés en cada gel obtenido fue la que se aproximó al valor de peso molecular del inhibidor de tripsina Bowman-Birk^{1,4,56,57}

TABLA 11. RESULTADOS DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES

Conc 0.5µg/µl	Conc 1.0µg/µl	Conc 2.0µg/µl	Conc 3.0µg/µl
0.5083	1.071	2.031	2.918
0.4998	0.9997	2.004	2.906
0.4659	0.9307	1.921	3.036
0.4671	0.9342	1.922	2.984
0.5013	1.003	2.002	3.004
0.5	0.9934	2.002	3.031
0.4585	1.139	1.791	2.802
0.4714	1.158	1.927	2.994
0.4712	1.065	2.257	3.658
0.5926	1.04	2.401	3.166
0.4342	0.9427	2.302	2.868
0.4497	0.9428	2.426	2.948
0.4506	0.9851	2.567	2.967
0.4307	1.019	2.398	3.424
0.5689	0.9419	1.882	2.945
0.4043	0.9244	1.882	3.904
0.4803	0.9593	2.261	3.467
0.4804	0.9597	2.246	2.805
0.584	1.004	2.59	2.806
0.5784	1.042	2.368	3.533
0.4371	1.363	1.917	3.511
0.4271	0.9213	1.997	3.563
0.4342	0.9742	1.168	3.914
0.4462	1.142	2.114	3.16
0.407	1.0691	2.091	3.128
0.5304	1.151	2.485	3.685
0.5649	0.9576	1.804	3.27
0.5045	0.9558	1.916	3.727
0.515	1.118	2.247	3.454
0.5182	1.124	2.237	3.038
0.5268	0.9592	2.222	3.012
0.5259	0.9784	2.095	3.04
0.5279	0.9742	1.899	3.187
0.5285	1.043	1.909	3.555



0.5288	1.08	2.266	3.794
0.5239	1.064	2.151	2.843
0.5252	1.131	1.793	3.037
0.5268	1.082	1.877	2.836
0.5101	1.139	2.407	2.82
0.512	1.2	2.706	3.233
0.4333	1.013	2.267	3.371
0.4226	1.094	2.106	2.902
0.4267	1.076	2.001	3.668
0.4028	1.063	2.366	3.363
0.3803	1.226	2.335	3.559
0.4777	1.057	2.374	3.456
0.4022	1.244	2.006	3.303
0.5101	1.159	2.38	3.242
0.412	1.184	1.932	2.798
0.3863	1.037	2.337	3.094
0.4719	1.2	2.309	3.118
0.4795	1.141	1.81	3.014
0.4252	1.131	1.975	3.122
0.4711	0.9908	2.031	3.86
0.4235	0.9911	2.02	2.958
0.4142	0.9861	2.056	2.681
0.4149	0.9868	2.047	3.253
0.4521	0.9819	2.131	3.058
0.4202	0.9948	2.045	3.357
X= 0.4753 ‡ Max.= 0.5926 Min.= 0.3803	X= 1.0515 ‡ Max.= 1.3630 Min.= 0.9210	X= 2.1188 ‡ Max.= 2.7060 Min.= 1.1680	X= 3.2059 ‡ Max.= 3.9140 Min.=2.6810

Una vez que se obtuvieron los resultados de la cantidad de masa correspondientes al aislado de soya presente en la muestra, con la ayuda del software Kodak Edas 120, a dichos valores se les aplicaron las pruebas estadísticas requeridas para evaluar cada uno de los parámetros que se determinan en la validación la cual se considera un método de categoría 1, el cual se refiere que es un método que identifica los componentes principales, que en este caso cuantifica el contenido de masa de soya que predomina en la banda con mayor definición de color en el perfil electroforético.⁴⁴



Estos parámetros se enlistan a continuación:

- Exactitud
- Intervalo de confianza
- Selectibilidad
- Linealidad
- Precisión
- Repetibilidad

Se empleó el software estadístico MINITAB, para la determinación de los parámetros anteriores. Las pruebas estadísticas se enlistan a continuación para cada parámetro:

Exactitud, selectividad e intervalo: Prueba de hipótesis

Linealidad: Regresión lineal y correlación de los valores obtenidos en las repeticiones

Precisión: Coeficiente de variación

Repetibilidad: Análisis de varianza (ANOVA)

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en la validación del método de electroforesis en geles de acril-bisacrilamida a las diferentes concentraciones, correspondientes a la media, desviación estándar, coeficiente de variación, mínimo, máximo y mediana.

TABLA 12. Resultados obtenidos de la validación a las diferentes concentraciones (0.5µg/µL, 1.0µg/µL, 2.0µg/µL y 3.0µg/µL)

Variable	N	Media	Desv. Est.	Coef. Var.	Mínimo	Mediana	Máximo
Conc. 0.5µg/µL	59	0.4753	0.0532	11.20	0.3803	0.4714	0.5926
Conc. 1.0µg/µL	59	1.0515	0.0945	8.99	0.9210	1.0400	1.3630
Conc. 2.0µg/µL	59	2.1188	0.2542	12.00	1.1680	2.0910	2.7060
Conc. 3.0µg/µL	59	3.2059	0.3210	10.01	2.6810	3.1220	3.9140



Como se puede observar en la tabla 12 los valores de la media obtenidos para las concentraciones de $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no presenta variación significativa, excepto a la concentración correspondiente a $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ debido a que en esta concentración la nitidez en el bandeo no es clara y el software Kodak Edas 120, no presenta la suficiente sensibilidad para detectar este tipo de cantidades, esto coincide con lo reportado por Toral Peña (2004), donde se llevó a cabo un estudio con diferentes concentraciones de soya ($0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0.2\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0.3\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$), confirmando que solo se pudo visualizar la banda tenue a concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$.⁴⁵

Por otro lado, los valores de desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos, indican que los valores son tan pequeños y no representan cambios drásticos en la validación del método de electroforesis

3.3 EXACTITUD, SELECTIBILIDAD E INTERVALO DE CONFIANZA.

Para la determinación de estos parámetros se utilizó una proposición estadística conocida como prueba de hipótesis la cual “indica afirmación o declaración que se hace acerca de la propiedad de una población”⁴⁶ para llevar a cabo dicha herramienta es necesario establecer ciertas declaraciones las cuales se conocen como hipótesis nula (H_0) e hipótesis alternativa (H_1).

Donde Hipótesis nula (H_0), es la afirmación sobre una o más características de poblaciones que al inicio se supone cierta.^{46, 49, 50}

Hipótesis alternativa (H_1), es la afirmación contradictoria a H_0 , y esta es la hipótesis del investigador.

Tomando en cuenta el objetivo experimental que se planteó, se establecen como hipótesis lo siguiente:



a	b	c	d
Ho: $\mu = 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$	Ho: $\mu = 1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$	Ho: $\mu = 2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$	Ho: $\mu = 3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$
H1: $\mu \neq 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$	H1: $\mu \neq 1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$	H1: $\mu \neq 2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$	H1: $\mu \neq 3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

a, b, c y d: muestran la hipótesis nula e hipótesis alternativa para las concentraciones de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente

En los incisos a, b, c, d, se muestran las hipótesis que se establecieron para determinar los parámetros de exactitud, selectividad e intervalo de confianza, las cuales indican que la hipótesis nula corresponde a cada una de las concentraciones propuestas (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y así también la hipótesis alternativa la cual indica que al menos alguno de los valores es diferente a lo propuesto.

Considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ se obtienen los resultados que se muestran en la tabla 11.

TABLA 13. Resultados obtenidos correspondientes a la prueba de hipótesis

Concentración de la muestra	Media	Desv. Est.(S)	Int. De Confianza (95%)
0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.4753	0.0532	0.4617 - 0.4888
1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1.0515	0.0945	1.0274 - 1.0756
2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	2.1188	0.2542	2.0539 - 2.1837
3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	3.2059	0.3210	3.1240 - 3.2878

En la tabla 13 se presentan los valores correspondientes a la media, desviación estándar e intervalo de confianza para las distintas concentraciones de muestra de aislado de soya que se utilizaron en la experimentación.

Como se muestra en esta, los valores de la media obtenida en las diferentes concentraciones no presentan diferencia significativa, al mismo tiempo cada uno de estos valores se encuentran cercanos al valor promedio a la hipótesis alternativa, la cual indica que al menos un valor es diferente al establecido, esto se observa en la tabla 11 donde se indican los valores obtenidos durante la



experimentación del método de electroforesis, sin embargo la mayoría de los resultados se encuentran cercanos al valor promedio.

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.^{11,14, 16}

Los resultados obtenidos son indicativos de la exactitud que desarrolla el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida ya que como se observa en la tabla 11, los valores de las medias obtenidos a las diferentes concentraciones son cercanos al valor establecido (0.5µg/µL, 1.0µg/µL, 2.0µg/µL y 3.0µg/µL).

Por otro lado 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 los datos correspondientes al contenido de masa obtenidos en las distintas concentraciones, contienen el valor de la media.⁴⁵

Dentro de la validación la prueba de hipótesis tiene la finalidad de evaluar la selectibilidad, exactitud y rango que se desarrolla en un método analítico. En este caso, debido a la sensibilidad que presenta el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida, es utilizado como un método de separación debido a que es capaz de realizar la identificación de las diferentes moléculas de una misma muestra de acuerdo al peso molecular que posee y es ahí en donde se involucra la selectibilidad del método,⁴⁵ una vez que se conoce el peso molecular de la muestra de interés, es posible identificar en el gel de acril-bisacrilamida el perfil electroforético del aislado de soya con la banda que se ajusta al peso molecular que posee la muestra que está siendo estudiada.^{1,56,57} que en este estudio fue de 8kDa (inhibidor de tripsina).

Lo anterior se puede demostrar en las siguientes figuras (3, 4, 5 y 6) de geles de acril-bisacrilamida donde se muestran los perfiles electroforéticos a las diferentes



concentraciones manejadas durante la experimentación, de igual manera Toral (2004) establece que independientemente de la cantidad de veces que se repita una corrida a cualquiera de las concentraciones estudiadas ($0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$) la identificación y el resultado de la banda de interés con peso molecular aprox. a 8kDa siempre será el mismo así como el perfil electroforético del aislado de soya.

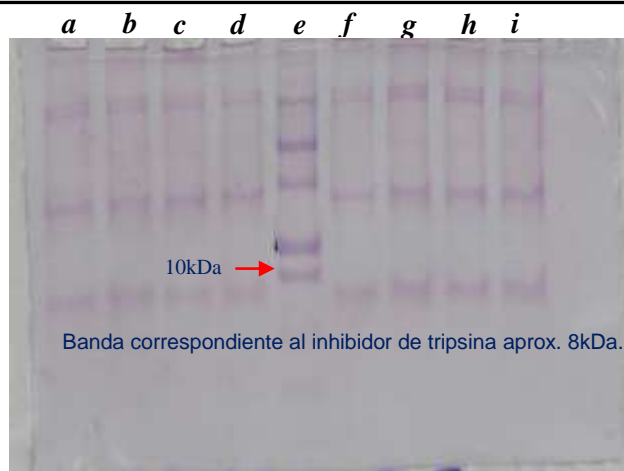


Figura 8. *a, b, c, d, f, g, h, i* concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de aislado de soya ; *e* PM

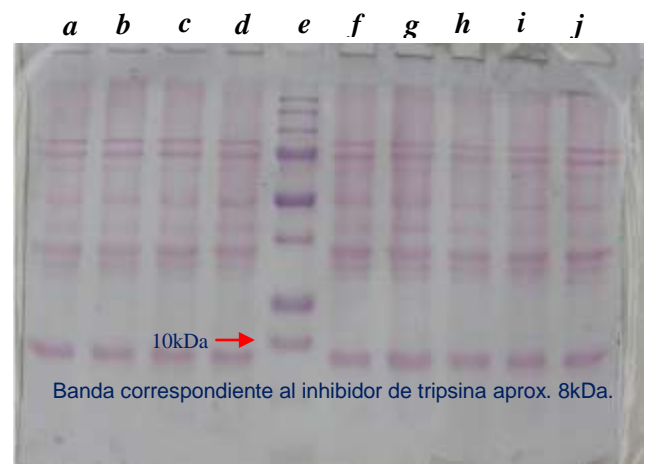


Figura 9. *a, b, c, d, f, g, h, i, j* concentración de $1.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de aislado de soya ; *e* PM



Figura 10. *a, b, c, d, f, g, h, i* concentración de $2.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de aislado de soya ; *e* PM

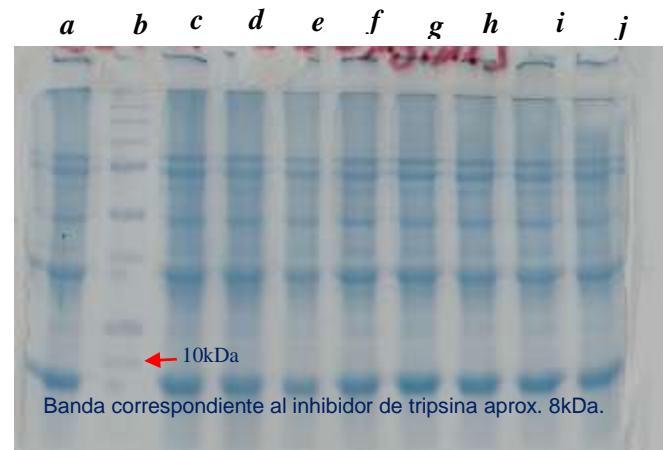


Figura 11. *a, c, d, f, g, h, i, j* concentración de $2.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de aislado de soya ; *b* PM

Figura 8-11 Gel de Acril-bisacrilamida con concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya



Como se observa en las figuras anteriores, los perfiles electroforéticos que se obtuvieron a las diferentes concentraciones estudiadas son claramente perceptibles, con lo cual es posible reconocer la banda de interés para el presente trabajo, misma que corresponde al inhibidor de tripsina y que se identificó a partir de la comparación que se realizó entre los perfiles obtenidos de la soya con las correspondientes al marcador de Peso Molecular conocido.

Con respecto a esto, el mismo autor reportó para diferentes concentraciones de soya que la identificación de la banda característica del inhibidor de tripsina se observa mejor a las concentraciones utilizadas en este trabajo ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ya que a concentraciones más altas el bandeo no es visible por un exceso de proteína y en concentraciones menores el bandeo no corresponde al que es de nuestro interés y cuya definición es deficiente.⁴⁵

3.4 LINEALIDAD Y CURVA ESTANDAR

La linealidad establece la habilidad de un método para obtener resultados que sean proporcionales a las concentraciones de la muestra de interés.⁴⁵

Para determinar la linealidad del método, se graficó la concentración de soya manipuladas ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $1.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $2.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $3.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vs los valores de las medias de las concentraciones obtenidas. Los resultados se muestran en el grafico 1, y se observa la representación de la regresión lineal del método de electroforesis indicado en la línea de color café, donde los valores de las diferentes concentraciones se ajustan a la ecuación de regresión lineal indicando así que el método estudiado tiene una tendencia a la linealidad, ya que representa los datos experimentales donde a cada cambio de la concentración manipulada hay un cambio de la concentración obtenida dando una proporcionalidad entre estas.

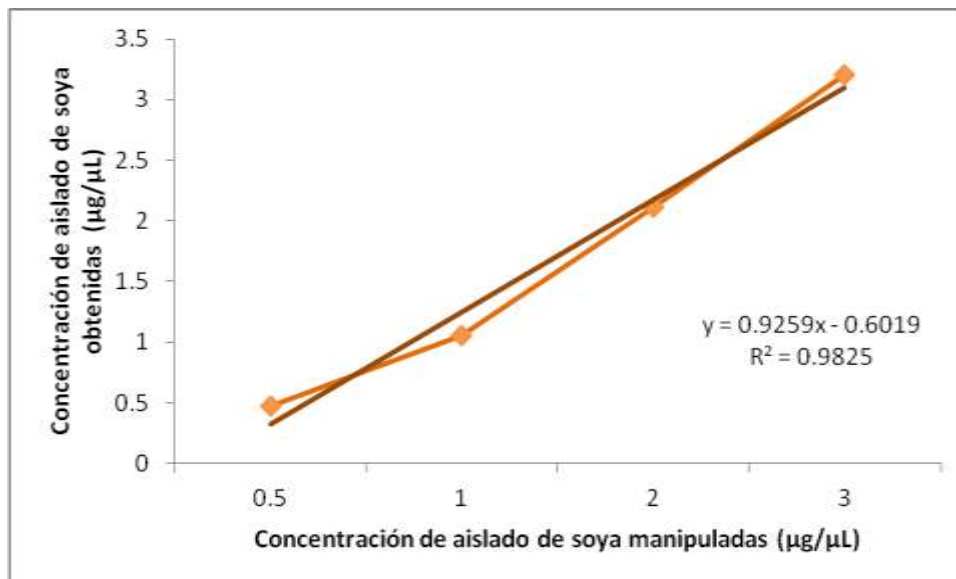


GRAFICO 1: Representación de la regresión lineal del método de electroforesis y curva estándar

Asimismo el valor de R^2 da un resultado de 1 lo que señala que hay una relación directa entre las concentraciones manipuladas ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $1.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $2.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $3.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y las concentraciones de masa obtenidas con la ayuda del software Kodak Edas 120 en geles de acril-bisacrilamida.

En base a toda la experimentación que se llevó a cabo durante este trabajo el grafico anterior es una Curva Estándar representada en el grafico con la línea color naranja, siendo esta una herramienta para que más adelante se permita cuantificar el contenido de soja en diferentes matrices de alimentos manejando las concentraciones empleadas en el presente trabajo.



3.5 REPETIBILIDAD.

El análisis de varianza es una técnica estadística de suma utilidad en la validación, ya que a partir de esta se evalúa la repetibilidad y reproducibilidad de un método analítico. El análisis de la varianza de las muestras es un método utilizado para efectuar la comparación entre las medias de distintas poblaciones.

Así pues la repetibilidad es la cercanía que se da entre los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales en un periodo de tiempo corto.⁴⁶

A continuación se muestra en los gráficos 2, 3, 4 y 5 los valores obtenidos a las diferentes concentraciones

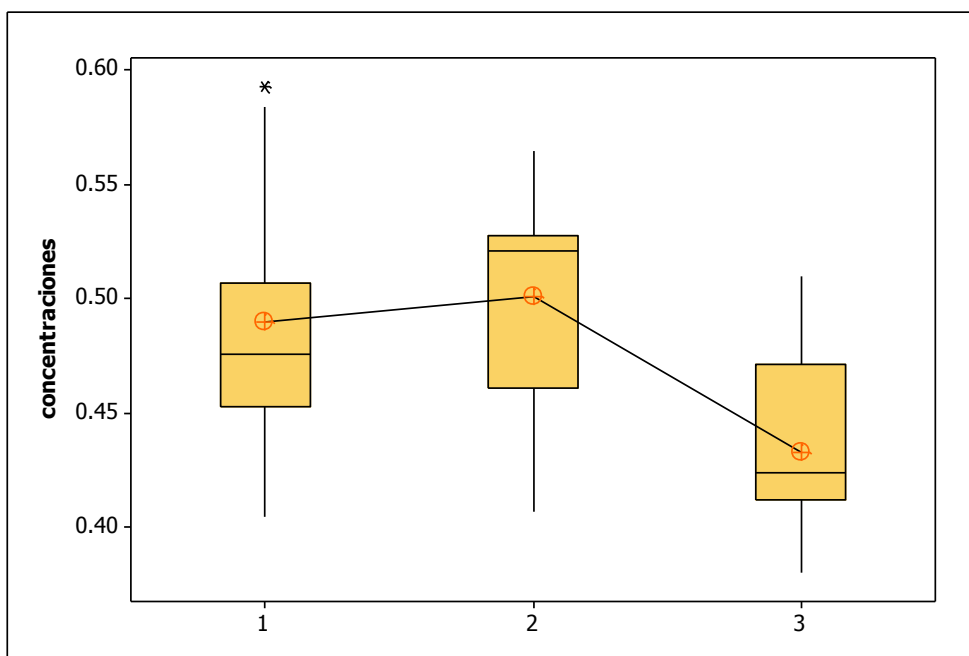


GRAFICO 2: Representación gráfica de la repetibilidad a la concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya

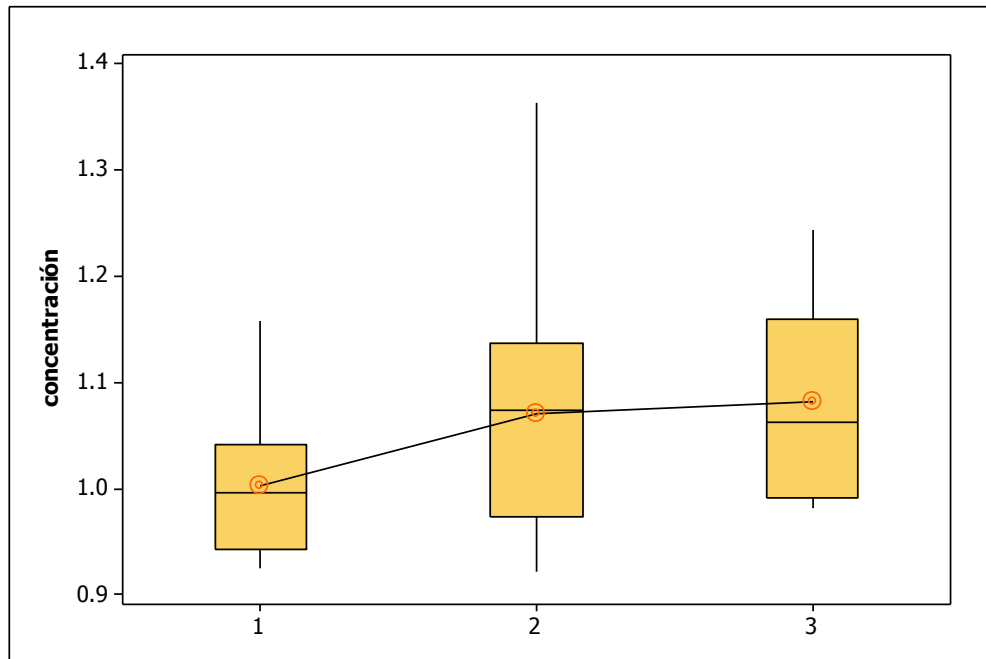


GRAFICO 3: Representación gráfica de la repetibilidad a la concentración de $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya

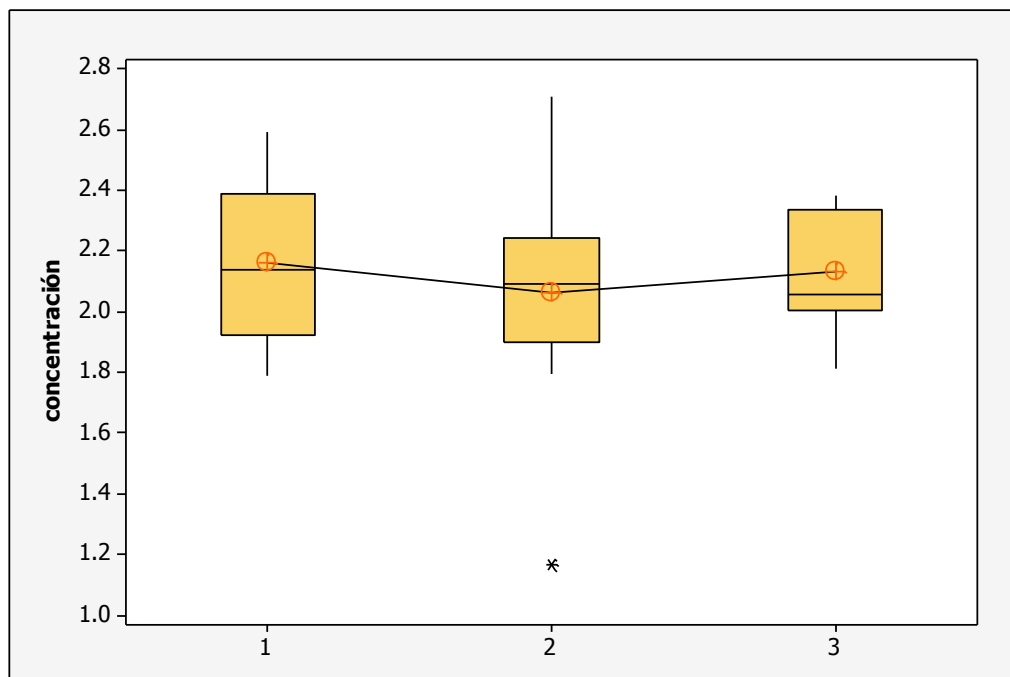


GRAFICO 4: Representación gráfica de la repetibilidad a la concentración de $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya

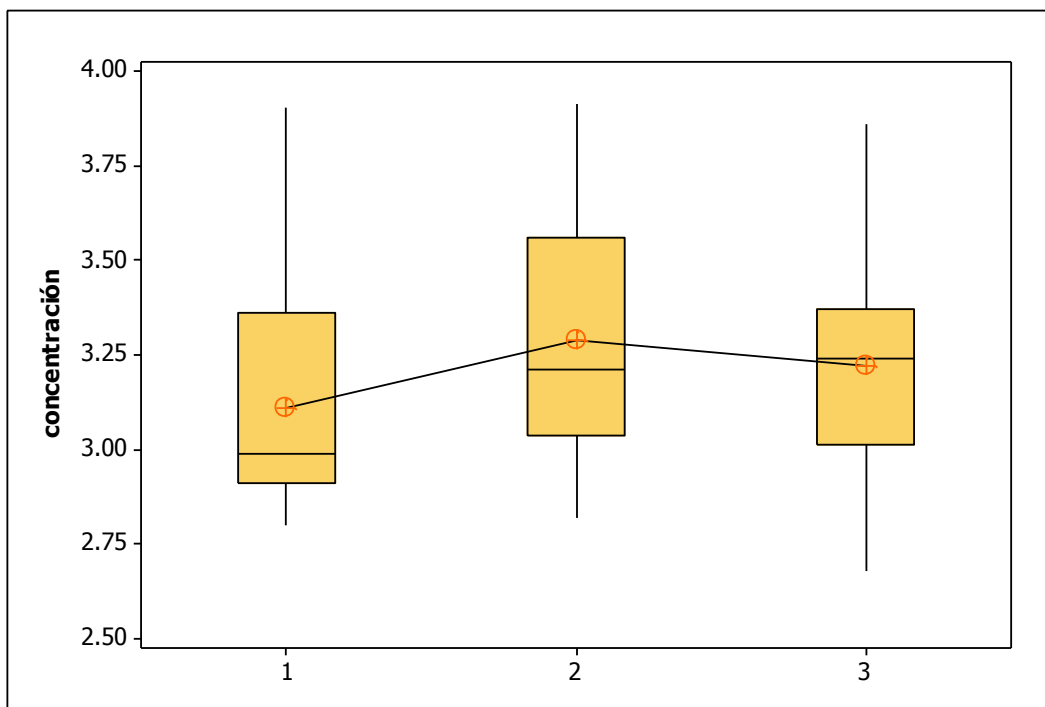


GRAFICO 5: Representación gráfica de la repetibilidad a la concentración de $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aislado de soya

Como se puede observar en los gráficos anteriores 2, 3, 4, y 5, son un claro indicativo de la baja dispersión que presentan los valores obtenidos durante las repeticiones respecto a la media, se puede afirmar que el método de electroforesis en geles de acril-bisacrilamida posee una repetibilidad conveniente para realizar el análisis de muestras de aislado de soya a diferentes concentraciones. Mientras el método se ejecute bajo las mismas condiciones experimentales se espera que los resultados 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.

Se obtuvo una curva estándar que permitirá determinar una posible adulteración en alimentos. Su importancia radica en que es muy frecuente que se emplee en



diferentes alimentos para reducir costos que estas matrices presenten anomalías por la adición de aislado proteico de soya, las normas oficiales mexicanas como la NOM-122-SSA1-1994, menciona el uso de aditivos proteicos de origen vegetal (aislado de soya), estableciendo que el límite máximo permitido es de 2% para embutidos, sin embargo en la industria alimentaria se ha dado frecuentemente este tipo de adulteración, con respecto a esto se ha hecho diversos estudios con diversas técnicas, las cuales solo identifican si esta anomalía fue realizada con aislado proteico de soya, por lo que es de interés realizar el porcentaje de recuperación en diferentes matrices de alimentos para confirmar el método de electroforesis y de la curva estándar la cual ayudará a la detección y cuantificación sobre el comportamiento de este aislado en alimentos que se presume que cuentan con una adulteración.³⁷





4. RECOMENDACIONES

Para poder evitar las dificultades durante la aplicación de la metodología de electroforesis en geles de acril-bisacrilamida, se dan las siguientes recomendaciones:

- Realizar la mezcla de todas las soluciones con movimiento de rotación lento, constante y suave en las cantidades correctas.
- Todas las soluciones se deben mantener en refrigeración para aumentar la vida útil.
- Hacer una buena estandarización del pH requerido de las soluciones.
- Atemperar las soluciones a entre 20 y 25°C.
- Limpiar perfectamente los vidrios con alcohol para descartar posibles restos de geles, grasas, polvo, etc.
- Utilizar por cada solución puntas exclusivas para evitar alguna contaminación cruzada.
- Conectar la fuente de poder a un no-break o regulador de voltaje para mantener flujo de corriente eléctrica estable.



5. CONCLUSIONES

- ❖ En base a la metodología empleada y con la ayuda del software Kodak Edas 120, en el presente trabajo se corroboró la presencia de la banda característica de aislado de soya que predomina con mayor definición de color en el perfil electroforético de las concentraciones 0.5µg/µL, 1.0µg/µL, 2.0µg/µL y 3.0µg/µL.
- ❖ Los valores de la media obtenidos para las concentraciones 0.5µg/µL, 1.0µg/µL, 2.0µg/µL y 3.0µg/µL no presenta variación significativa, sin embargo estos valores se encuentran cercanos al valor promedio de la hipótesis alternativa, la cual nos indica que al menos un valor es diferente al establecido.
- ❖ El software Kodak Edas 120 no presenta la suficiente sensibilidad para detectar la concentración correspondiente a 0.5µg/µL debido a que la definición de color no es clara para este, sin embargo es perceptible a simple vista.
- ❖ Los resultados obtenidos en la validación son indicativos de la exactitud que desarrolla el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida ya que las medias obtenidas a las diferentes concentraciones son cercanas al valor establecido.
- ❖ Debido a la sensibilidad que presenta el método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida es utilizado como un método de separación de acuerdo al peso molecular que posee y es ahí en donde se involucra la selectibilidad del método.
- ❖ Los valores de las diferentes concentraciones se ajustan a la ecuación de regresión lineal indicando a si que el método estudiado tiene una tendencia a la linealidad.
- ❖ El valor de R^2 da un resultado cercano a 1 lo que señala que hay una relación directa entre las concentraciones establecidas y las



concentraciones de masa manipuladas aplicando el software Kodak Edas 120.

- ❖ La baja dispersión que presentan los valores obtenidos durante las repeticiones con respecto a la media se puede afirmar que el método de electroforesis en
- ❖ geles de acril-bisacrilamida posee una repetibilidad conveniente para realizar el análisis de muestras de aislado de soya a diferentes concentraciones.
- ❖ Se obtuvo una curva estándar que permitirá determinar una posible adulteración en alimentos a las concentraciones propuestas usadas durante la experimentación.





6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Badui, D. S.** (2006), "Química de alimentos". Ed. Alhambra, México, 4^a edición.
2. **Bean Scott R. y Lookhart George L.** (2001). "High-Performance Capillary Electrophoresis of Meat, Dairy and Cereal Proteins". Electrophoresis. Vol. 22.
3. **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.
4. **Calanche, M., J., B.** (2009) "influencias culturales en el régimen alimentario del venezolano" Vol. 22 No. 1 Caracas Venezuela
5. **Carbonell G. N.** "Implementación de la técnica de electroforesis para la evaluación de la adulteración de jamón cocido con proteína de origen no cárnico" Tesis FES Cuautitlán
6. **Chapman, K. G.** (1991). "A History of Validation in the United States: Part I". Pharmaceutical Technology. Vol. 15, No. 10.
7. **Cheftel, J. C. y Lorient, D.** (1989) "Proteínas alimentarias" Ed. Acribia, Zaragoza, España.
8. **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.
9. **Cuadernos de nutrición,** (1989) Vol. 12 No. 3
10. **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



11. **Eurachem Guide.** (1998). "The Fitness for Purpose of Analytical Methods". A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Reino Unido.
12. **Food and Drug Administration.** (1987). "Guideline on General Principles of Process Validation". U.S.A.
13. **Food proteins, corporation S.A. de C.V.** "Ficha técnica de proteína aislado de soya SUPRO 500E."
14. **Garfiel, F. M.** (2000) "Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories" AOAC Internacional, 3ª edición, U.S.A.
15. **Grace, E. S.** (1997). "Biotechnology Unzipped. Promises & Realities". Ed. Joseph Henry Press, Washington, D.C.
16. **Green, J. Mark.** (1996). "A Practical Guide to Analytical Method Validation". Analytical Chemistry. Vol. 68,
17. **Hettiarachy, Navam S.** (1994). "Protein Functionality in Food Systems". Ed. Marcel Dekker Inc. U.S.A.
18. **Hokanson Gerard C.** (1994). "A Life Cycle Approach to the Validation Of Analytical Methods During Pharmaceutical Product Development. Part I". Pharmaceutical Technology. No. 9.
19. **Holme, David J.** (1987). Bioquímica Analítica. Ed. Acribia. España.
20. **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.
21. **Jasso, S. A.** (1998) "Evaluación del tipo de proteínas presentes en embutidos comerciales tipo jamón cocido expedidos en la ciudad de México mediante



- patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida”. Tesis. FES-Cuautitlán. U.N.A.M.
- 22. Jeng, Shih-Tong et al.** (2001). “Detection of the Genetically Modified Soy beans In Processed Foods”. Food & Fertilizer Technology Center. Taipei, Taiwan.
- 23. Karp, G.** (2005) “Biología Molecular, Conceptos y Experimentos”, Ed. Mcgraw-Hill Interamericana, 4^a ed.
- 24. Kirk, R. S., Sawyer, R., Egan, H.** (1999), “Composición y Análisis de Alimentos de Pearson”. Ed. CECSA., México,
- 25. Kodak Digital Science EDAS 120.** “Instruction Manual”.
- 26. Lazar, Max S.** (1993). “Concepts for the Process Validation of Bulk Pharmaceutical Chemicals (BPC)”. Pharmaceutical Technology. Vol.17, No. 12.
- 27. Lee, Martin L., Taylor Mary, Kantrowitz Julia.** (1988). “Statistical Evaluation of Quality Control Tests”, Pharmaceutical Technology. Vol 12, No 9.
- 28. Lin, Hsu-Yang.** (2001). “Detection of Genetically Modified Soy beans by PCR Method and Immunoassay Kits”. Journal of Food and drug analysis. Vol. 9, No. 3.
- 29. Madrid A. V.,** (1992) “Los Aditivos en los alimentos”, Ed. Madrid, España.
- 30. Manual de procedimientos del Codex Alimentarius**
- 31. Menter, Paul.** (2000). “Acrylamide Polymerization. A Practical Approach”, Bio-Rad Laboratories. U.S.A.
- 32. Mini-Protean 3 Cell.** “Instruction Manual”, Bio-Rad Laboratories. Catalog Numbers 165-3301, 165-3302. U.S.A.



33. **Nelson, L David** (2001) *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Ed. Omega. 3ra ed. Barcelona.
34. **Nielsen S.S** (2007) "Análisis de los Alimentos- Manual de Laboratorio" Ed. Acribia. España
35. **Nollet, Leo M. L.** (1996). "Handbook of Food Analysis. Vol. 1". Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
36. **Norma Oficial Mexicana. NOM-034-SSA1-1993.** "Bienes y servicios. Productos de la carne. Carne molida y carne molida moldeada. Envasadas. Especificaciones sanitarias".
37. **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".
38. **Olsen, John Elmerdahl.** (2000). "DNA-Based Methods For Detection Of Food-Borne Bacterial Pathogens". *Food Research International*. Vol. 33, p. 257-266.
39. **Orozco L. E. M.** (1996), "Evaluación de la presencia de proteína de soya en queso tipo manchego expedidos en la ciudad de México", Tesis. FES-Cuautitlán, U.N.A.M.
40. **Pearson D.** (1998). "Técnicas De Laboratorio Para El Análisis De Alimentos". Ed. Acribia, Zaragoza España.
41. **Ridner, Edgardo, (2006).** "Soja, Propiedades Nutricionales y su Importancia en la salud" Ed. Buenos Aires, Sociedad Argentina De Nutrición
42. **Rosemberg, Ian M.** (1996). "Protein Analysis and Purification Benchtop Techniques". Ed. Birkhäuser. U.S.A.



- 43. Secretaría de Salud.** “Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios”.
- 44. Swartz, Michael y Krull, Ira S.** (1997). “Analytical Method Development and Validation”. Ed. Marcel Dekker. U.S.A.
- 45. Toral, P. M. N.** (2004),” Validación del Método de Electroforesis en gel de acril-Bisacrilamida” Tesis. FES-Cuautitlán, U.N.A.M.
- 46. Triola, Mario F.** (2000). “Estadística Elemental”. Ed. Pearson Educación, 7a ed, México.
- 47. Vázquez, A. A.** (2002). “Evaluación de la Calidad Proteica en Salchichas Comerciales Tipo Viena Expendidas en la Ciudad De México”. Tesis. FES-Cuautitlán. UNAM.
- 48. Wood, Roger** (1999). “How To Validate Analytical Methods”, Analytical Chemistry. Vol. 18, No. 9/10.
- 49. Yárbar, U. C. A. (2003)** “Manual de procesamientos de electroforesis para proteínas y ADN” Instituto Nacional de Salud Lima Perú.

PÁGINAS ELECTRÓNICAS

- 49. Butler, J.M** (2008). Validation. Abril, 2011. Disponible en: www.cstl.nist.gov.
- 50. Chinchilla-Lugo, A.M** (2011). Manual de laboratorio de inmunología. Sep, 2010. Disponible en: www.bc.inter.edu.
- 51. Ibañez, C.F** (2003). Aditivos Alimentarios. Marzo, 2011. Disponible en: www.nutricion.org.
- 52. EUFIC** (2006). Aditivos Alimentarios. Agosto, 2010. Disponible en: www.eufic.org.



- 53. Lomonte, B** (2003). Inmunología General: Manual de Laboratorio. Julio, 2010. Disponible en: www.icp.ucr.ac.cr.
- 54. Valderbilt, University** (2008), Quantitation & Electrophoresis of Protein. Sep, 2010. Disponible en: www.cas.banderbilt.edu.
- 55. Manuel Chicharro**, (2009). Cromatografía principios y aplicaciones Análisis Químico. Sep, 2011. Disponible en: www.scribd.com
- 56. Padilla Fanny, C.** (2010). Fraccionamiento y caracterización de las proteínas solubles de la harina de nuez de Barinas (*Caryodendron orinocense K*). Oct, 2011.
- 57. Aguilar O.** (2009). Caracterización tridimensional del proteínas de soya mediante electroforesis de dos dimensiones y partición en fases acuosas. Oct, 2011. Pendiente la pagina





7. ANEXOS

ANEXO A

STOCK SOLUCIONES:

1.- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA pH 8.8

- a) Pesar TRIS BASE 24.2g.
- b) Adicionar 50 ml. de agua destilada
- c) Adicionar HCl concentrado lentamente hasta llegar a un pH 8.8 (cerca de 4 ml. de HCl concentrado)
- d) Aforar a 100 ml. con agua destilada

Para preparar esta solución amortiguadora se pesa el Tris Base, el cual va ser disuelto en 50ml de agua destilada, una vez concluido lo anterior, se empieza a ajustar el pH de la solución con la ayuda de un potenciómetro, para poder llegar al pH (8.8), ajustando con HCl concentrado, una vez realizada esta acción la solución obtenida se afora a un volumen de 100 ml. Guardar la solución amortiguadora en un frasco ámbar y mantener en refrigeración. ^{45, 47, 49}

2. - SOLUCIÓN AMORTIGUADORA pH 6.8

- a) Pesar TRIS BASE 12.1g.
- b) Adicionar 50 ml de agua destilada
- c) Adicionar HCl concentrado lentamente hasta llegar a un pH 6.8 (cerca de 8 ml de HCl concentrado)
- d) Aforar a 100 ml. con agua destilada

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. Guardar la solución amortiguadora en un frasco ámbar y mantener en refrigeración.

3.- *SOLUCIÓN ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA

- a) Pesar Acrilamida 30g.
- b) Pesar Bisacrilamida 0.8g.
- c) Adicionar agua destilada 100 ml.

Para preparar esta solución es necesario pesar la acril-bisacrilamida con las cantidades indicadas anteriormente, y diluir ambos reactivos en agua destilada

4.- *SOLUCIÓN BUFFER pH 8.8

- a) 75 ml TRIS-HCl (pH 8.8)
- b) 4 ml SDS 10%
- c) 21 ml agua

Para preparar esta solución se toma de la solución (de la solución 1) 75ml de la solución amortiguadora a pH 8.8 y se le adicionan 4ml de SDS (de la solución 7) y se mezclan con 21ml de agua destilada una vez terminada esta operación se prosigue a guardar la solución buffer en un recipiente y mantener en refrigeración.

5.- *SOLUCIÓN BUFFER DE GEL CONCENTRADOR

- a) 50 ml TRIS-HCl pH 6.8
- b) 4 ml SDS 10%
- c) 46 ml Agua



Para preparar esta solución amortiguadora se miden 50ml (de la solución 2), se toman 4ml (de la solución 7), y se mezclan con 46ml de agua destilada, guardar en un recipiente y mantener en refrigeración.

*Máxima vida útil de 3 meses en refrigeración

6.- PERSULFATO DE AMONIO

- a) Pesar persulfato de amonio 0.5g.
- b) Adicionar agua 5 ml.

Se pesa la cantidad indicada de persulfato de amonio y se disuelve en 5ml de agua destilada. Conservar a temperatura de 4°C y en un frasco ámbar.

7.- SDS al 10%

- a) Pesar SDS 10g.
- b) Adicionar Agua destilada 100 ml.

Se pesa la cantidad indicada de SDS y se disuelve en 100ml de agua destilada, mantener en agitación baja y constante (para evitar burbujas). Guardar en un recipiente y mantener en refrigeración.

8.-* BUFFER ELECTROFORESIS 10 X

TABLA 14. Formulación de la solución buffer electroforesis 10X

Reactivo	Cantidad (para 1 L.)	Cantidad (para medio litro)
TRIS (g)	30	15
GLICINA (g)	144	72
SDS (g)	10	5
AGUA (ml)	1000	500

*Ajustar a pH 8.3, estable a temperatura ambiente



Como primer paso es necesario preparar la solución de la corrida neta (1x), cuyos reactivos se muestran en la tabla anterior 8), para que a partir de esta se pueda obtener la solución de corrida (10x).

La preparación comienza pesando la glicina, el tris y el SDS para que posteriormente se disuelvan dichos compuestos poco a poco en agua. Una vez hecho lo anterior se ajusta el pH de la solución obtenida a 8.3, una vez ajustado el pH, se realiza una dilución de 100ml de la solución neta (1x) en 900ml de agua para así obtener el buffer de corrida 10x, verter en un frasco ámbar ambas soluciones y mantener en refrigeración.

9.- SOLUCIÓN TEÑIDORA

TABLA 15. Formulación de la solución teñidora

Reactivo	Cantidad
Azul de Coomasie R-250 (g)	0.25
Ácido acético glacial (mL)	10
Metanol (mL)	50
Agua destilada (mL)	100

El procedimiento consiste en pesar la cantidad marcada de azul Coomasie y mezclar con los volúmenes mencionados de ácido acético glacial, metanol y agua destilada. Conservar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

10.- SOLUCIÓN DESTENIDORA

TABLA 16. Formulación de la solución destañidora

Reactivo	Cantidad (mL)
Metanol	250
Agua destilada	200
Ácido acético	50



Medir los volúmenes que se requieren, los cuales deben mezclarse y conservar en un frasco ámbar a temperatura ambiente

11.- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA.

TABLA 17. Formulación de la solución amortiguadora de muestra

Reactivo	Cantidad (μL)
Solución amortiguadora de muestra	950
Mercaptoetanol	50

Para esta solución es necesario mezclar los volúmenes mencionados de la solución amortiguadora de muestra y el Mercaptoetanol. Conservar en un frasco ámbar a temperatura de refrigeración. ^{5, 21, 39, 47}



ANEXO B

MEDIDAS A SEGUIRSE EN CASO DE CONTACTO ACCIDENTAL CON REACTIVOS TÓXICOS

En casi todos los casos en los que se tiene contacto con los reactivos utilizados para el método de electroforesis (ver lista adjunta) es importante seguir los siguientes pasos como medida de emergencia:

- Si el reactivo hizo contacto con los ojos, lavar con abundante agua por espacio de 15 a 20 minutos hasta que no haya evidencia de restos del reactivo. Si el contacto fue en la piel, lavar con jabón y abundante agua.
- Si hubo inhalación, trasladarse inmediatamente hacia un área donde haya aire fresco.
- Recibir asistencia médica inmediatamente.

TABLA 18. Lista de reactivos usados en electroforesis con sus características tóxicas y químicas

REACTIVO	CARACTERÍSTICA
Ácido acético glacial	Irritante por inhalación, corrosivo.
Ácido bórico	Dañino por inhalación o por contacto con la piel. Irrita los ojos, sistema respiratorio y piel. Posible riesgo de efecto irreversible. Posible teratógeno. Puede causar daño al sistema nervioso central.
Acrilamida	Neurotóxico, cancerígeno, genera daño genético heredable.
Azul de bromofenol	Puede ocasionar asfixia por inhalación.
Bisacrilamida	Neurotóxico, nocivo e inflamable.
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Tóxico, nocivo, puede causar severa irritación a las vías respiratorias, piel y ojos.
Glicina	No se reporta algún grado de toxicidad.
Mercaptoetanol	Tóxico por inhalación o contacto con la piel, genera severa irritación.
Metanol	Tóxico e inflamable.
Persulfato de amonio	Corrosivo, inflamable, nocivo por inhalación, produce quemaduras en la piel.
TEMED	Corrosivo, inflamable, nocivo por inhalación, produce quemaduras en la piel.
Tris	Posible cancerígeno, produce irritación al sistema respiratorio y piel.



MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD:

- Algunos reactivos utilizados en los procedimientos tienen la característica de ser tóxicos, irritantes, corrosivos, cancerígenos, mutagénicos y neurotóxicos, por lo tanto el investigador siempre deberá usar guantes y bata para evitar un contacto directo o accidental con estos reactivos.
- El voltaje utilizado para la electroforesis puede generar quemaduras por descargas eléctricas. Aunque la mayoría de las cámaras de electroforesis han sido diseñadas para evitar el contacto directo con la electricidad, el operador deberá asegurarse de mantener la fuente de poder apagado o desconectada al momento de manipular el equipo.
- El proceso de ebullición de las proteínas en baño maría a 100°C deberá realizarse con extremo cuidado para evitar quemaduras. Se recomienda utilizar una gradilla flotante de polipropileno para colocar los tubos.
- El investigador deberá usar guantes de látex mientras se encuentre trabajando con proteínas. Este paso ayudará a evitar la degradación de las biomoléculas por acción de las nucleasas o proteasas presentes en la superficie de las manos. Asimismo, el uso de guantes evitará que el investigador se exponga ante algún posible riesgo de intoxicación por material infeccioso.
- El material biológico debe de ser conservado a bajas temperaturas. Las proteínas deben ser conservadas a -80°C o en su defecto a -20°C. Todas las muestras biológicas deben ser repartidas en alícuotas y en volúmenes pequeñas para evitar etapas de descongelamiento o congelamiento drástico que ocasionarían un eventual deterioro de las moléculas. ⁴⁹



- Manipulación de las proteínas, no se exige el uso de puntas nuevas pero si se recomienda esterilizarlas previamente.

ANEXO C

ENSAMBLAJE DE LA CÁMARA DE ELECTROFORÉISIS.

El procedimiento para el ensamblaje de la cámara de electroforesis varía de acuerdo al modelo del equipo.

En general una cámara de electroforesis vertical puede tener los siguientes componentes:

(Figura 8-11)

- **Dos placas de vidrio de diferente grosor y altitud.** En algunos modelos las placas tienen el mismo grosor y altura, dependiendo de la dimensión de la cámara.
- **Un peine, cuyos dientes pueden variar en número, tamaño y grosor.** Sirven para moldear los pocillos donde se colocaran las muestras.
- **Un soporte o base.** Dispositivo que sirve para permitir el ensamblaje de los vidrios con los espaciadores, a través de una serie de prensas que ejercen presión y mantienen fijo todo el sistema.
- **El tanque de electroforéisis.** Recipiente que contiene el buffer de corrida. En algunos sistemas, este tanque contiene electrodos permanentes a lo largo de sus bases listas para ser colocados. En otras cámaras existe una tapa que contiene los electrodos, de tal manera que el investigador ya no tiene contacto directo con el buffer durante el proceso de electroforesis.
- **Fuente de poder.** Aparato que tienen por función proveer de energía eléctrica a la cámara de electroforéisis. El voltaje, el amperaje y el tiempo, pueden ser regulados de acuerdo a las necesidades del investigador.

Es importante señalar que la cámara de electroforéisis ya ensamblada deberá estar ubicada sobre una superficie totalmente plana y nivelada. Este paso es importante en el momento en el que se vierte la solución del gel dentro de la cámara, ya que se evita el derrame de la solución y la



generación de matriz desnivelada. Esta última podría generar la distorsión del perfil de las bandas de las proteínas al final de la electroforesis.

En la figura 12 se muestran las imágenes de los componentes de una cámara de electroforesis vertical

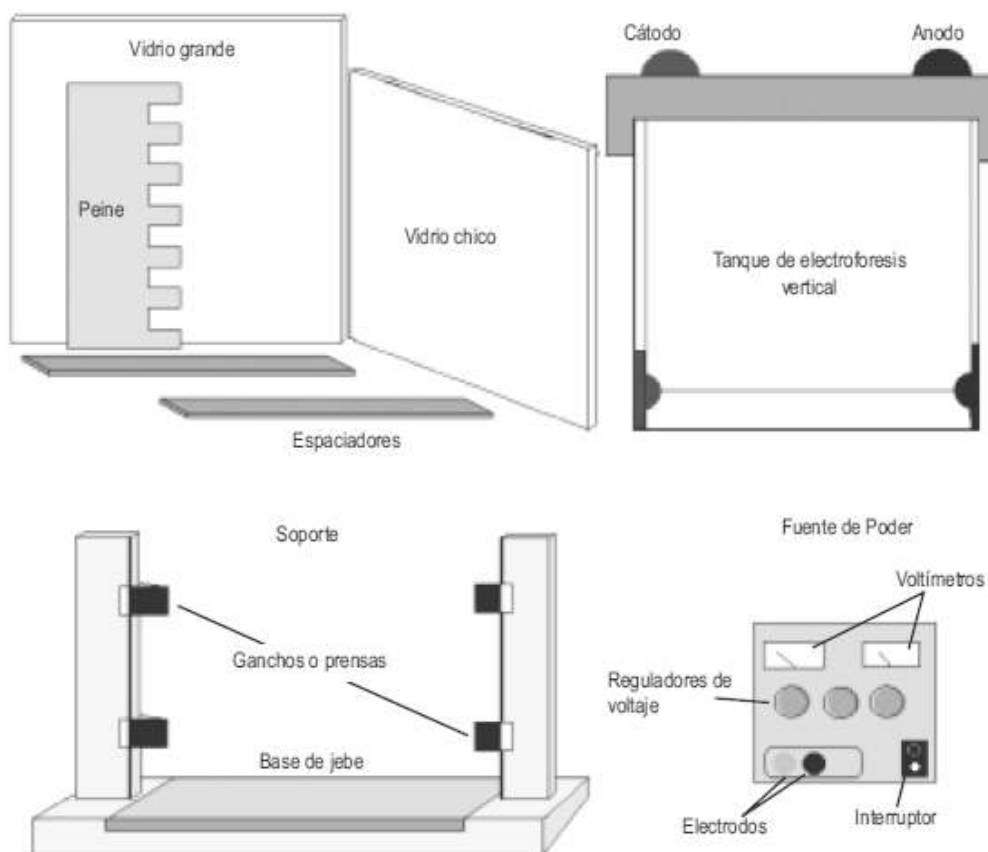


FIGURA 12. Componentes de una cámara de electroforesis vertical

Yárbar, U.C.A (2003) "Manual de procesamientos de electroforesis para proteínas y ADN" Instituto Nacional Lima Perú.



En la figura 13 se muestran el ensamblaje de los vidrios y los espaciadores de una cámara de electroforésis vertical.

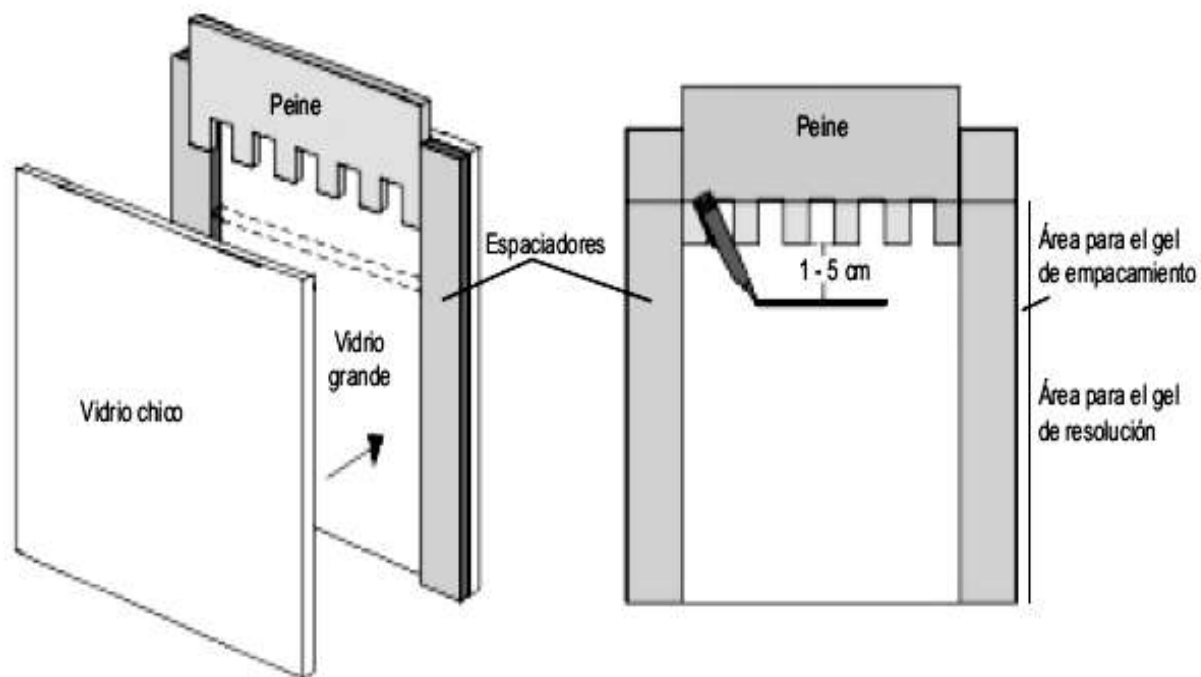


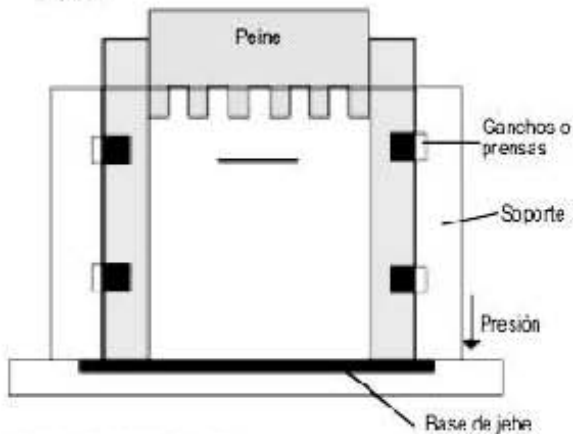
FIGURA NO 13. Modo de ensamblar los vidrios y los espaciadores de una cámara de electroforésis vertical

Yárbar, U.C.A (2003) "Manual de procesamientos de electroforésis para proteínas y ADN" Instituto Nacional Lima Perú

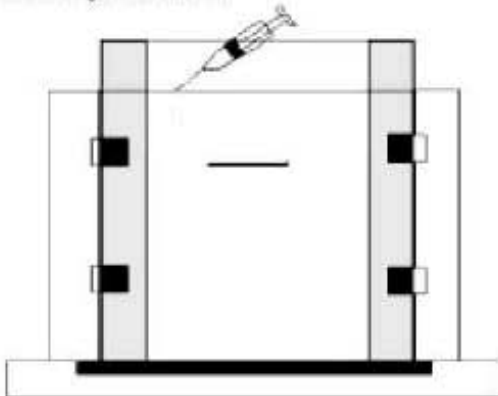


En la figura 14 se muestra el procedimiento para el ensamblaje de un modelo de cámara de electroforesis vertical así como la adición de los geles de resolución y empacamiento.

1. Ensamblar vidrios y espaciadores y colocar sobre un soporte

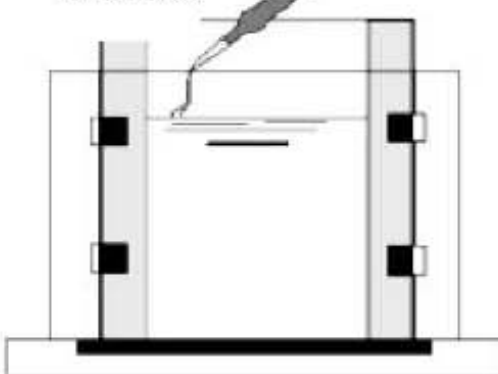


2. Añadir gel de resolución

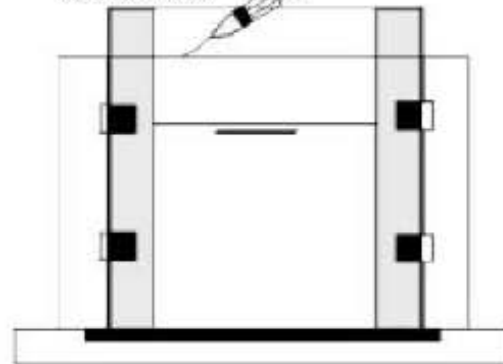


3. Añadir alcohol y dejar gelificar

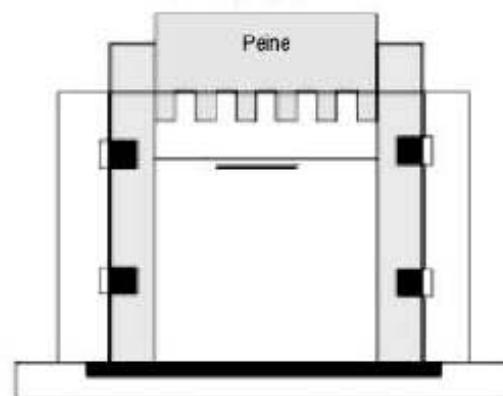
Dejar gelificando



4. Remover el Alcohol ya añadir gel de empacamiento



5. Colocar peine y dejar polimerizar



6. Retirar el peine. Colocar sobre mesa nivelada

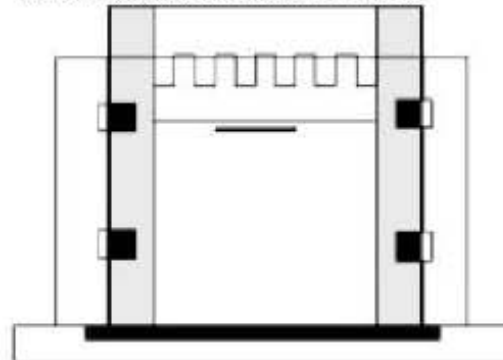


FIGURA 14. Procedimiento para el ensamblaje de un modelo de cámara de electroforesis vertical Yárbar, U.C.A (2003) "Manual de procesamientos de electroforesis para proteínas y ADN" Instituto Nacional Lima



En la figura 15 se muestra el sistema ya ensamblado y completo de la cámara de electroforesis vertical.

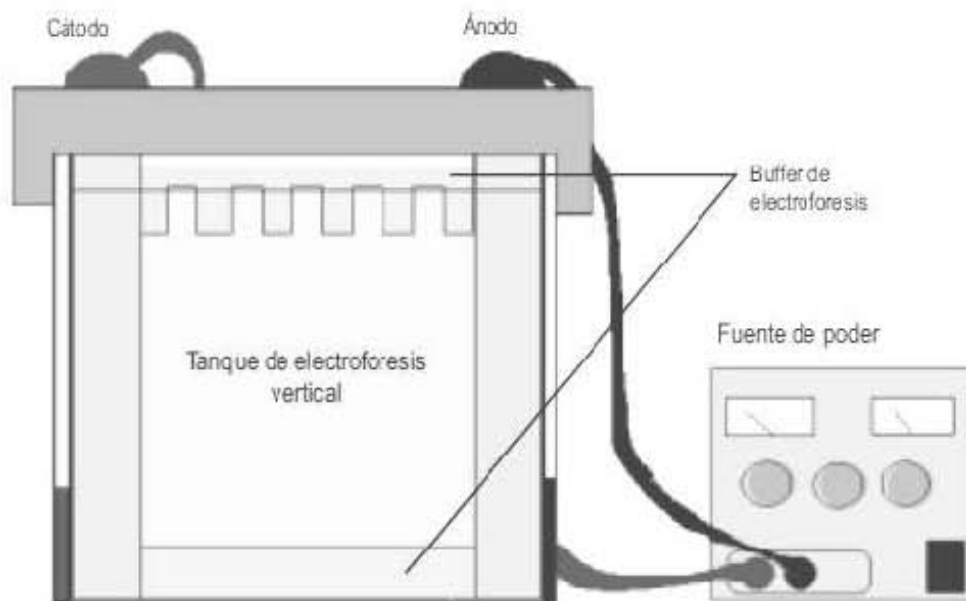


FIGURA 15. Sistema de electroforesis vertical ensamblado

Yárbar, U.C.A (2003) "Manual de procesamientos de electroforesis para proteínas y ADN" Instituto Nacional Lima Perú



ANEXO D.

PREPARACIÓN DE LOS GELES PARA EL MÉTODO DE ELECTROFORÉISIS GEL DE RESOLUCIÓN O CONCENTRADOR:

Fundamento teórico:

El gel de resolución es la matriz de acril-bisacrilamida donde las moléculas de proteínas, van a migrar generando un perfil de bandas o patrón electroforético. Dicho patrón varía de acuerdo al peso molecular de cada una de las moléculas y a la concentración del gel mismo.

Procedimiento:

- Asegurarse de usar guantes durante la manipulación de las soluciones.
- Marcar el límite hasta donde la matriz de acrilamida será vertida, trazando una línea horizontal en el vidrio con un marcador indeleble. Para saber la ubicación exacta de la línea.
- Realizar la preparación del gel de resolución a una concentración de acuerdo a las necesidades, mezclando los componentes perfectamente.
- La concentración de poliacrilamida a usar dependerá de las necesidades del operador.
- Una vez finalizada la preparación de la solución, agregar la mezcla entre las placas de vidrio hasta la línea trazada.
- Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos, usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedó remanente en el vaso de precipitado.⁴⁹



GEL DE EMPACAMIENTO O SEPARADOR:

Fundamento teórico:

El gel de empacamiento es la matriz de poliacrilamida que tiene como característica retener a las proteínas (muestra de proteínas ya preparada) manteniéndolas uniformes antes que ellas migren hacia el gel de resolución.

Procedimiento:

- Asegurarse de usar guantes durante la manipulación de las soluciones.
- Mezclar los componentes perfectamente.
- Una vez finalizada la preparación de la solución, agregar la poliacrilamida entre las placas de vidrio y sobre el gel de resolución ya polimerizado.
- Inmediatamente después, colocar el peine entre ambas placas de vidrio secando con papel toalla los restos de poliacrilamida que lleguen a derramarse.
- Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos, usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedo remanente en el vaso de precipitado.
- Una vez formado el gel, retirar el peine cuidadosamente y lavar los pocillos con agua destilada, o secar con papel filtro, los pocillos ya formados quitando los residuos de la solución que pudieran quedar. ⁴⁹



ANEXO E.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA:

Objetivo:

Someter las muestras de proteínas a procesos químicos y físicos que permitan su óptimo fraccionamiento en la electroforesis vertical.

Materiales:

- Micro pipeta para volumen de 50 μ L
- Tubos Eppendorf
- Guantes
- Baño maría
- Gradilla para tubos
- Buffer de muestra
- Puntas para micro pipeta.

Principio del procedimiento:

La preparación de la muestra de proteínas en un proceso físico-químico, en el cual se rompen enlaces peptídicos y puentes disulfuro gracias a la acción de detergentes iónicos, reactivos reductores y altas temperaturas, los que en conjunto consiguen desnaturalizar la proteína hasta su estructura primaria.

Procedimiento:

- Mezclar la muestra de proteínas con el buffer de muestra (Anexo A) en proporción de 1:1.
- Asegurar la tapa de los tubos y someter la muestra a una temperatura de ebullición durante 5 minutos. Para tal efecto colocar los tubos en la gradilla dentro del baño maría con agua hirviendo.
- Finalizado el procedimiento retirar los tubos del baño maría y mantenerlos en una gradilla a temperatura ambiente hasta el proceso de electroforesis.⁵³



Secuencia de cálculo para la preparación de las diluciones de la muestra aislado de soya:

1.- Pesar 1.2 g de aislado de soya y disolverlo en 50 mL de agua destilada, 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 destilada, obteniendo así la primer muestra a una concentración de 0.5 µg / µL.

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

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

3.- Tomar 0.5 ml de la dilución 1, lo que equivale a 0.01 g / ml, y disolver en 10 ml de agua destilada, obteniendo así la segunda muestra a una concentración de 1 µg / µL.

$$\begin{aligned} 1 \text{ ml de dilución (1)} & \text{-----} 0.02 \text{ g de proteína} \\ 0.5 \text{ ml de dilución (1)} & \text{-----} X \\ X & = 0.01 \text{ g de proteína} \end{aligned}$$

$$\frac{0.01 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = \left(\frac{0.001 \text{ g}}{\text{ml}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \left(\frac{1000 \text{ µg}}{1 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \text{ ml}}{1000 \text{ µl}} \right) = \frac{1 \text{ µg}}{\text{µl}}$$

4.- Tomar 1 mL de la dilución 1, lo que equivale a 0.02 g/ mL, y disolver en 10 mL de agua destilada, obteniendo así la tercera muestra a una concentración de 2 µg / µL.



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

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

5.- Tomar 1.5 mL de la dilución 1, lo que equivale a 0.03 g/ mL, y disolver en 10 mL de agua destilada, obteniendo así la cuarta muestra a una concentración de 3 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.⁴⁵

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

1.5 ml de dilución (1) ----- X

X = 0.03 g de proteína

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



ANEXO F. COLORACIÓN, VISUALIZACIÓN y SECADO

Materiales

- Recipiente para colorear el gel
- Solución de trabajo de azul brillante de Coomasie R-250 (Anexo A)
- Solución de decoloración (Anexo A)
- Agua destilada
- Guantes

Principio del procedimiento:

El proceso de coloración se basa en la atracción electrostáticas del enlace peptídico de las proteínas sobre grupos de ácido sulfónico que son los que tiñen la proteína de color azul. Asimismo, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas participan en este proceso de unión mecánica.

Este paso permite la visualización de proteínas en un rango de sensibilidad entre 0.5 μg y 2 μg .

Procedimiento:

- Todo el procedimiento requiere el uso de guantes a fin de evitar algún tipo de contacto con los reactivos.
- Sumergir el gel de poliacrilamida en un envase que contenga solución de azul de Coomasie en un volumen que permita cubrir completamente el gel.
- Posteriormente de la tinción, colocar el gel en la solución de decoloración para eliminar restos de colorante en el gel hasta que las bandas de las proteínas puedan ser apreciadas claramente.
- Finalizada la remoción del azul de Coomasie, lavar el gel con agua destilada. Para poder analizar los resultados es recomendable secar el gel usando un equipo secador a vacío o manualmente.⁴⁹



SECADO MANUAL DE GELES DE POLIACRILAMIDA.

- Mantener el gel en agua destilada.
- Remojar una lámina de celofán aproximadamente 15 x 15 cm. en agua destilada y colocarla encima de una placa de vidrio cuyo tamaño dependerá del tamaño del gel.
- Seguidamente, colocar el gel sobre el celofán y observar que no se formen burbujas.
- Cubrir el gel con un segundo celofán previamente en agua y presionar el sistema “sandwich” con broches en los cuatro lados de la placa de vidrio. Secar con la ayuda de un secador manual a base de aire caliente.
- Remover los broches y desprender de la placa de vidrio el celofán que contiene el gel.
- Cortar y guardar en un lugar seco y fresco.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Las proteínas fijadas en geles de poliacrilamida y teñidas con azul de Coomasie se observan bandas azules de diferentes pesos moleculares.

El peso molecular de una proteína se mide en Kilodaltones (equivalente a 1000 daltones) y puede ser determinado comparando la banda con un patrón de proteínas estándar de peso conocido denominado marcador de peso molecular.

La distribución de las proteínas depende de la concentración del gel, por lo tanto, el operador deberá seleccionar el marcador de peso molecular más adecuado.⁴⁹



ANEXO G

MANEJO DEL SOFTWARE KODAK EDAS 120

El primer paso en el análisis de un gel de electroforesis es adquirir una imagen de este.

La imagen del gel se obtiene con la cámara DC 120 del software Kodak Edas. Las cámaras digitales Kodak son muy flexibles pueden ser utilizadas para tomar de 24 BITS o imágenes a todo color, se puede configurar para tener escalas de grises de 8 BITS.

En la figura 16 se muestra el Montaje del equipo para el análisis con el software Kodak Edas 120.²⁵



FIGURA 16. Montaje del sistema para la lectura de los geles con el software comercial (Kodak Edas 120)



En la figura 17 se muestra la escala de grises para la calibración del equipo.

- Calibración del equipo: tomar una foto a la escala de control R-M



FIGURA 17. Escala de colores para calibración de la cámara

En la figura 18 se muestra el montaje de la pantalla de luz y la base aislante de luz para la toma de fotos de geles de acril-bisacrilamida.

- Colocar el gel en estudio, en la pantalla de luz y poner la base sostenedora aislante de luz sobre la pantalla de luz

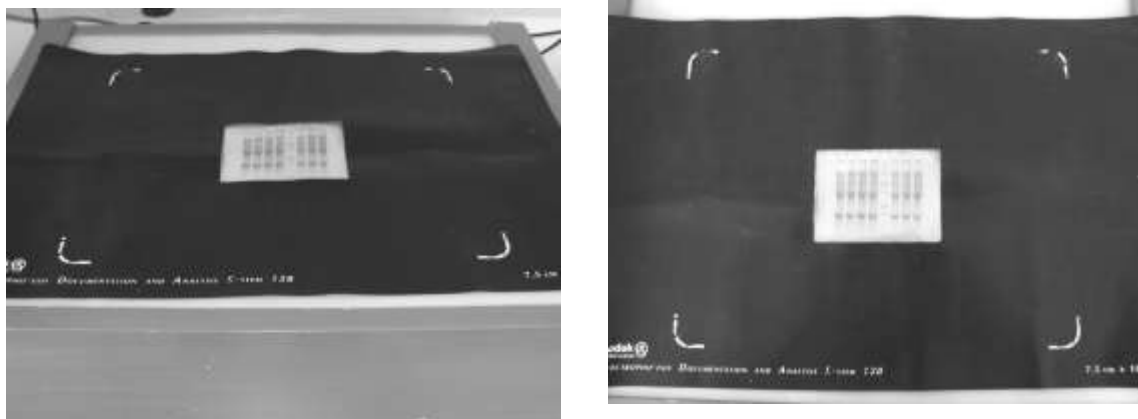


FIGURA 18. Base sostenedora aislante de luz sobre la pantalla de luz delimitando el gel a revisar

En la figura 19 se muestra la base con diseño de campana donde se aísla la luz y se coloca la cámara.

- Poner la base con diseño de campana que aísla el gel en estudio de cualquier fuente de luz y colocar al extremo la cámara



FIGURA 19. Base aislante para geles



En la figura 20 se muestra la cámara con la cual se toman las fotos a analizar con el software Kodak Edas 120.

- Para la obtención de la imagen encienda la cámara digital mediante la apertura de la tapa del objetivo, elija DC 120 desde el menú archivo el cuadro de dialogo aparece



FIGURA 20. Cámara para el software comercial (Kodak Edas 120)

- En la pantalla abrir la opción “FILE” y después dar la orden “ACQUIRE (DC40/DC120)” y se ajustan las características del tipo de foto que se desea tomar.
- Después de tomar la foto, se ajusta un cuadro con la opción “SELECT IMAGE” para delimitar el área del gel
- Una vez seleccionada el área del gel, dar la orden “FIND LANES” para localizar los carriles
- Después de ubicar los carriles, dar la indicación “FIND BAND” para encontrar las bandas. Si el equipo no localiza todas las bandas en el gel, se puede ajustar el contraste del brillo para hacer más notables las bandas y se puede dar una vez más la orden “FIND BAND”
- Dar doble click a la banda donde se encuentra el peso molecular, a continuación aparece en la pantalla un recuadro donde se ajusta la información de la línea.
- Ajustar el tipo de línea a “ESTÁNDAR”, indicar el total de la masa que se va a manejar, las unidades, y después se selecciona el tipo de proteína que se



está manejando (de alta o baja densidad o ambas), se edita y se cierra la ventana.

- Después se indica el tipo de línea que se encuentra después del peso molecular o sea “EXPERIMENTAL”, se prosigue a ponerle nombre o concentración, según sea el caso, y así consecutivamente, hasta terminar de nombrar todas las líneas de los carriles.
- Una vez concluida esta acción, en la barra de herramientas se selecciona el comando “VIEW” el cual desglosa el análisis completo que se le ha realizado al gel.²⁵

En la figura 21, se muestra la pantalla que se obtiene después de un análisis realizado a un gel de acril-bisacrilamida.

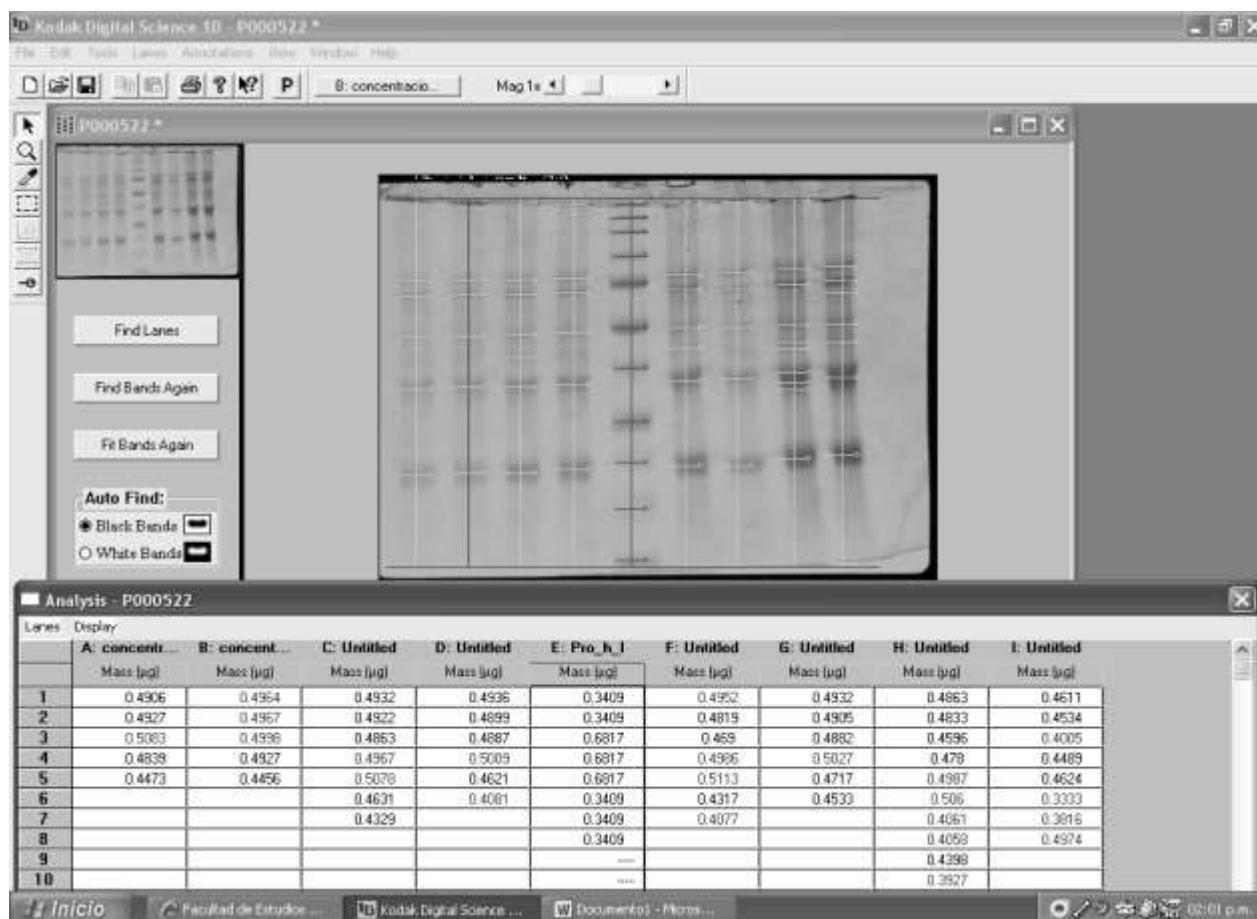


FIGURA 21. Desglose del análisis realizado a un gel.



ANEXO H
IMÁGENES DE LOS GELES OBTENIDOS POR EL MÉTODO DE
ELECTROFORESIS

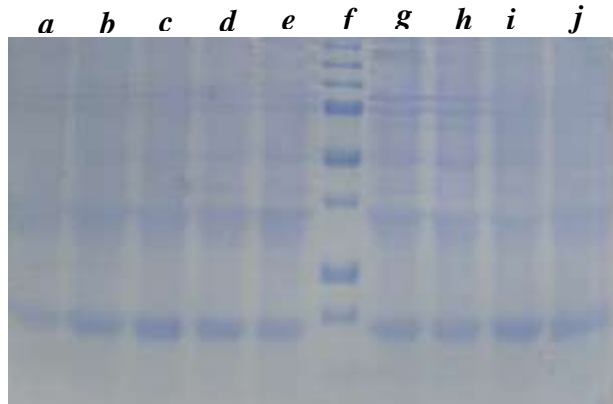


Figura 22: *a, b, c, d, e, g, h, i, j* concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *f* PM.

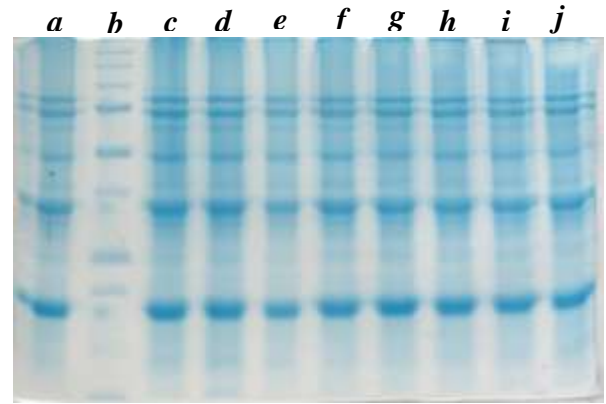


Figura 23: *a, c, d, e, g, h, i, j* concentración de $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *b* PM.

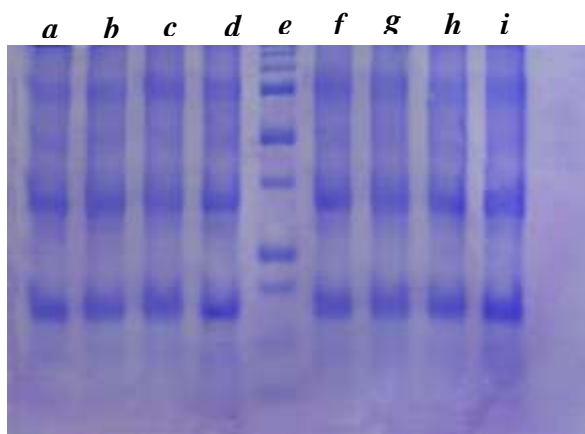


Figura 24: *a, b, c, d, f, g, h, i* concentración de $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *e* PM.

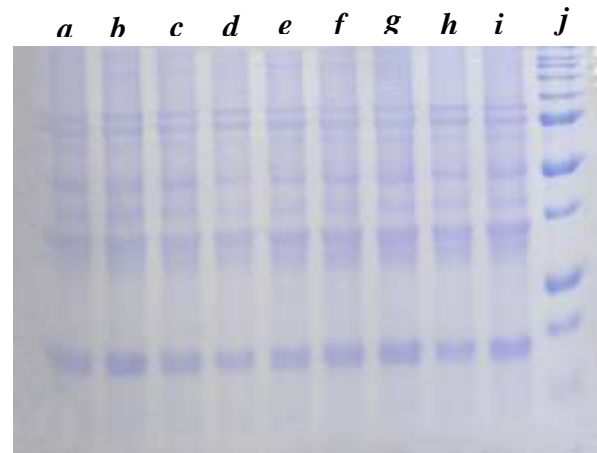


Figura 25: *a, b, c, d, e, f, g, h, i* concentración de $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *j* PM.

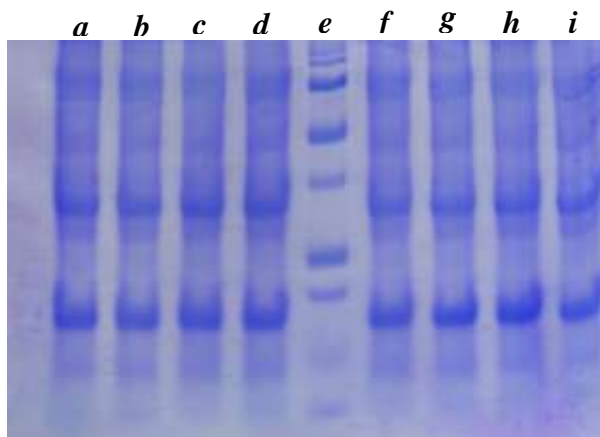


Figura 26: *a, b, c, d, f, g, h, i* concentración de $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *e* PM.

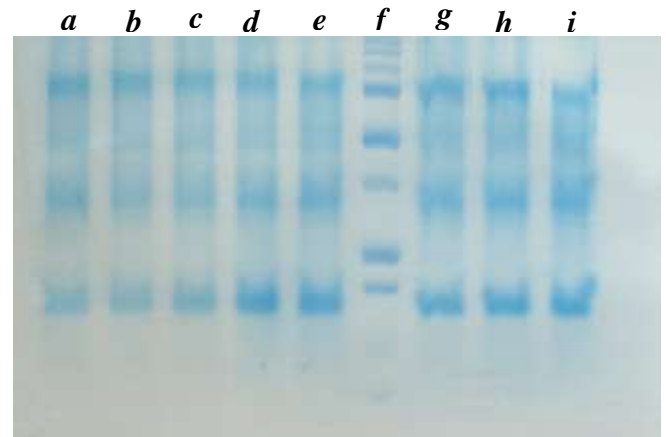


Figura 27: *a, b, c, d, e, g, h, i* concentración de $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *f* PM.

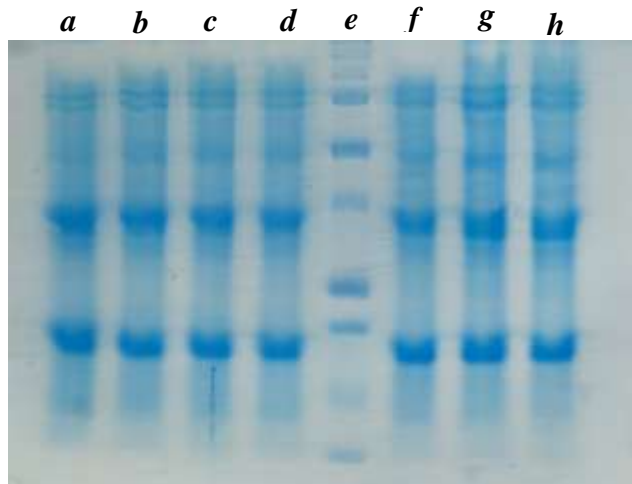


Figura 28: *a, b, c, d, f, g, h* concentración de $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *e* PM.

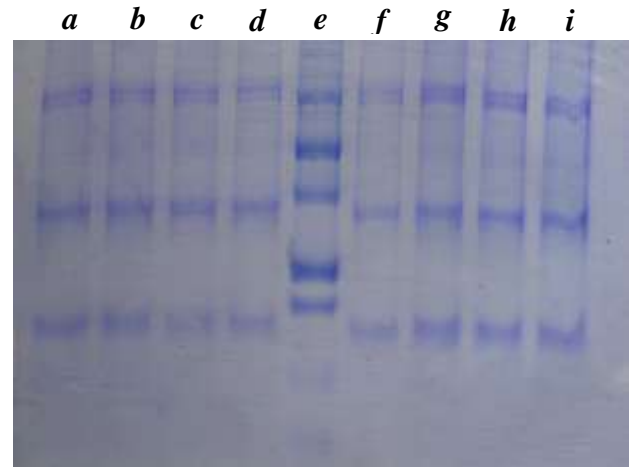


Figura 29: *a, b, c, d, f, g, h, i* concentración de $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *e* PM.

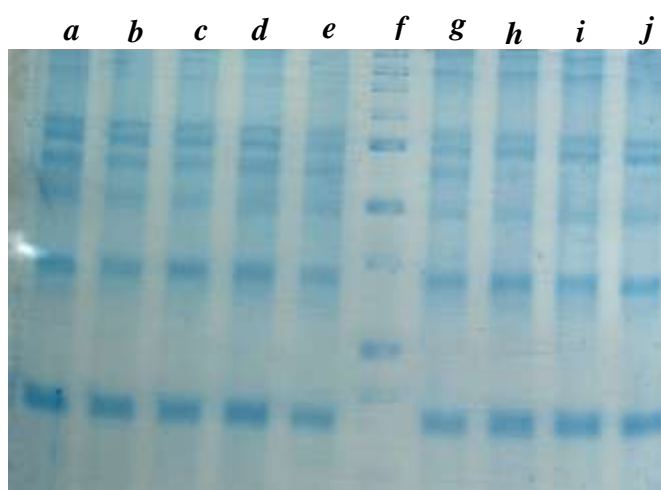


Figura 30: *a, b, c, d, e, g, h, i, j* concentración de $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *f* PM.

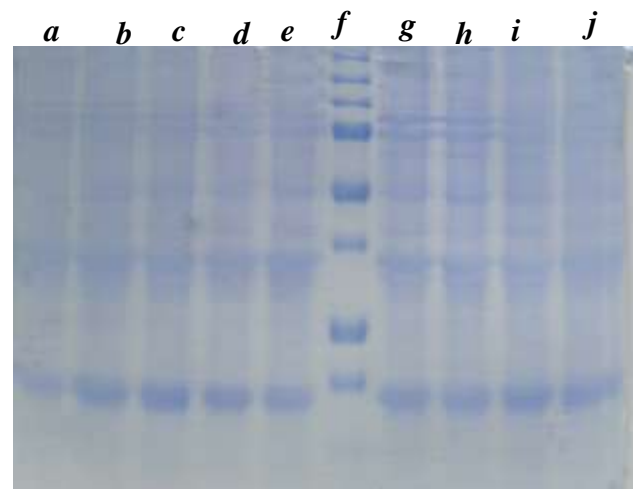


Figura 31: *a, b, c, d, e, g, h, i, j* concentración de $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *f* PM.

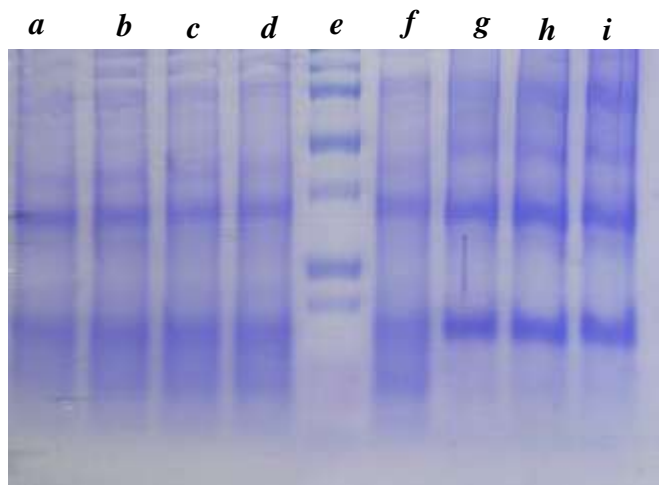


Figura 32: *a, b, c, d, f, g, h, i* concentración de $2.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *e* PM.

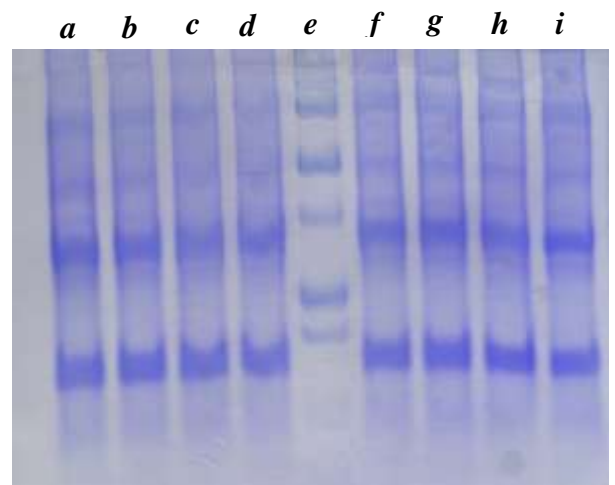


Figura 33: *a, b, c, d, f, g, h, i* concentración de $3.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *e* PM.



a b c d e f g h

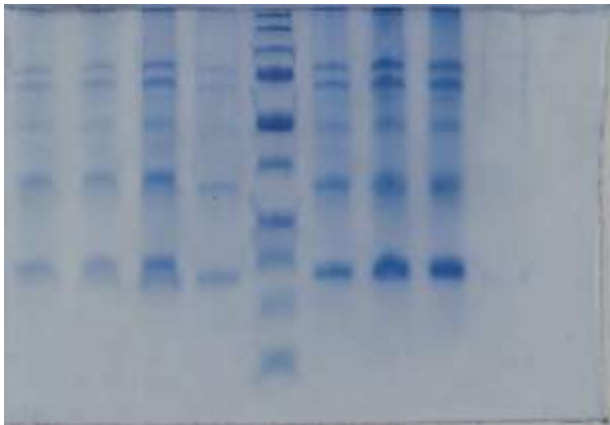


Figura 34: *a, b* 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, *c, d* 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;
e PM, *f* 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, *g, h* 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;

a b c d e f g h i

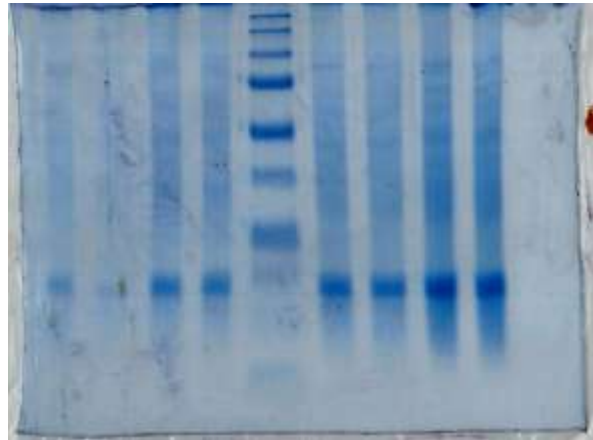


Figura 35: *a, b* 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, *c, d* 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;
e PM, *f, g* 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, *h, i* 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

a b c d e f g h i

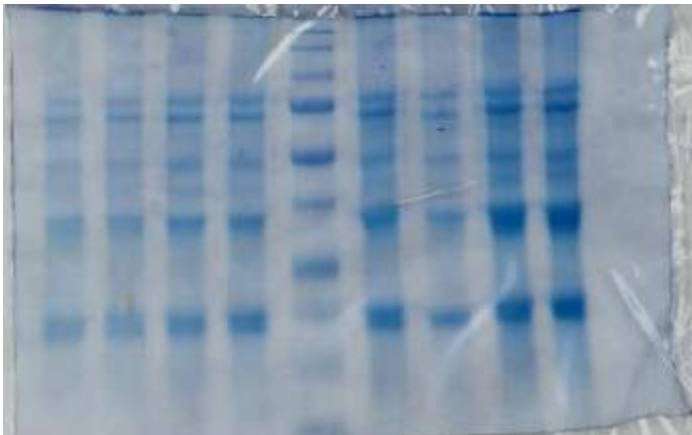


Figura 36: *a, b* 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, *c, d* 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *e* PM,
f, g 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, *h, i* 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

a b c d e f g h

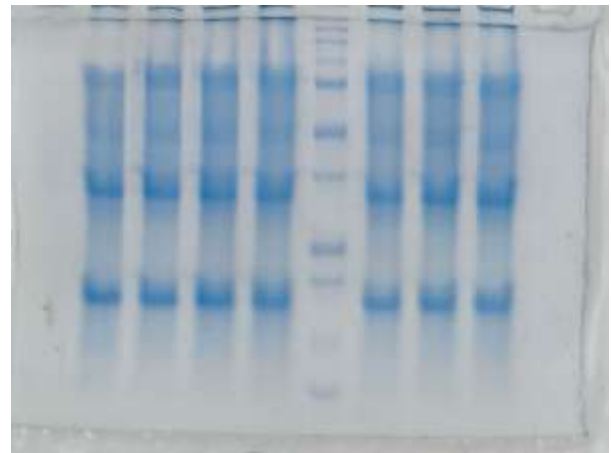


Figura 37: *a, b, c, d, f, g, h* concentración
de 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *e* PM.

a b c d e f g h i j

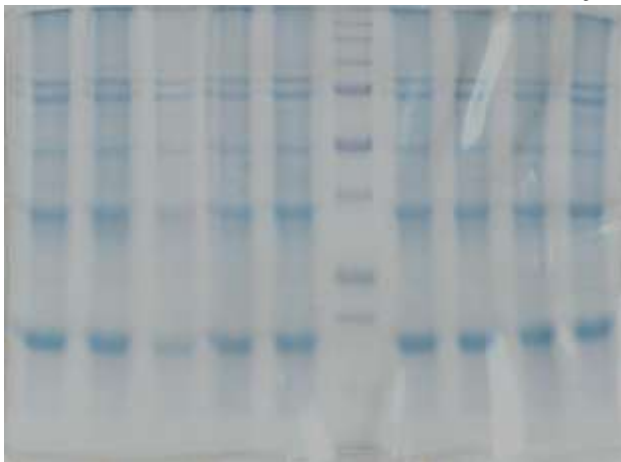


Figura 38: *a, b, c, d, e, g, h, i* concentración
de 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *f* PM.

a b c d e f g h i

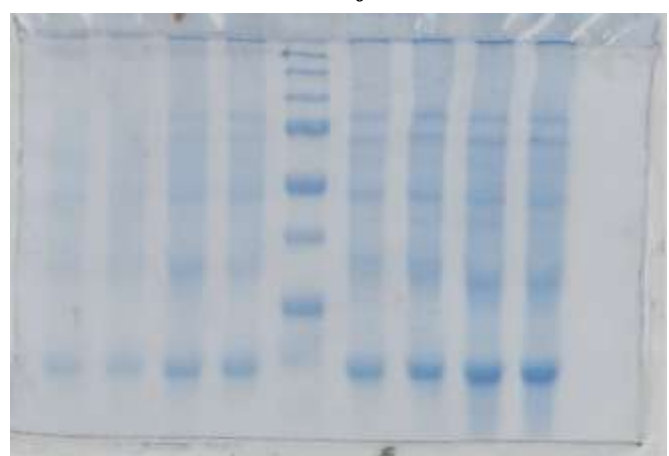


Figura 39: *a, b* 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *c, d* 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;
e PM, *f, g* 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; *h, i* 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$