

300627

24



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

VALIDACION DEL METODO DE INMUNODIFUSION RADIAL (IDR) PARA DETERMINAR PROTEINA DE SOYA COMO ADULTERANTE EN SALCHICHA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A

María del Carmen Casellas Benito
Ernesto Octavio Salinas Gómez-Roel

Asesor Interno: Q.B.P. Guadalupe Morales M.
Asesor Externo: Q.F.B. Luz Sandra Sánchez del Angel



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 está 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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., bajo la acesoria de la Q. Luz Sandra Sánchez del Angel.

Indice.

Página.

Objetivos.

- Objetivo general. 1
- Objetivos particulares. 1

1.- Introducción. 3

2.- Generalidades de la soya. 6

2.1 Historia. 6

2.2 Descripción botánica. 7

2.3 Composición bromatológica. 9

2.3.1 Proteína de soya.

2.3.2 Acidos grasos de la soya.

2.3.3 Hidratos de carbono, vitaminas y minerales de soya.

2.4 Derivados de la soya y usos 18

2.4.1 Derivados de soya en productos cárnicos.

3.- Embutidos 25

3.1 Antecedentes. 25

3.2 Definición. 25

3.3 Clasificación. 26

3.4 Composición. 26

3.4.1 Composición cárnica.

3.4.2 Humedad.

3.4.3 Condimentos.

3.5 Elaboración de un embutido. 35

3.5.1 Picado.

3.5.2 Mezclado.

3.5.3 Emulsificación.

3.5.4 Embutido y relleno.

3.5.5 Elaboración y amarrado.

3.5.6 Tratamiento térmico y ahumado.

3.5.7 Enfriado

3.5.8 Pelado y empaque.

4.- Aditivos.	39
4.1 Generalidades.	39
4.2 Tipos de aditivos.	40
4.3 Aditivos, enlazantes y rellenos.	42
4.3.1 La soya como aditivo enlazante.	
5.- Técnicas de análisis.	44
5.1 Antecedentes.	44
5.2 Microscopía e histoquímica.	44
5.3 Análisis químico de constituyentes proteicos del frijol de soya.	45
5.4 Análisis de aminoácidos y péptidos.	45
5.5 Métodos electroforéticos.	46
5.6 Adición de rastreadores.	47
5.7 Métodos inmunológicos.	47
5.7.1 Doble difusión en gel.	
5.7.2 Inmunodifusión radial y validación de la técnica	
6.- Material y método.	50
6.1 Obtención del antígeno.	50
6.1.1 Extracción de las globulinas de soya.	
6.1.2 Tratamiento térmico.	
6.1.3 Cuantificación de las proteínas de soya.	
6.2 Obtención del antisuero.	51
6.2.1 Esquema de inmunización.	
6.2.2 Titulación del suero.	
6.2.3 Sangría del conejo.	
6.2.4 Esterilidad del suero.	
6.2.5 Concentración y almacenamiento del suero.	
6.3 Pruebas cruzadas.	53
6.4 Aplicación de la técnica IDR.	54
6.4.1 Preparación de las salchichas.	
6.4.2 Extracción de la FTE de las salchichas elaboradas.	
6.4.3 Preparación de las placas IDR.	
6.5 Presentación de resultados.	58

	Página
6.6 Validación de la técnica	59
6.7 Elaboración de la tabla patrón	61
7.- Resultados.	62
7.1 Obtención del suero.	62
7.2 Diámetro de los halos de las diferentes salchichas.	62
7.3 Gráfica de los valores de la técnica de IDR	68
7.4 Validación de la técnica.	70
7.5 Cruzamiento de especies animales.	72
8.- Discusión de resultados.	73
8.1 Gráfica IDR.	73
8.2 Validación de la técnica.	73
a) Sensibilidad.	
b) Especificidad.	
c) Precisión.	
d) Exactitud.	
8.3 Cruce de especie animal.	75
9.- Conclusiones.	76
10.- Anexos.	
Anexo 1	78
Anexo 2	80
Anexo 3	82
11.- Bibliografía.	83

**VALIDACION DEL METODO DE INMUNODIFUSION RADIAL (IDR)
PARA DETERMINAR PROTEINA DE SOYA COMO ADULTERANTE EN SALCHICHA.**

OBJETIVOS :

Objetivo general :

Estandarizar una técnica analítica, reproducible y confiable para poder cuantificar la cantidad de soya presente en salchicha.

Objetivos particulares :

Obtener la fracción termoestable (FTE) de las proteínas de la harina de soya y utilizarla para inocular conejos y generar así un suero anti-fracción termoestable.

Evaluar el suero anti-fracción termoestable y poderlo utilizar para la identificación de soya por el método de Inmunodifusión radial.

Determinar la sensibilidad, especificidad y comprobar la precisión y exactitud de la técnica antes mencionada.

Elaborar una tabla patrón donde se represente la

concentración de soya presente en base a los resultados obtenidos en la prueba.

Recomendar la técnica que por sus características cuantitativas, económicas y de fácil aplicación se seleccione para su uso continuo en diferentes laboratorios de análisis.

1.- Introducción

Se ha hablado mucho estos últimos años acerca de alimentos cárnicos sanos e higiénicos debido a que la elaboración de estos productos y su comercialización constituyen actualmente empresas sumamente competitivas. Sin embargo la posibilidad de adulteración tanto accidental como provocada existe desde el momento en el que el animal ingresa en un lote de engorda, hasta su empaque para el uso del consumidor. Esto crea la necesidad de un programa de control continuo (18).

El grado de adulteración más alto es en los productos cárnicos que reciben el nombre de " embutidos "; el cual se define como el producto de carne de res, cerdo o ambas que picada y aderezada se coloca en el interior de una tripa natural o sintética y que posteriormente recibe un tratamiento que determina sus características (13).

Los embutidos se pueden clasificar en 3 grandes grupos de acuerdo a su tratamiento : Embutidos crudos madurados, embutidos cocidos y embutidos escaldados (13).

La industria de la carne dispone de una gran variedad de productos no cárnicos entre los cuales se eligen los más convenientes para incorporarlos a los embutidos, estos pueden ser en su mayoría: agua, cereales, grasas, leches descremadas en polvo, etc., con propiedades de : relleno, liqantes, estabilizantes o emulsificantes (21).

Estos se le agregan a la formulación básica de la carne por razones diversas como lo son :

- para mejorar la estabilidad de la emulsión.
- para mejorar el rendimiento durante la cocción.
- para mejorar las características del corte.
- para mejorar el sabor.
- para reducir los costos de formulación.

Esta sustitución accidental o intencional representa un fraude al consumidor y es objetable por razones de cultura, religión y posiblemente de salud (21).

Dentro de los productos no cárnicos el más usado en los embutidos es la soya, conocido como el único ligante de origen vegetal. Este producto se utiliza como aditivo por su alto contenido proteico y por su elevado contenido en aminoácidos particularmente lisina, leucina e isoleucina (28).

La soya se puede utilizar en diferentes presentaciones como harina de soya texturizada, proteína texturizada, concentrado de proteína y fibras separadas de las proteínas de soya. En donde cada una imparte según sus condiciones específicas características determinadas (21).

Cuando se añade aisladamente algún derivado de soya a determinado producto cárnico se permite hasta un 2 %, si es mayor esa concentración el producto deberá llevar una etiqueta con la leyenda " imitación " (21).

Dentro de los embutidos escaldados se encuentra la salchicha, la cual lleva un proceso térmico llamado escalde, para que adquiera su consistencia característica. A éste también se le conoce como emulsión porque en ellos se mezcla el agua, la grasa y las proteínas, elementos que generalmente no se pueden combinar para dar lugar a un producto homogéneo. Es precisamente en esta etapa de emulsión donde pueden ser adulterados fácilmente por la adición de soya y almidones. Por esta razón se validará un método analítico para determinar la concentración de soya en salchicha y se estructurará el método para poder tener un uso posterior en el análisis de salchicha para así clasificarla como producto posiblemente adulterado .

Este método es :

El método de Inmunodifusión radial el cual se basa en reacciones antígeno-anticuerpo en condiciones estandarizadas, en donde reaccionará un suero inmune creado contra las fracciones termoestables (FTE) de la proteína de harina de soya. Los productos que contengan proteína de soya formarán un halo de precipitación cuyo diámetro será directamente proporcional a la concentración de globulinas termoestables según la cantidad de proteínas de soya presente (4).

2.- Generalidades de la soya.

2.1 Historia.

La soya se originó en Asia, específicamente en el centro de Vavilov (China) hace aproximadamente 5000 años, y desde entonces ha sido parte esencial en la alimentación de los pueblos orientales (6).

En 1712 la soya se introdujo en el hemisferio occidental por Engelbert Kaempfer, y fué hasta el año de 1804 cuando se llevó a los Estados Unidos de Norteamérica, en donde actualmente este país es el mayor productor de soya y uno de los países que mayor utilidad le está dando a esta oleaginosa (6).

La soya se introdujo por primera vez en México en el año de 1911 y solo se destinó a la experimentación. En un principio se pensó que podía sustituir al frijol, sin embargo por las desventajas encontradas en : sabor, dificultad de cocción, y principalmente la falta de costumbre, ésto fué imposible.

Tras prolongada investigación y experimentación, se lograron evidencias sobre las múltiples ventajas de la soya y los métodos más adecuados sobre el cultivo de la misma.

Después de encontrar las variedades que se adaptaran mejor al clima y el suelo del país, además de estudiar el aprovechamiento integral del grano, se logró en 1958 introducir en forma comercial el cultivo de la soya en el estado de Sonora,

difundiéndose posteriormente a otras regiones del país (6).

Actualmente la soya se cultiva en una gran extensión de Estados Unidos de América (más de 16 millones de Ha.) ocupando uno de los primeros lugares en los cultivos de ese país. En Estados Unidos se produce el 67 % de la producción mundial de soya, siguiéndole en importancia China con más de 14 millones de Ha. de cultivo y aproximadamente el 25 % de la producción mundial, Rusia con más de 850 mil Ha., Indonesia con más de 650 mil Ha., y otros productores menores como Corea del Sur, Canadá, y Paraguay, en México aunque la soya es considerada como uno de los 11 cultivos básicos, su participación en la agricultura nacional representa un bajo porcentaje (30).

2.2 Descripción botánica.

El nombre botánico de la soya es Glicine max, y es una planta anual de primavera-verano, cuyo ciclo vegetativo oscila entre 3 y 7 meses. Su desarrollo puede variar desde 40 centímetros hasta 1.50 metros según la variedad y condiciones de cultivo.

La soya pertenece a la familia de las leguminosas, tiene consistencia herbácea y tallos rígidos y erectos (20).

Existen más de 3000 variedades de soya, las cuales pueden adaptarse a diversos tipos de tierra y de climas, pero se desarrollan optimamente en regiones cálidas y tropicales. Esta

planta se adapta a una gran variedad de latitudes que van desde 0 a 38 grados, los mejores rendimientos de la cosecha se obtienen a menos de 1000 metros de altura (6).

Semilla.

Es de forma elíptica o redondeada, su color cambia según la variedad, puede ser amarilla, verde, café o negra, pero también puede ser de dos colores, generalmente amarillas o verdes con tonos pardos extendidos en la parte de abajo y a cada lado del hilo o cicatriz de la semilla. En condiciones adecuadas de humedad y temperatura (aproximadamente 35°C) la semilla germina rápidamente.

Raíz.

La raíz de la planta puede alcanzar una profundidad hasta de 3 metros, la soya obtiene su requerimiento de nitrógeno del aire, a través de la bacteria nitrificante Rhizobium japonicum que es específica para esta planta. Este microorganismo provoca la formación de nódulos en la raíz por medio de los cuales se realiza el proceso de nitrificación.

Tallo.

La longitud del tallo varía de 0.60 a 1.20 metros, los tallos son leñosos y se encuentran recubiertos de una pelusa gris o marrón.

Hojas.

La soya tiene hojas alternas trifoliadas, con los folíolos oval-lanceolados y el peciolo acanalado en su parte superior, son en sí hojas gruesas, con pubescencia gris o marrón y posteriormente se vuelven las hojas amarillas y caen cuando la vaina madura.

Flor.

La planta de la soya presenta gran cantidad de flores, estas se presentan en inflorescencias racemosas muy pequeñas de color púrpura o blanquesino, teniendo las características típicas del género, los estambres son generalmente monoadelphos.

Fruto.

El fruto está constituido por las vainas, empieza su formación de 10 a 14 días después de la floración. Las vainas contienen de dos a tres semillas (32).

2.3 Composición Bromatológica.

El frijol de soya posee el mayor contenido proteico entre los vegetales, alrededor de un 40 % en base seca, contiene un alto contenido de lípidos, alrededor de un 20 %, encontrándose preponderantemente ácido linoleico, ácido linolénico y oleico. Posee un 25 % de carbohidratos, entre los cuales está el almidón, sacarosa, galactosa, pentosa, rafinosa, y otros no digeribles que

ocasionan problemas en la digestión.

Posee una buena cantidad de minerales como : fósforo, hierro, magnesio y calcio, entre las vitaminas presentes se encuentran las del complejo B, E y K (17).

Se ha demostrado que la soya tratada térmicamente es mejor porque así se destruyen factores anti-nutricionales presente en ella, aunque un sobre calentamiento presenta pérdida de aminoácidos disminuyendo su valor proteico (23).

Una de las mayores objeciones a la aceptación de la soya es su acendrado sabor a frijol producido por una gran cantidad de compuestos volátiles y no volátiles, como compuestos carbonílicos, ésteres, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, algunas aminas y alcoholes, siendo responsable de la producción de estos compuestos químicos la enzima lipoxigenasa (6).

2.3.1 Proteínas de la soya

Las proteínas de soya constituyen una compleja mezcla de componentes, generalmente dividida en dos categorías : las de reserva y las proteínas biológicamente activas. Las proteínas de reserva están localizadas en partículas intra-celulares de los cotiledones llamadas cuerpos proteicos. Las proteínas biológicamente activas, incluyen numerosas enzimas así como otras proteínas con actividad biológica específica (inhibidores de proteasas y hemaglutininas) (33).

Aminoácido	Harina de soya desengrasada	Harina de trigo	Proteína de huevo
Isoleucina	119	116	129
Leucina	181	195	172
Lisina	161	82	125
Fenilalanina	117	140	114
Tirosina	91	97	81
Aa. Aromáticos	208	237	195
Cisteína	37	64	86
Metionina	37	49	61
Aa. Azufrados	74	113	107
Treonina	101	88	99
Triptofano	30	40	31
Valina	126	131	41

Fuente Smith and Circle, 1978 (6).

Tabla 1. Valores de aminoácidos presentes.
mg. de aa / gramo material.

El análisis de las proteínas de soya por electroforesis, filtración en gel, puntos isoeléctricos y patrón típico de ultracentrifugación, muestran cuatro fracciones designadas : 2,7,11 y 15 s, en base a sus coeficientes de sedimentación (16).

- Fracción 2s.

En esta fracción se encuentra el citocromo C, una globulina llamada conglucina, la cual posee actividad inhibitoria de tripsina y a ella se deben los problemas nutricionales de los alimentos elaborados a partir de proteína de soya (16).

- Fracción 7s.

La fracción 7s consiste en cuatro proteínas diferentes, hemaglutinina, lipoxigenasa, beta-amilasa y un componente llamado globulina 7s. esta fracción constituye un tercio del total de las proteínas de soya (16).

- Fracción 11s.

Es la fracción quizá más importante de la soya constituye un tercio del total de las proteínas del grano. Contiene grandes cantidades de ácido glutámico y aspártico, así como también contiene proporciones de histidina, metionina, cisteína, tirosina y triptofano (16).

- Fracción 15s.

Esta fracción ha sido imposible aislarla por métodos fisicoquímicos, sólo se ha podido aislar por métodos

inmunoquímicos y se ha llegado a la conclusión que la fracción 15s también llamada conglucina resulta de una polimerización de la fracción 7s (16).

-Efectos del calor :

Los alimentos son siempre calentados durante el proceso o en la preparación de la comida, consecuentemente las proteínas de soya usadas como ingrediente en estos alimentos se exponen a degradaciones por tratamientos térmicos. De estas degradaciones se conoce muy poco, se dice que afecta a nivel molecular y se manifiesta como una pérdida de solubilidad, en donde la presencia o ausencia de grasa no afecta la solubilidad de estas proteínas (22).

Tras diversos estudios se demostró en 1937 la existencia de una fracción de las proteínas de soya que conserva su estructura aún después de un tratamiento térmico (121 C), a la cual se le ha denominado fracción termoestable de las proteínas de soya (22)

Se encuentran tres fracciones que se distinguen en el aislamiento térmico de las proteínas de soya, la primera denominada caseína (no está relacionada con la caseína de la leche) es extraída con una solución alcalina de pH 9, y comprende el 90 % total de proteínas, el segundo componente lo llamaron caseína insoluble y el tercero lo llamaron albúmina. (independiente a la albúmina de huevo) (22).

2.3.2 Ácidos grasos de la soya.

Las grasas son sustancias biológicas insolubles en agua, y son una fuente concentrada de energía para el organismo.

En lo que se refiere a la soya, este grano contiene un 20 % de grasa, se extrae en forma de aceite, cuyo contenido de grasas saturadas es bajo en comparación a la de la grasa animal. El aceite de soya se destaca por su alto contenido de ácido linoleico, que es un ácido esencial para el crecimiento y el mantenimiento del cuerpo humano. El aceite de soya tiene tanto aplicaciones en la industria de alimentos como en la industria manufacturera. Su utilización es en grandes campos, para la elaboración de aceites vegetales mixtos, margarinas, mayonesas, aderezos, así como para la fabricación de tintas, pinturas y para el control del polvo en silos de granos.

Aproximadamente del 1.5 al 2.5 % de la grasa presente en la soya se encuentra en forma de lecitina, la cual es un fosfolípido que se separa del aceite de soya a través de un proceso de desgomado este compuesto está formado por dos fosfolípidos conocidos como : Colina e Inositol. La lecitina de soya tiene un alto valor comercial y es utilizada en la industria como emulsificante, así como también es utilizada en la industria farmacéutica por tener ciertas propiedades curativas.

Otro compuesto de interés en la grasa de la soya, son los tocoferoles, que se encuentran en muy pequeñas cantidades (0.15 - 0.21%), los cuales actúan como antioxidantes naturales y

tienen las funciones de la vitamina E, es decir inhiben la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados, y así mismo retardan la aparición de la rancidez en aceites comestibles, o en alimentos con alto contenido de grasa (6).

2.3.3 Hidratos de carbono, vitaminas y minerales de la soya.

Los principales azúcares en el frijol de soya maduro son : La sacarosa como disacárido, la rafinosa como trisacárido y la estaquiosa como un tetrasacárido, un dato importante es mencionar que el frijol de soya no contiene almidón, un polisacárido que comunmente se encuentra en las leguminosas.

Por otro lado la soya también contiene diferentes cantidades de vitaminas y minerales, dependiendo de su estado de madurez, aunque en general la soya no es alimento rico en estos nutrimentos (6).

VITAMINAS (mg/g)	DIFERENTES PRODUCTOS DE SOYA				
	Frijol	Germinados	Harina	Queso	Leche
Tiamina	1.1 - 1.7	1.19-2.1	1.1-1.5	0.39	0.08
Beta-Caroteno	0.02-0.04				0.75
Riboflavina	0.2 -0.23	0.48-0.7	0.4-0.44	0.37	0.11
Niacina	2.0 - 2.5	2.9 -4.8	2.0-2.90	0.55	0.25
Ac.Pantoténico	1.2	1.8-3.40	4.7-5.60		
Piridoxina	0.64	1.4-1.70			
Ac.Fólico	0.23	0.37	0.08-0.09		
Inositol	1.9-2.60	2.5-3.9			
Colina	3.4				
Ac. Ascórbico	0.2	0.4			21.6
MINERALES					
Calcio (%)	0.16-0.47	0.40	0.42-0.64	0.80	0.76
Fósforo (%)	0.42-0.82		0.60	0.8-1	0.15
Magnesio (%)	0.22-0.24				
Zinc (mg/kg)	37				
Hierro (mg/kg)	90 - 150	100	110 - 160	105	68
Manganeso (mg/kg)	32				
Cobre (mg/kg)	12				

Fuente Smith and Circle, 1978 (6).

Tabla 2. Vitaminas y minerales en productos de soya.

2.4 Derivados de la soya y usos.

En el mercado se encuentran varias presentaciones comerciales de derivados de soya, que se pueden clasificar de acuerdo a su utilidad en :

A) Uso industrial

B) Uso alimenticio -----> a) uso animal
b) uso humano

Cada uno de estos productos tiene ciertas características y propiedades funcionales que los hacen adecuados para utilizarse en la elaboración de diferentes productos (2).

A) Uso industrial: A partir del aceite de soya se obtienen mediante procesos de extracción: jabones, linoleos, esmaltes y lacas entre otros. A partir de la harina se puede obtener: plásticos, pegamentos, pinturas, etc.

B) Uso alimenticio:

a) Animal: Los animales pueden consumir el follaje de la planta de soya, la pasta o torta la cual es residuo de la extracción de aceite de soya.

b) Humano: La soya constituye una fuente muy nutritiva para el ser humano, por ella se busca introducirla dentro de la dieta diaria, elaborando así: pan, pastas, harinas, leches, aceites, etc. (2).

2.4.1. Derivados de soya en productos cárnicos

En la elaboración de productos cárnicos los derivados de soya más utilizados son: hojuelas desengrasadas de soya, harina y sémola de soya, concentrados de proteína de soya, aislados de proteína de soya y fibras texturizadas.

1.- Hojuelas desengrasadas de soya :

Para obtener las hojuelas de soya, el grano se limpia, tritura y descascarilla. Las partículas de frijol se ablandan calentándolas con vapor ajustando humedad para así obtener hojuelas laminadas, las cuales se pasan por un disolvente generalmente hexano para extraer el aceite, obteniéndose así una torta o residuo con un contenido de proteína del 50% de donde se elaboran la mayoría de los derivados de soya.

Para eliminar el disolvente se procede a aplicar un tratamiento térmico con vapor sobre las hojuelas desengrasadas, en donde dependiendo de la temperatura, humedad y tiempo se obtendrán tres clases de hojuelas : blancas, cocidas y tostadas.

Las hojuelas blancas contienen ureasa, lipoxigenasa y factores anti-tripsicos activos. Su sabor es parecido al del frijol amargo. Las hojuelas tostadas son de color oscuro; no poseen actividad enzimática por los factores anti-tripsicos debido a que se desnaturalizaron con la temperatura, su sabor es a nuez dulce. Las hojuelas cocidas presentan propiedades intermedias entre las dos anteriores (2).

CARACTERISTICAS	BLANCA	COCIDA	TOSTADA
Tratamiento térmico	minimo	intermedio	intenso
Dispersabilidad de las proteínas en agua	50 - 80%	25 - 50%	menos de 25%
Actividad enzimática	alta	moderada	nula
Actividad de inhibidores de tripsina	alta	moderada	nula
Sabor	amargo	intermedio	dulce

Tabla 3. Características de las hojuelas de soya desengrasada.

2.- Harina y sémola de soya :

La harina y la sémola de soya se obtienen de la molienda de las hojuelas desengrasadas y secas. El contenido de proteína y las demás propiedades de las hojuelas son las mismas que poseen la harina y la sémola. Se habla de harina y de sémola en base al tamaño de partícula, la harina se considera así cuando puede pasar a través de una malla de 100, la sémola es de un tamaño mayor de partícula y por lo tanto no puede pasar por esta malla.

Las ventajas que presenta la harina de soya son su bajo costo y la propiedad que tiene para retener agua y grasa, mientras que las desventajas son su remanente sabor a frijol y la sensación física que deja en la boca.

Para la elaboración de productos cárnicos se prefiere utilizar harina cocida o tostada, ya que la blanca presenta una actividad enzimática que puede causar problemas en la emulsificación, así mismo por esta razón, también se prefiere usar la sémola tostada (2).

3.- Concentrado de proteína de soya :

Se prepara a partir de las hojuelas desengrasadas, las cuales se someten a una extracción de azúcares y posteriormente a un secado. Después de obtener el concentrado, se somete a molienda. Los concentrados de proteína molidos, se usan de la misma manera que la harina de soya, debido a que su sabor es más suave y a su elevado contenido de proteínas se prefieren sobre la harina de soya. Los concentrados de proteína de soya tienen un contenido en base seca de hasta 70 % de proteína y así mismo estos concentrados pueden ser hidratados en un alto grado, es decir se puede dejar hasta un 18 % de humedad para la elaboración adecuada de embutidos.

4.- Aislado de proteína de soya :

Este aislado se prepara a partir de las extracciones acuosas o alcalinas de las hojuelas blancas. El residuo se separa del líquido que contiene las proteínas y estas se precipitan al utilizar un ácido orgánico de grado alimenticio. La cuajada resultante se lava, se seca por asperción o se puede neutralizar antes del secado para producir un proteinado de

sodio dispersable en agua. En ambos casos, el contenido de proteína es de un 90 % en base seca.

El aislado de proteína presenta varias ventajas : altas propiedades emulsificantes, estabilizantes de emulsiones, incrementadores de la viscosidad y formadores de geles por medio del calor.

Una emulsión perfecta se puede hacer con un 15 % de aislado de proteína un 50 % de agua y un 35 % de grasa, dando como resultado una emulsión extremadamente estable (2).

5.- Fibras texturizadas :

a) Fibras hiladas. El proceso es igual al utilizado para obtener el aislado proteico, sin embargo después de obtener la cuajada ésta se hila obteniendo así fibras alargadas que presentan una resistencia semejante a las que tienen las fibras de la carne.

Su aplicación más importante es para elaborar productos de imitación a carne, los cuales pueden soportar sin alteraciones los procesos de congelación, enlatado y secado.

b) Productos obtenidos por extrucción termoplástica : a este grupo le corresponden las proteínas de soya sometidas a un proceso de extrucción, que consiste en mezclar harina de soya, agua, saborizante y colorante, la mezcla homogenizada se somete a un calentamiento a presión atmosférica o a una presión reducida para elaborar un producto compacto o expandido respectivamente.

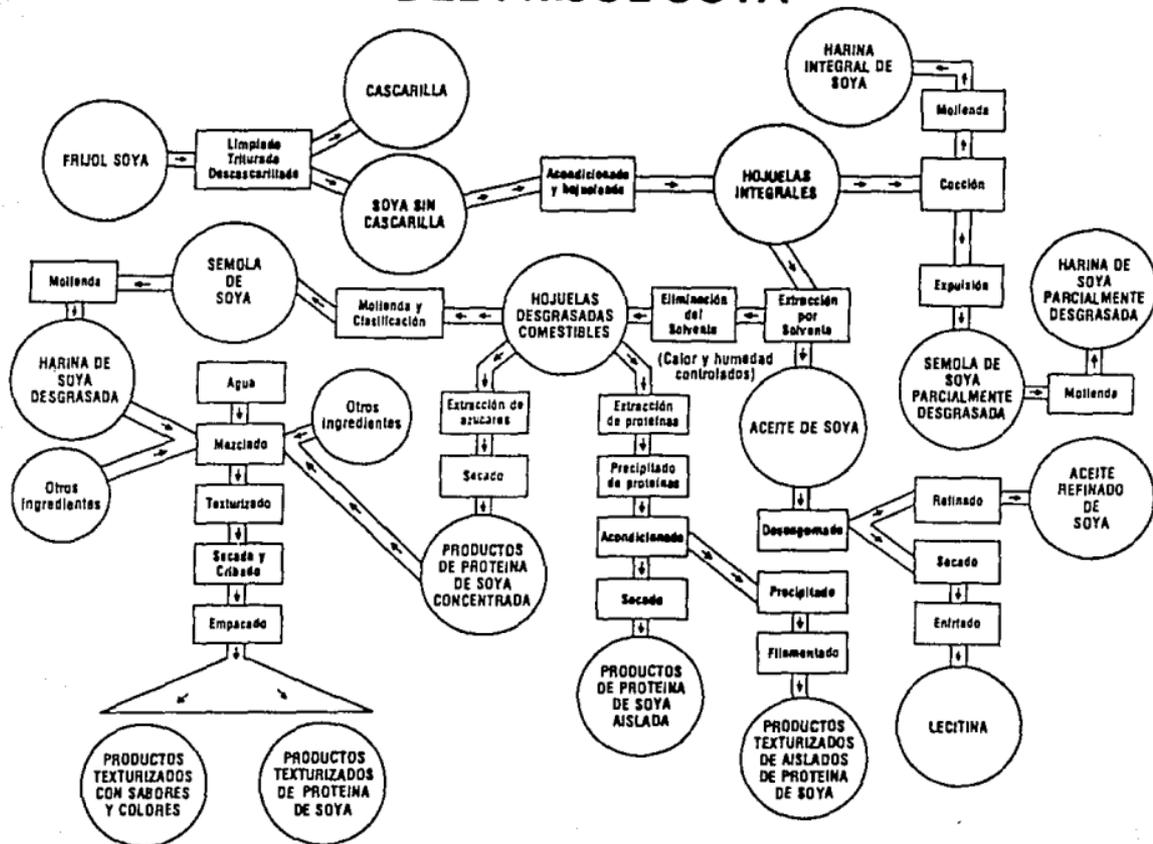
La forma y el tamaño es determinado por los troqueles utilizados. Estos productos tienen una humedad relativamente alta por lo que es necesario un secado para llegar a una humedad final de 6 a 8 %, con un contenido de 50 % de proteínas aproximadamente.

Las ventajas que presentan estos productos son un bajo costo, una buena estabilidad durante el almacenamiento y una apariencia aceptable, sin embargo tienen el inconveniente de no poder imitar el color y el sabor de los productos naturales.

6.- Hidrolizados de proteínas vegetales :

Son usados en productos de carne procesada para intensificar el sabor cuando éste se puede perder por los procesos de industrialización. Normalmente son usados en concentraciones de 0.2 a 2.0 % en base al peso del producto terminado (2).

PROCESO DE OBTENCIÓN DE PROTEÍNA DEL FRIJOL SOYA



3.- Embutidos

3.1.- Antecedentes.

El procesado de la carne se originó en tiempos prehistóricos y no hay duda de que se desarrolló tan pronto como el hombre se convirtió en cazador, posiblemente el primer tipo de carne procesada fué la desecada al sol y posteriormente sobre el fuego lento, dando así un producto seco y ahumado.

El salazón y el ahumado en el año 1850 A.C. como lo habla Homero en su libro de la " Odisea " ya era una práctica común.

Al avanzar la tecnología de la conservación, especialmente la refrigeración y el envasado, se experimentó la conservación de productos cárnicos a niveles inferiores de sal y de mayor humedad, así como nuevos condimentos, aromatizantes e ingredientes, dando de esta manera diferentes productos cárnicos, que suelen ser antecedentes de los que hoy conocemos (15).

Al pasar los años las recetas originales, se modificaron de acuerdo a los materiales disponibles, condiciones climáticas y geográficas, dando como resultado los embutidos que hoy encontramos en el mercado (13,18).

3.2.- Definición.

Los embutidos son productos cárnicos picados y condimentados, algunos de estos emulsionados. El término embutido se deriva del latín " SALSUS " que significa carne picada y preservada por salazón (21).

3.3.- Clasificación.

Como ya se mencionó anteriormente los embutidos que se encuentran hoy en día en el mercado son variaciones de recetas, ingredientes y procesos, dentro de los cuales encontramos :

- 1.- Frescos,
- 2.- Crudos y ahumados,
- 3.- Cocidos y ahumados.
- 4.- Cocidos,
- 5.- Secos o fermentados,
- 6.- Especialidades cárnicas cocidas.

De los anteriores son ejemplos los siguientes :

- 1.- Embutidos frescos de cerdo.
- 2.- Embutidos de cerdo ahumado.
- 3.- Salchicha frankfurt, mortadela Bolonhesa.
- 4.- Embutidos de hígado, salamis cervecedores y cocidos.
- 5.- Embutidos de verano, salamis desecados, peperoni, chorizo.
- 6.- Luncheon meat, pan de carne (21).

3.4 Composición.

Los productos cárnicos procesados pueden llevar como ingredientes componentes muy distintos tales como carne, mezclas de curado, especias, ligantes, sustancias de relleno y agua (25).

De la elección de los ingredientes dependerán las características de su consistencia, texturas, sabor, apariencia y la tradición, la cual distingue a los embutidos; siempre se buscan elementos de mejor calidad para así tenerla en el producto (21).

3.4.1.- Componentes cárnicos.

Los tejidos animales varían mucho en su contenido de humedad, proteína y grasa, en su pigmentación y en la capacidad de ligar agua y grasa, además la carne esquelética muscular contiene otros ingredientes potenciales de los embutidos, conocidos como despojos (15).

Por otra parte el grado de desarrollo del tejido de acuerdo con la edad del animal influye también para el destino de una materia prima hacia cierto producto particular (7).

Para la elaboración de embutidos se utiliza principalmente carne proveniente de ganado porcino y vacuno, aunque puede emplearse de ovino, aves e incluso equinos, siempre y cuando la legislación lo permita (7).

3.4.2 Humedad

La humedad se pone del 45 al 60 % del peso final de los productos cárnicos procesados, (más que ninguno de los otros componentes independientes).

La mayoría del agua proviene de la carne magra, sin embargo también se adiciona agua como :

- 1) Parte de la receta para mejorar la palatibilidad del producto modificando su blandura y jugosidad.
- 2) Se adiciona el agua en forma de hielo para mantener baja la temperatura del producto durante la emulsificación.
- 3) En productos ahumados y salados sirve como medio de transporte para la distribución de los ingredientes del curado.
- 4) La humedad adicionada durante la inyección de salmuera o por inmersión en ésta, o la que se añade a las fórmulas de los embutidos, sirve también para reemplazar la que se pierde en las operaciones de procesado subsiguientes, sobre todo durante el tratamiento térmico.

Por lo tanto, mediante la adición de agua puede mejorarse el rendimiento del producto final (15). También se pueden utilizar como parte de la formulación, vino, líquidos alcohólicos o vinagre, pero todo de acuerdo al tipo de embutido, región, tradición, costumbre, sabor, etc (7).

3.4.3 Condimentos.

El término condimento se aplica a cualquier ingrediente que se adicione para modificar o mejorar el aroma de los productos cárnicos procesados además de mejorar el sabor y aroma. Algunos condimentos tienen acción antioxidante y reducen la velocidad con que se desarrolla la rancidez. La sal y la pimienta constituyen la base de las fórmulas aromatizantes de los embutidos. Todos

los demás condimentos son suplementarios y se pueden dividir en :
especias, hierbas, hortalizas, edulcorantes y otros.

- Especias. Las especias son sustancias vegetales aromáticas desecadas, derivadas de diferentes porciones del vegetal (flor, cubierta, rizoma, corteza de tallo, tallo, raíz, etc). Aquí se incluyen las semillas aromáticas como el cardamomo y la mostaza.

Las especias se usan enteras, molidas o procesadas en forma de aceites esenciales y oleorresinas que son extraídas por destilación, absorción u otro proceso industrial (15,21).

A continuación se muestra una tabla de especias y sus usos más comunes en embutidos.

Especia	Porción del vegetal	Región de producción	Uso
Pimienta de jamaica	Fruto maduro	Jamaica, Cuba Haiti	Mortadela
Anís	Fruto maduro	Rusia, Alemania España, Francia	Embutidos secos.
Laurel	Hojas desecadas	Mediterráneo	Adobos de embutidos
Cardamomo	Semilla madura	India, Guatemala	Salchicha
Casia	Corteza desecada	China, India	Mortadela Embutidos de sangre
Apio	Semillas y fruto maduro	Europa del sur	Embutidos de cerdo
Canela	Corteza desecada	Sri Lanka, Vietnam	Mortadela
Clavo	Flor desecada	Brasil, Sri Lanka	Mortadela Embutidos de cabeza
Coriandro	Fruto maduro	Inglaterra, Alemania	Salchicha
Comino	Semillas maduras	Europa meridional Indias, China	Curry en polvo
Ajo	Bulbos frescos	España, Francia, México, E.U. Sud-América	Embutidos ahumados
Gengibre	Rizoma desecado	Jamaica, Africa Occidental	Embutido de cerdo Salchicha

Tabla 4. Especies y origen de las corrientemente empleadas en las carnes procesadas (15).

Especia	Porción del vegetal	Región de producción	Uso
Macis	Cubierta de la Nuez moscada	Sur de Asia	Salchicha, Mortadela
Mejorana	Hojas desecadas	Norte de Africa	Embutidos de hígado
Mostaza	Semillas maduras	China, Japón, Italia, E.U.A.	Todos los embutidos
Nuez Moscada	Semilla madura	Sur de Asia	Mortadela Salchicha
Cebolla	Bulbo fresco	Todo el mundo	Embutido de hígado
Pimentón	Fruto maduro	España, Hungría	Salchicha, embutidos secos.
Pimienta	Fruto maduro	Singapur, Tailandia	Todos los embutidos
Pimiento	Fruto maduro	España, E.U.A.	Bloques de carne
Tomillo	Hojas y cabeza floral	Costa mediterránea	Todos los embutidos

Tabla 4. (continuación)

- Hierbas y hortalizas. Estas son hojas secas de vegetales entre las cuales citaremos a la salvia, ajendrea, tomillo y el orégano, etc.

Un punto importante a cuidar en el uso de estos condimentos es la calidad bacteriana, ya que generalmente se encuentra alta en microorganismos, esto se debe a su forma de recolección, secado y distribución de estas hierbas y hortalizas. Para evitar este problema se extraen las oleorresinas de los condimentos y los aceites esenciales de las frutas.

Edulcorante.

Son sustancias que proporcionan dulzor, dentro de las cuales encontramos sacarosa, la dextrosa, el jarabe de maíz, y la lactosa (3,15,21).

Otros ingredientes.

La industria de la carne dispone de una gran variedad de productos no cárnicos entre los cuales se deben de elegir los que se desee incorporar a los embutidos. Estas sustancias no cárnicas se denominan, ligantes, rellenos, emulsificantes o estabilizadores.

Se añaden a la formulación básica de carne por una o varias razones :

- 1) Para mejorar la estabilidad de la emulsión.
- 2) Para mejorar el rendimiento durante la cocción.
- 3) Para mejorar la característica de corte.

4) Para mejorar el sabor.

5) Para reducir los costos de formulación (15,21).

Ligante.

Este ingrediente se refiere a la capacidad de retener agua en las carnes magras o a la adherencia mutua de los trozos de carne, además de ser capaz de emulsionar la grasa. El principal componente de los ligantes son las proteínas que contienen los embutidos a la cual se debe su función. Hay ligantes animales y vegetales teniendo como ejemplo : La leche descremada en polvo, suero desecado, caseinato sódico o derivados de soya los cuales son las únicas sustancias ligantes de origen vegetal.

Sustancias de relleno.

Estas sustancias por ser ricas en almidón , tienen la capacidad de ligar agua pero no de emulsionar la grasa, contribuyen en sentido estricto a incrementar el volumen de los embutidos.

Emulsificantes o estabilizadores.

Se llaman así a los productos que se usan para mantener una emulsión límite de su rotura y, en menor grado mejorar la textura de los embutidos (21).

Sal.

La sal es el ingrediente no cárnico que se añade a los embutidos ya que es un mejorador de sabor, al igual que ejerce influencia sobre múltiples reacciones del proceso de maduración y

désecación. Agregando sal común se reduce el valor de la actividad acuosa, con lo que se restringe las condiciones de desarrollo de algunos microorganismos indeseables. La sal tiene capacidad para solubilizar las proteínas del músculo mejorando así la trabazón de la pasta, donde las proteínas solubilizadas actúan como emulsificantes al cubrir los glóbulos de grasa y ligar el agua. Al mismo tiempo retiene agua y esto beneficia al rendimiento del producto (3,21).

Nitritos y Nitratos.

Para el desarrollo de un color rosa-rojizo, característico de los embutidos cocidos, se utilizan generalmente nitratos y nitritos de sodio o potasio. Este color se desarrolla durante el curado, donde el nitrato se oxida a nitrito, el cual en combinación con la materia colorante muscular, forma la nitrohemoglobina, que tiene un color rojo-rosado estable (3,15).

Otras sales y/o sustancias.

Otros ingredientes son frecuentemente usados para mejorar o tener un efecto sinérgico en las características ya mencionadas, estos pueden ser entre otros :

1) Sales de fosfatos que mejoran y aumentan la capacidad de retener agua, aumentan la blandura y la jugosidad de la carne, además de dar un suplemento nutricional y retardar la rancidez (21).

2) Acido ascórbico que se usa como agente retardador de la decoloración que se debe al contacto del pigmento con el oxígeno ambiental.

3) Humos que mejoran el sabor, dan color y blandura a la carne y aumentan la vida de anaquel de los alimentos.

4) Acido benzoico y sus sales, las cuales tienen actividad bacteriostática.

5) Antioxidantes, que retardan la oxidación de materiales lipídicos en el embutido (7).

3.5 Elaboración de un embutido.

Debido a la gran variedad de productos, y procedimientos es imposible tener un mismo método para todos, por lo tanto se comentará únicamente los puntos básicos para la elaboración de los embutidos cocidos, específicamente de salchicha.

Primeramente se entiende por una salchicha, al producto obtenido a partir de la mezcla de carne de res y de cerdo, grasa de cerdo, sal, especies perfectamente trituradas formando así una pasta a la cual se le adiciona agua o hielo para formar una emulsión fina, posteriormente es embutida en una tripa limpia delgada o gruesa u otra membrana artificial, y finalmente deberá tener un tratamiento térmico. Por legislación las salchichas deberán de ser de forma cilíndrica y con una longitud variable de 3 a 15 cm. (15).

3.5.1 Picado.

Es el proceso mediante el cual se reduce el tamaño de la carne hasta obtener un producto uniforme en tamaño de partícula y homogeneidad. En el picado la materia prima debe trabajarse con carne fría o refrigerada, en su defecto se añadirá cierta cantidad de hielo, para evitar el calentamiento de la carne en la operación de picado en el cutter (10).

3.5.2. Mezclado.

También denominado empastado. En este punto se adiciona a la carne los condimentos y otros ingredientes que, por medio del mezclado quedan homogéneamente distribuidos en la pasta.

3.5.3. Emulsificación.

Para lograr una emulsión adecuada se utilizan dos tipos de equipos :

Cutters y molinos coloidales.

Durante este proceso la temperatura de la pasta deberá ser controlada y no pasar de 10°C , ya que debido a la fricción se puede incrementar la temperatura a tal punto que ocasionaría una ruptura de la emulsión en pasos subsiguientes. La emulsión se formará gracias a las proteínas solubles que actúan como emulsificantes recubriendo las partículas de grasa dispersas en la matriz.

3.5.4 Embutido o relleno.

Es la operación de transferir la pasta a rellenos para ser extruida en su envoltura. Es en este punto donde se determinará el tamaño de producto. La envoltura consiste en tripas naturales o artificiales. Las tripas naturales derivan del tracto gastroentérico del ganado porcino, vacuno u ovino.

Las tripas artificiales son de 4 tipos:

- Tripas de celulosa.
- Tripas de colágeno no comestible.
- Tripas de colágeno comestible.
- Tripas de plástico.

La ventaja de las tripas artificiales sobre las naturales es que presentan una reducida carga microbiana, presentan grandes variedades de tamaños, mayor resistencia y diferentes diámetros (21).

3.5.5. Elaboración y amarrado.

Después de rellenar las envolturas con la emulsión, la masa encapsulada se ata o se asegura con broches metálicos o cordeles, dependiendo de la presentación del embutido (10).

3.5.6. Tratamiento térmico y ahumado.

El tratamiento térmico utilizado es un escaldado, utilizando agua a 80°C con el fin de que el producto alcance una temperatura interna de 65 a 78°C, a la cual se destruyen los

ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

microorganismos patógenos. También a esta temperatura se logra dar al producto una estructura firme mediante la cual mantiene la forma, así mismo hay un desarrollo de color y cambios de textura. La forma se mantiene por la coagulación de las proteínas y la deshidratación parcial de las células, en donde se produce la trabazón.

Posteriormente en algunos casos se llega a utilizar el proceso de ahumado, el cual es utilizado como un método de sazónación. así como para el desarrollo del aroma (10).

3.5.7. Enfriado.

Después de la cocción y el del ahumado el producto se pasará a una corriente de agua fría y posteriormente a una refrigeración de 1 a 5°C (10).

3.5.8. Pelado y empaque.

Una vez enfriado el producto se le deberá de retirar la envoltura celulósica y se empacará en bolsas al alto vacío, de acuerdo a la presentación que se le quiera dar, por kilos o a granel.

4.- Aditivos

4.1.- Generalidades.

La aceptación de un determinado alimento por el consumidor depende de muchos factores entre los cuales los principales son : el sabor, la textura, el color, el costo, el valor nutritivo, la vida de anaquel, la facilidad de preparación y la apariencia en general. Todos los alimentos están constituidos por sustancias cuya interacción determina en gran medida muchas de las características y propiedades de cada alimento (2).

En la industria se requiere de sustancias llamadas aditivos que permiten tener un mayor control de las variables que intervienen en la producción de los alimentos (34).

Por lo tanto un aditivo se puede definir como una sustancia o mezcla de sustancias que están presentes como resultado de una adición premeditada para mejorar alguna característica del alimento (2).

Los primeros aditivos incidentales en los alimentos fueron probablemente materiales añadidos por el fuego al cocinarse los alimentos (34).

4.2 Tipos de aditivos.

En general los aditivos se identifican como todo aquella sustancia que es utilizada como : antioxidante, preservativo, emulsificante , estabilizante, colorante, saborizante, sustancia ácida y/o básica, agente secuestrante, humectante, enzima, sustancia edulcorante, goma, harina, y aditivo nutritivo como lo son vitaminas y minerales (31).

El empleo de aditivos en las carnes y productos cárnicos puede dividirse en dos aplicaciones aceptables y una que no se permite legalmente.

a) Aditivos aceptables que son utilizados para estabilizar, curar, suavizar, fijar el color, el sabor, el sazón y aromatizar productos sin que aumenten sensiblemente el peso.

b) Aquellos ingredientes cuyo empleo se dá por descontado en productos comestibles de la carne como son vegetales, harinas de cereales y otros que constituyen una parte normal y tradicional de dicho producto.

c) Aquellos aditivos que están prohibidos por la ley y se utilizan para disimular la inferioridad de un artículo o productos utilizados en un porcentaje mayor al permitido para obtener beneficios económicos (muchos de estos se encuentran en los dos grupos antes mencionados pero en menor cantidad), en este caso son aditivos utilizados como " adulterantes " .

Dentro del primer grupo se encuentran aditivos como : sal, hielo o agua, nitritos y nitratos, azúcares, fosfatos, ácidos, antioxidantes, potenciadores del sabor, etc.

En el segundo grupo se encuentran aditivos como : rellenos, derivados de proteína de levadura, harinas y almidones, y rellenos de proteína de soya encontrándose en varias presentaciones como aislado, harina y concentrados de proteína entre otros (34).

Así mismo cabe mencionar que todos los aditivos deben tener un grado de calidad alimenticio bueno, de acuerdo a las especificaciones del Food Chemical Codex, y así ser reconocido por el GRAS (generally regarded as safe), por lo tanto deben cumplir con las siguientes características :

I) Demostrar que es saludable y no produce cáncer ni al hombre ni a los animales.

II) Ser usado en las cantidades permitidas por las autoridades.

III) Que pueda ser identificado en el alimento por análisis químicos, físicos y/o microbiológicos.

IV) Los aditivos deberán aportar una o más de las siguientes condiciones al consumidor :

a) Ayudar mejorando la manufactura del proceso.

b) Ayudar a mantener o inclusive mejorar el valor nutritivo del alimento.

- c) Prevenir o minimizar la degradación de los alimentos.
- d) Incrementar el atractivo del alimento.
- e) Reducir el precio al consumidor (31).

4.3 Aditivos, enlazantes y rellenos.

Como ya se mencionó existe una amplia variedad de productos no cárnicos que se pueden incorporar en el proceso de embutidos bajo las reglas de Inspección cárnica. Estos productos son llamados enlazantes o rellenos y con menor frecuencia emulsificantes o estabilizadores, se agregan a la formulaciones por una o más razones :

- 1) Para reducir los costos de la formulación.
- 2) Para mejorar el proceso de cocido.
- 3) Para mejorar las características del corte.
- 4) Para mejorar el sabor.
- 5) Para aumentar el contenido de proteína.
- 6) Para mejorar la estabilidad de la emulsión.
- 7) Para mejorar la unión de la grasa.
- 8) Para aumentar la retención de agua.

El contenido permitido de tales materiales en los embutidos está controlado por la Inspección Federal de carne que indica que en forma de mezcla en embutido sólo se permite el 3.5 % de cereal, almidón, harina vegetal, harina de soya o concentrado; leche en polvo descremada y de cada aditivo en forma aislada no se permite un nivel arriba del 2 %.

Por lo tanto todo embutido que tenga un porcentaje mayor al permitido de cualquier tipo de aditivo se considera como adulterante, ya que en sí representan un fraude al consumidor y principalmente le afecta en un sentido económico, por lo anterior es necesario contar con técnicas específicas para detectar la concentración en que están presentes éstos en los embutidos y clasificarlos así, como productos posiblemente adulterados que puedan representar un engaño o fraude para el consumidor (24).

4.3.1 La soya como aditivo enlazante.

Dentro de los aditivos enlazantes y rellenos el más utilizado es la soya debido a sus características nutritivas ya mencionada con anterioridad, por otra parte la industria "chacinera" prefiere usar también a la soya por ser un producto económico y por tener propiedades gelificantes especiales que ayudan a unir los trozos de carne en secciones y formar productos uniformes, así mismo la soya ayuda a aumentar el poder emulsificante con las grasas propias del embutido, y además por su poder efectivo como relleno proteico, sin embargo justo es en este aditivo en donde se debe tener un control exacto ya que como se mencionó, la Inspección Federal de la carne no permite más del 2 % de harina, concentrado o aislado de proteína de soya, según la norma mexicana NOM F-1987 para la elaboración de salchicha, de ahí la importancia de aplicar técnicas altamente específicas para el control en la elaboración de los embutidos (24,34).

5.- Técnica de análisis

5.1. Antecedentes.

La incorporación de proteínas aisladas de soya en alimentos cárnicos ha sido objeto de múltiples investigaciones en la esfera internacional.

Con el fin de detectar y cuantificar esta proteína de soya se han desarrollado diferentes métodos analíticos como lo son :

- 1) Microscopia e histoquímica.
- 2) Análisis químico de constituyentes no proteicos del frijol de soya.
- 3) Análisis de aminoácidos y péptidos.
- 4) Adición de rastreadores.
- 5) Métodos Inmunológicos (B,27).

5.2. Microscopia e histoquímica.

Es el método de análisis más utilizado, siendo el método de la A.O.A.C. en su 12a. edición, donde se enuncia como un método tentativo para la determinación de harina de soya en carne, que consiste en la digestión de la muestra con potasa alcohólica, una centrifugación de la mezcla para obtener un residuo que después de ser tratado con ácido clorhídrico es observado al microscopio con fuente de luz polarizada buscando células características en forma de " I " (reloj de arena), debido a que estas células sólo se presentan en harina de soya y sus productos es una técnica

limitada, pues en las presentaciones de aislado y concentrado las células características son destruidas por su proceso de obtención. Además esta técnica no es cuantitativa, si no unicamente cualitativa (8,9).

5.3. Análisis químico de constituyentes no proteicos del frijol de soya.

Se basa en la determinación de constituyentes característicos del frijol de soya como hidratos de carbono, ácidos grasos, etc.

Las plantas producen ácidos grasos (AG) polinsaturados de cadena larga, tales como el ácido linoleico y linolénico. La diferencia en la composición de ácidos grasos entre la manteca de cerdo y la grasa de la soya es considerable ya que en esta última es muy escaso el ácido graso linolénico, sin embargo presentar este análisis con harina de soya desengrasada (que es la que en su generalidad se usa en embutidos) es imposible debido a que la harina desengrasada contiene menos del 1 % de grasa, por lo que no se puede obtener una diferencia significativa en el análisis (9).

5.4. Análisis de aminoácidos y péptidos.

Las diferencias entre aminoácidos de proteína de soya y de carne no son lo suficientemente marcadas como para desarrollar un método de cuantificación. Más bien se ha partido de la presencia de aminoácidos metilados en carne por medio de los

cuales se puede cuantificar la cantidad de proteína de origen animal. La diferencia entre la proteína total y la proteína animal corresponde a la proteína de origen vegetal. Sin embargo si la adición de proteína de soya es en porcentajes bajos, y están presentes otros ingredientes que aportan proteínas como leche, huevo, harinas de pescado, etc, el análisis resulta poco confiable (9).

5.5. Métodos electroforéticos.

La electroforesis es una técnica que permite la resolución de las moléculas y complejos moleculares según su carga en una solución amortiguada en presencia de un campo eléctrico. La velocidad y la distancia recorrida desde el origen del electroferograma aumenta proporcionalmente con la disminución del peso molecular. La técnica se lleva en un gel de poliacrilamida con sulfato sódico, el cual engloba las moléculas proteicas dándoles carga negativa global y haciéndolas por lo tanto emigrar hacia el ánodo. Las bandas de proteína se localizan e identifican usando agentes de tinción (8,27).

Para realizar este método se necesita un aparato de alto costo y un material especial, junto con un experto en electroforemas, el cual sepa distinguir bien las bandas del mismo, aun usando patrones.

5.6. Adición de rastreadores.

Se trata de un método indirecto, en el cual se adiciona óxido de titanio (TiO_2) a derivados de soya y se trata de cuantificar la soya presente en un embutido con base a la cantidad de dióxido de titanio detectado. La concentración de dióxido de titanio está directamente proporcionada con la absorbancia de la muestra a 408 nm.

Esta técnica por utilizar material radioactivo es altamente costosa y de sumo cuidado, para lo que se necesita de personas expertas, y por lo tanto no conviene como una prueba rutinaria en un laboratorio (9,12).

5.7. Métodos inmunológicos.

Son métodos que se basan en la reacción antígeno-anticuerpo en condiciones estandarizadas, en donde reaccionará un suero inmune producido en contra de las fracciones termoestables de las proteínas de soya. Los productos que contengan soya en cualquiera que sea su presentación (debido a que todos presentan la misma fracción termoestable), formarán una banda o un halo de precipitación (5,25).

5.7.1.. Doble difusión en gel.

Esta prueba involucra la presencia de compartimentos del antígeno y del anticuerpo situados en un portaobjeto de vidrio a cada lado de un compartimento común en el gel, después de aplicar los reaccionantes en sus respectivos compartimentos, el

antígeno y el anticuerpo difunden el uno hacia el otro en el gel común y se forma una banda de precipitación en el sitio de equivalencia marcando así un análisis sólo cualitativo de la prueba (4).

5.7.2. Inmunodifusión radial.

Este método es el más utilizado para la cuantificación de inmunoglobulinas y otras proteínas del suero. Uno de los reactivos inmune generalmente el anticuerpo se añade y se distribuye homogéneamente en una capa de agar, al cual se le harán las perforaciones correspondiente y posteriormente se aplica en estas al otro reaccionante generalmente el antígeno. El antígeno difunde radialmente en la mezcla agar-anticuerpo formando un halo visible de precipitación hasta un punto dependiente de la estequiometria de la reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente se mide el diámetro del halo o anillo, donde el cuadrado del diámetro es directamente proporcional a la concentración del antígeno, en donde al graficar el diámetro del halo al cuadrado contra las diferentes concentraciones de soya se presentará una línea recta, obteniéndose así un análisis sencillo, cualitativo y cuantitativo (14).

En el estudio a realizar se utilizará la técnica de inmunodifusión radial (IDR) bajo condiciones estandarizadas en donde reaccionará un suero inmune creado contra la fracción termestable de la proteína de soya, y por lo tanto los productos que contengan esta misma, darán un resultado positivo.

Debido que la técnica a realizar (IDR) es una prueba indirecta para clasificar productos dentro de una población en categorías de adulterados o no adulterados, es necesario evaluar la validez de la prueba, es decir, saber si la prueba mide lo que se propone medir, y para determinar si la prueba evalúa lo que se pretende, se deberá tener una escala porcentual o proporcional que indique su grado de validez (1).

Para estudiar específicamente la validez de la prueba a realizar se deberá experimentar y calcular los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud.

a) Sensibilidad : Es la capacidad de tener un mayor número de resultados positivos en una población donde existen valores positivos y negativos.

b) Especificidad : Es la capacidad de la prueba para determinar como negativo a todos los valores que así lo sean.

c) Precisión : Es la capacidad de repetir valores similares al medir repetitivamente una misma muestra.

d) Exactitud : Es la capacidad de observar con los valores de precisión la confiabilidad de la prueba (1).

6.- Material y método

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la facultada de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M..

Para la realización de la investigación se partió de harina de soya desengrasada marca Sherrco Inc. products, a la cual con una prueba microscópica (anexo 1), se comprobó que se trataba de harina por presentar las células características.

La técnica usada como ya se mencionó es la Inmunodifusión radial, para la cual se necesita obtener el antígeno y el anticuerpo.

6.1. Obtención del antígeno.

El antígeno esta representado por la fracción termoestable de la harina de soya, para obtenerlo se procedió a :

6.1.1. Extracción de las globulinas de soya.

Para la extracción de las globulinas de la harina desengrasada se aprovechó la solubilidad de éstas en agua y solución salina diluida.

Se mezclaron 500 ml. de una solución salina al 0.85 % con 130 gramos de harina de soya desengrasada, agitando durante dos horas. Se dejó reposar el extracto por 18 horas a 4 °C y posteriormente por centrifugación a 8000 rpm. durante 30 minutos se separó el sedimento (19).

6.1.2. Tratamiento térmico.

El extracto obtenido se sometió a 121°C por 20 minutos en un autoclave. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para una posterior centrifugación a 5000 rpm. durante 45 minutos. El sobrenadante contiene la " Fracción termoestable " de las globulinas de soya. Se trasvasó 3 ml. del sobrenadante en condiciones de esterilidad a frascos Ampula estériles de 10 ml.

6.1.3. Cuantificación de las proteínas de soya.

Se cuantificó la concentración de proteínas del sobrenadante por la técnica de micro-Kjeldahl. (anexo 2) Una vez conocida la concentración de proteína, se liofilizaron los extractos para obtener una mayor concentración de proteína y una mayor durabilidad del extracto.

6.2. Obtención del antisuero.

Para la producción del antisuero se procedió a inocular conejos con el antígeno obtenido.

6.2.1. Esquema de inmunización.

Para la obtención del suero inmune se utilizaron 2 conejos de raza Nueva Zelanda, con 2.5 kilogramos de peso aproximadamente, a los cuales se le aplicaron 5 dosis de la fracción termoestable de las proteínas de soya (FTE) en la vena marginal de la oreja, con una concentración de proteína variable

marginal de la oreja, con una concentración de proteína variable de 2.5 % a un 9.5 %, con el fin de ir aumentando la dosis de concentración de proteína poco a poco para obtener igualmente una respuesta inmune del conejo en forma gradual, según muestra el cuadro de inmunización.

Esquema de inmunización

Día	Dosis (ml.)	Concentración de proteína (%)
1	1	2.5
3	1.5	4.0
6	2.0	4.0
9	2.5	6.4
12	3.0	9.5

Al término del periodo de inmunización se dejó descansar a los animales durante una semana, procediendo a obtener aproximadamente 35 ml. de sangre por punción de una de las venas marginales de la oreja en forma estéril.

De la sangre así obtenida se separa el suero en forma estéril.

6.2.2. Titulación del suero.

Se probó la respuesta de cada conejo con el suero obtenido del inmunógeno (FTE) mediante la técnica de doble difusión en gel de Duchterlony. (anexo 3)

Se prepararon diluciones 1:2, 1:4, 1:6, 1:10 y 1:12 y se

realizó la prueba de doble difusión en gel observando las bandas de precipitación en los casos positivos. El título de suero se considera como la máxima dilución en la que se observa precipitación.

6.2.3. Sangría de conejo.

Cuando el título del suero se encuentra en una dilución aceptable, se procede a realizar la sangría por punción cardiaca en cada animal.

6.2.4. Esterilidad del suero.

A pesar de que todo se manejó en forma estéril, para garantizar esta esterilidad; se realizó la prueba de esterilidad por duplicado inoculando el suero sobre cajas de agar de soya tripticasa e incubándolo por 72 horas a 37°C.

6.2.5 Concentración y almacenamiento del suero.

Para manejar el suero a una mayor concentración, así como garantizar una mayor durabilidad se procedió a liofilizar el suero obtenido en frascos ampula que contenía 3 ml. de suero cada frasco.

6.3 Pruebas cruzadas.

Es posible que las especies animales utilizadas en la elaboración de productos cárnicos compartan determinantes antigénicos con la fracción termoestable (FTE).

Para analizar esta posibilidad y así evitar resultados falsos positivos se efectuaron pruebas cruzadas en doble difusión en gel en las que se probó la FTE con antisuero de bovino, equino, porcino, canino, ovino y aviar, así como pruebas cruzadas con el suero anti-FTE frente a los sueros de las especies antes mencionadas.

6.4 Aplicación de la técnica IDR.

Para poder aplicar la técnica se procedió a la elaboración de salchichas con diferentes concentraciones de soya y con diferentes especies animales con el fin de analizarlas y obtener una curva patrón donde se represente el cuadrado del diámetro de los halos contra las diferentes concentraciones de soya.

6.4.1 Preparación de las salchichas.

Se prepararon diversas muestras de salchicha siguiendo el proceso industrial, con cantidades de harina de soya conocida y concentrados de soya marca Sherrco productos Inc., de acuerdo a los siguientes cuadros :

Preparado comercial para salchicha. (%)	Excipiente Harina de soya (%)
100	0
98	2
95	5
94	6
88	12

Preparado comercial para salchicha (%)	Excipiente de concentrado de soya (%)
100	0
95	5

De la misma forma se elaboraron salchichas patrón con cantidades conocidas de carne de especie animal obtenidas del rastro de Ferrería y de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. de acuerdo al siguiente cuadro.

Preparado comercial de salchicha (%)	Excipiente carne de especie animal (%)
90	10 (Bovino)
90	10 (Porcino)
90	10 (Aviar)
90	10 (Equino)
90	10 (Canino)
90	10 (Caprino)

Donde el preparado comercial de salchicha contiene :

- Carne de cerdo 41.6 %
- Carne de res 20.0 %
- Agua-hielo 26.7 %
- Fécula de trigo 8.0 %
- Especies 7.5 %
- Sal de cura 3.0 %

6.4.2 Extracción de la FTE de las salchichas elaboradas.

Para extraer la fracción termoestable en las salchichas, se pesan 20 gramos de salchicha y se colocan en una probeta graduada aforándose a 100 ml. con solución reguladora de pH 5.4 (debido a que en este pH es en el que las proteínas termoestables presentan su máxima solubilidad), se licúa a baja velocidad por un minuto y se pasa a frascos pequeños de boca ancha los cuales se dejan reposar a 4°C entre 18 a 24 horas, posteriormente se centrifuga a 8000 rpm. por 20 minutos, se separa la grasa y el sobrenadante se pasa a tubos limpios los cuales se refrigeran hasta su uso.

6.4.3. Preparación de las placas IDR.

Para la preparación de las placas se utilizaron cajas de plástico DIR, de Behring Diagnostika.

a) Primeramente se preparó agar noble especial marca Bioxón, al 3 % agregándole 0.01 % de azida de sodio como conservador.

b) Posteriormente se mezcló 2 ml. del agar con un mililitro del suero antifracción termoestable con el fin de tener la concentración final de 2:1, por ser la óptima según la bibliografía (19).

Es importante mezclar ambos a 50 °C, homogenizarlos perfectamente y mantenerlos en un baño maría a esa temperatura hasta su uso.

c) Finalmente se vierte en las cajas de plástico DIR previamente calentadas en una plancha, teniendo la precaución de colocarlas en una superficie ya antes nivelada, para obtener así el gel en la placa con un grosor de 3 milímetros.

d) Se deja enfriar las cajas y se mantiene a 4°C por 24 horas, con el fin de obtener una homogenización del suero-agar.

Posteriormente se practicaron horadaciones en el agar de 5 mm. de diámetro, obteniendo 12 pozos en cada placa como muestra la figura.

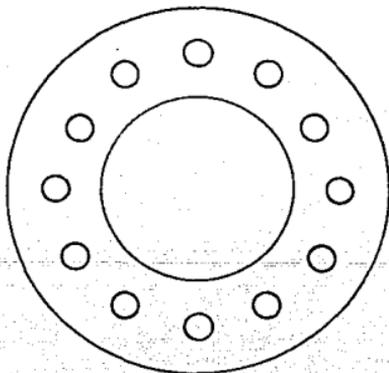


Figura 1.

Caja para I.D.R.

Los pozos fueron llenados con una micropipeta marca Oxford, depositando en cada uno 20 microlitros de la FTE de las salchichas a analizar. Las cajas se cerraron herméticamente y se dejaron difundir a temperatura ambiente hasta que el diámetro de los inmunoprecipitados no varió en 48 horas (punto límite de la difusión).

6.5. Presentación de resultados.

Finalizando el tiempo de la difusión se mide el diámetro de los halos con una regla LC Partigen Behring, obteniéndose los diferentes resultados.

El total de resultados que se obtuvieron son :

Salchichas con harina de soya (%)	Número de resultados
0	12
2	40
5	12
6	40
12	40
<hr/>	
Concentrado de soya (%)	Número de resultados
0	12
5	12

Respecto a las salchichas elaboradas con diferentes especies animales se corrieron dos tipos de prueba :

a) Una prueba realizada de la forma anterior en donde se analizó el cruce del suero anti-FTE con la FTE de salchichas de diferentes especies. En este caso se tienen resultados por duplicado de cada especie.

b) La segunda consistió en mezclar el agar con antisuero de las diferentes especies animales, se presentaron 6 cajas donde cada una tenía el agar con el antisuero correspondiente : equino, bovino, ovino, canino, aviar, porcino. A cada caja se le analizó el cruce con la FTE de las diferentes salchichas de especie animal. Solo se tuvo también cada resultado por duplicado con el fin de ver solamente si se presentaba el cruce.

6.6. Validación de la técnica.

Una vez obtenido los resultados se procederá a validar la técnica utilizando datos dicotómicos o nominales para obtener la sensibilidad y especificidad de la técnica, por lo que se elaborará un cuadro que muestre los datos que forzosamente son positivos y que den resultados tanto positivos como falsos negativos, y así mismo los datos que forzosamente son negativos y den resultados tanto negativos como falsos positivos (1,11).

		Salchichas con soya	Salchichas sin soya
DIR	+	a	b
	-	c	d
		a + c	b + d

a) La sensibilidad se obtiene :

$$Se = a / a + c$$

b) Para determinar la especificidad se usará el cuadro presentado anteriormente con la siguiente fórmula.

$$Esp = d / b + d$$

c) Para obtener la precisión se necesitarán los resultados de salchicha del 2, 6 y 12 % de harina de soya desengrasada, se medirán diario durante 10 días, y se obtendrá la media y la desviación standard con el fin de sacar el coeficiente de variabilidad, el cual nos indica que mientras menor sea éste mayor será la precisión.

$$C.v. = \text{desv.st.} \times 100 / \text{media.}$$

Para observar la variabilidad existente se tendrá que realizar una gráfica que represente el coeficiente de variabilidad contra las diferentes concentraciones de soya. En este caso a medida de que la gráfica sea una recta mayor será la precisión.

precisión.

d) Para calcular la exactitud se tendrá que recuperar el 2 y 12 % de harina de soya de la muestra patrón por tres días seguidos.

6.7 Elaboración de la tabla patrón.

Con todos los datos obtenidos al analizar las salchichas elaboradas con diferentes concentraciones de soya se aplicará la fórmula de la inmunodifusión radial para obtener la gráfica del cuadrado del diámetro del halo contra la concentración de soya correspondiente.

7.- Resultados

7.1 Obtención del suero.

Se obtuvieron 90 ml. de suero estéril anti-FTE (de los dos conejos), el cual presentó un título 1:12, considerándose un título aceptable para la técnica IDR.

7.2 Diámetro de los halos en las diferentes salchichas.

Valores del diámetro en salchichas con 0 % de harina de soya

analista 1	analista 2
25	25
25	25
25.4	25
26	25
25	26
25.8	24.8
25	25.5
25	25
25	25
25.2	26
25	25.2
26	24

MEDIA = 25.20

DESVIACION ESTANDAR = 00.4740

Valores del diámetro de salchichas con 2 % de harina de soya

Día	analista 1		analista 2	
01	33.65	32.80	33.65	33.65
02	32.80	33.65	32.80	33.65
03	34.80	33.65	32.80	32.80
04	33.66	32.80	33.00	34.80
05	-----	34.80	33.65	33.65
06	32.50	34.00	33.65	33.65
07	-----	33.00	33.65	32.55
08	33.65	33.65	-----	33.65
09	32.80	-----	32.80	34.00
10	33.65	32.00	33.65	33.00

MEDIA = 33.41
DESVIACION ESTANDAR = 00.6439

Valores del diámetro de salchichas con 5 % de harina de soya

analista 1	analista 2
36.00	37.20
37.20	38.45
36.00	37.00
37.20	37.20
38.45	37.20
37.20	37.20

MEDIA = 37.190
DESVIACION ESTANDAR = 00.740

Valores del diámetro de salchichas con 5 % de concentrado de soya

analista 1

37.20
38.45

38.45
36.00
37.20

analista 2

36.00
37.20
36.00
38.45
37.20
38.00

MEDIA = 37.280

DESVIACION ESTANDAR = 00.970

Valores del diámetro de salchichas con 6 % de harina de soya

Día	analista 1		analista 2	
01	51.85	51.85	50.40	51.85
02	49.00	50.40	49.00	49.00
03	50.40	51.85	-----	51.85
04	50.40	51.85	50.40	51.85
05	51.85	50.40	50.00	50.40
06	-----	50.40	-----	-----
07	49.00	50.40	50.00	50.40
08	50.40	49.00	51.85	50.40
09	50.40	51.85	-----	51.85
10	49.00	50.40	51.85	50.40

MEDIA = 50.675
DESVIACION ESTANDAR = 01.039

----- Muestras no corridas.

Valores del diámetro de salchichas con 12 % de harina de soya

Día	analista 1		analista 2	
01	73.95	77.45	75.70	73.95
02	77.45	77.45	75.70	73.95
03	77.45	73.95	75.70	77.45
04	73.95	73.95	73.95	75.70
05	75.70	75.70	77.45	77.45
06	77.45	77.45	75.70	77.45
07	73.75	75.70	73.95	77.45
08	73.95	77.45	77.45	73.95
09	75.70	73.95	77.45	73.95
10	77.95	73.95	73.95	75.70

MEDIA = 75.700
DESVIACION ESTANDAR = 01.534

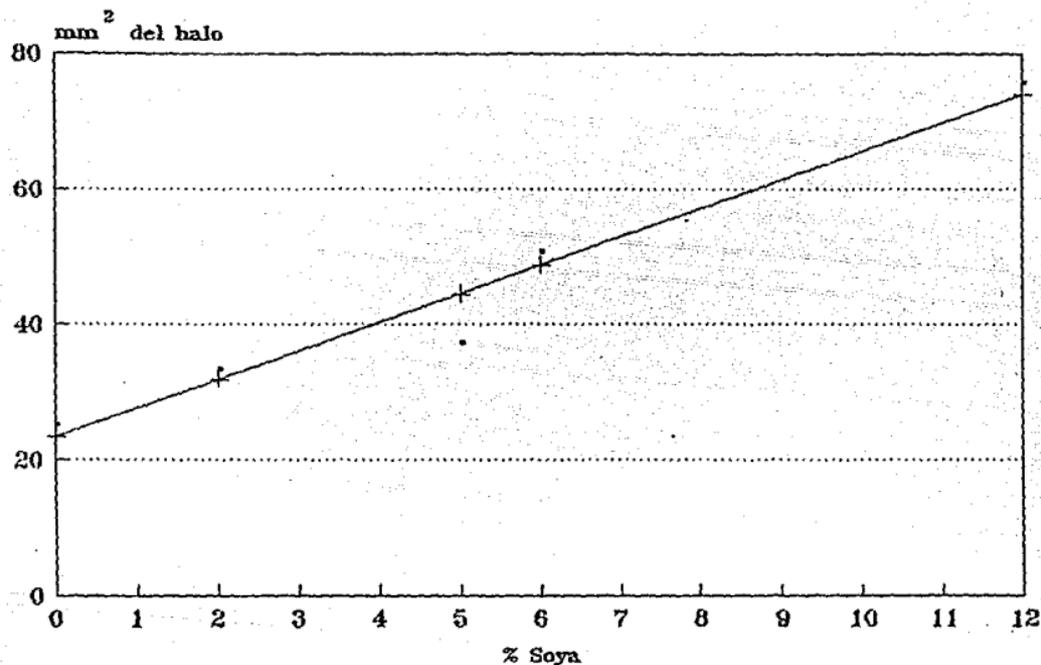
7.3 Gráfica de los valores de la técnica de I.D.R.

Para elaborar esta gráfica se comparó el cuadrado de los halos de precipitación, contra las diferentes concentraciones de soya.

Se presentan las cifras reales junto con los datos obtenidos de una regresión lineal, para obtener así la línea recta buscada.

cifras reales		regresión lineal	
X	: Y	X	: Y
0	: 25.20	0	: 23.35
2	: 33.41	2	: 31.79
5	: 37.25	5	: 44.44
6	: 50.67	6	: 48.66
12	: 75.70	12	: 73.97

GRAFICA DE LA I.D.R. PARA CUANTIFICAR PROTEINA DE SOYA EN SALCHICHA



$$y = 4.21x + 23.35$$

Coefficiente de correlacion = 0.979

7.4 Validación de la técnica.

		Salchichas con soya	Salchichas sin soya
DIR	+	134	0
	-	10	24
	Total	144	24

a) Sensibilidad

$$\% Se = \frac{134}{144} \times 100 = 93.05 \%$$

b) Especificidad

$$\% Es = \frac{24}{24} \times 100 = 100 \%$$

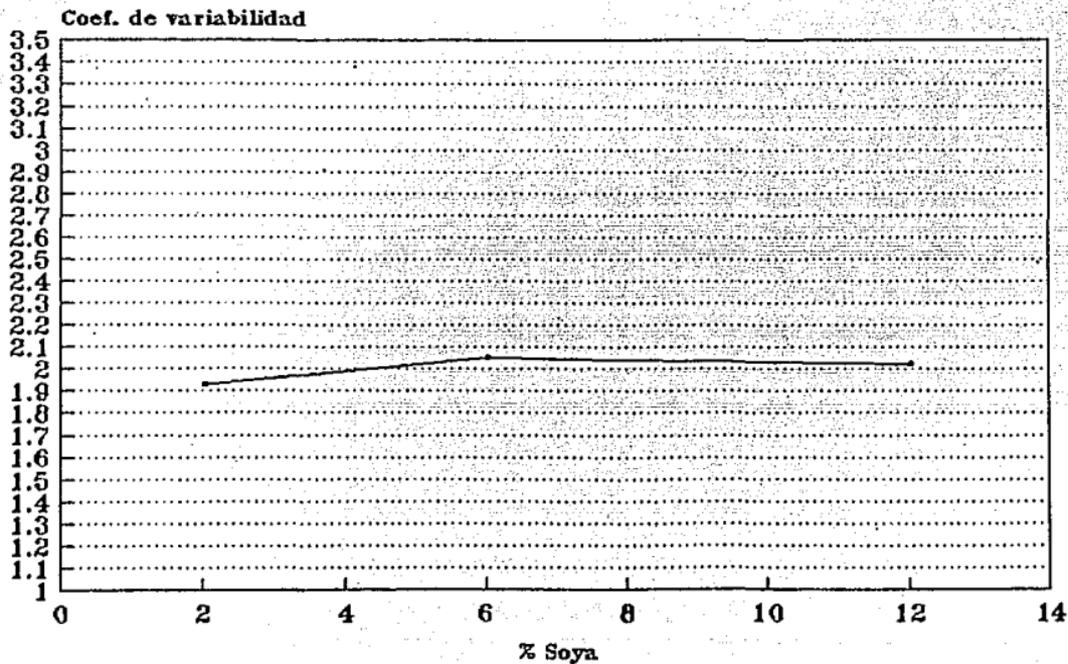
c) Precisión

$$2 \% \quad Cv. = \frac{0.6439 \times 100}{33.41} = 1.927$$

$$6 \% \quad Cv. = \frac{1.039 \times 100}{50.675} = 2.05$$

$$12 \% \quad Cv. = \frac{1.534 \times 100}{75.70} = 2.02$$

GRAFICA DE PRECISION DE LA TECNICA I.D.R.



d) Exactitud

Media obtenida en el día	2 %	12 %
01	33.75	75.70
02	33.27	75.29
03	33.25	75.29

7.5 Cruzamiento de especies animales .

a) No se presentó ningún tipo de cruzamiento entre las salchichas de diferentes especies animales con el suero anti-FTE de soja creado.

b) No se presentó ningún tipo de cruce del anti-suero de especie animal con la salchicha de especie animal correspondiente a ese mismo anti-suero.

8.- Discusión de resultados.

8.1 Gráfica IDR.

Al graficar las cifras reales de nuestra técnica, se observó que no era una recta debido a los errores experimentales durante la elaboración de ésta, por lo que se aplicó una regresión lineal la cual nos indicó que la recta presenta un coeficiente de correlación de un 0.9790, el cual equivale en tablas a un 99.0 % de seguridad al aplicar la técnica bajo nuestras mismas variantes estandarizadas.

Por otro lado se puede observar que los resultados obtenidos al analizar las salchichas elaboradas con 5 % de harina de soya y las salchichas elaboradas con 5 % de concentrado de soya presentan resultados similares, esto se debe a que en ambos casos la FTE (que es en sí la parte reaccionante en la determinación) es igual para ambos casos, es decir las proteínas de soya que después de un tratamiento térmico siguen estables son las mismas tanto en la harina como en el concentrado de soya.

8.2 Validación de la técnica.

a) Sensibilidad.

La sensibilidad obtenida al aplicar la prueba fue de un 93.05 %, lo cual indica que se dio un 6.95 % de error, este porcentaje de error debió ser detectado con la técnica y no lo

fue, indicando primeramente error del analista al no llenar correctamente todos los pozos o no dejarlos difundir el tiempo suficiente para detectar un halo de precipitación.

b) Especificidad.

La especificidad de nuestra técnica fue de un 100 %, esto indica que no se dieron resultados falsos positivos, esto se debe a que la mínima concentración de harina de soya (2 %) con la cual realizamos las salchichas la técnica de IDR es capaz de detectarla, así mismo si se hubiera fabricado salchichas con una concentración de soya mucho menor (inferior al 2 %), quizás la técnica no sería capaz de detectarla en un 100 %, y por lo tanto la técnica no sería 100 % específica, sin embargo se partió del análisis de salchichas con 2 % de harina de soya, por ser el porcentaje máximo permitido por la Norma Oficial Mexicana, y de esta manera una cantidad menor no es preciso detectar.

c) Precisión.

La precisión de la técnica (la cual se obtiene por el coeficiente de variabilidad) nos indica que es una técnica precisa en un 94 %, por lo tanto de 100 muestras analizadas por un espacio de 10 días por dos diferentes analistas, sólo se presenta el error en un 6 % de las muestras, este se representa por la variabilidad que se tiene al aplicar la técnica en las condiciones estandarizadas por diferentes personas en diferentes días. Esta variabilidad se debe a la repetibilidad de la técnica, a la elaboración de la técnica controlando las variables, o a la percepción de los resultados por un determinado analista.

d) Exactitud.

Al no presentarse una varianza mayor a 0.5 en los datos obtenidos en los tres días se manifiesta que nuestra técnica es exacta.

8.3 Cruce de especies animales.

a) Al no presentar cruce el suero anti-FTE con las diferentes salchichas de especie animal, se indica que no se comparten entre ellas propiedades antigénicas es decir, el suero anti-FTE obtenido sólo es específico para muestras que contengan soya y no identifica ningún otro tipo de reaccionante.

b) Durante el proceso de elaboración de salchicha las proteínas de la carne sufren cierta desnaturalización, por lo tanto no presentan ninguna reacción con el antisuero de especie correspondiente.

9.- Conclusiones.

1.- Con la aplicación de la técnica IDR se determinó indirectamente la proporción de harina o concentrado de soya en base a sus propiedades antigénicas en salchichas elaboradas con diferentes concentraciones de soya.

2.- La técnica de Inmunodifusión radial por ser altamente sensible y específica para productos que contengan entre 2 y 12 % de soya, es un método confiable para establecer el cumplimiento de la reglamentación en productos cárnicos, específicamente en la salchicha.

3.- Por sus condiciones de fácil aplicación, economía y control en las variables, la Inmunodifusión radial, puede ser una técnica de rutina utilizada en los laboratorios de análisis.

4.- Es recomendable obtener un suero con un mayor título de anticuerpos (1:12) para poder aplicar fácilmente la técnica, de lo contrario se puede concentrar o diluir el suero con el fin de partir del título específico para obtener así los resultados presentados.

5.- Se concluye que existe una fracción termoestable en las proteínas de soya capaz de conservar sus propiedades antigénicas aún después de un tratamiento térmico. Esta fracción es específica para muestras que contengan soya, y no comparte

propiedades antigenicas con las proteínas de bovino, porcino, equino, ovino, aviar y canino.

6.- La fracción termoestable de las proteínas de soya reacciona de igual manera en productos elaborados con harina de soya y en productos elaborados con concentrado de soya, por lo tanto al aplicar la técnica de IDR se podrá detectar soya en diferentes presentaciones y así poder utilizar esta técnica en un mayor número de productos.

10.- Anexos.

Anexo 1

Preparación de la harina de soya para su posterior observación al microscopio.

La soya puede ser identificada microscópicamente por la presencia de células en forma de reloj de arena características únicamente en la harina de soya. Estas células pueden ser observadas en el residuo fibroso que se separa cuando se hierve la muestra en un ácido y un álcali diluido.

- Preparación de la muestra :

Pesar 10 gramos de muestra (harina de soya) y colocarlos en un tubo graduado de 100 ml. para centrifuga, agregar 75 ml. de una solución alcohólica de hidróxido de potasio al 8 %. Colocar el tubo en un baño de vapor durante 40 minutos, diluir hasta la marca con alcohol etílico absoluto. Agitar la muestra perfectamente y centrifugar a 1700 rpm. durante cuatro minutos. Decantar y desechar el sobrenadante, agregar 50 ml de agua hirviente al residuo, tapar y agitar vigorosamente. Dejar reposar después un minuto, mientras permanece aún la espuma.

Centrifugar nuevamente a 1700 rpm. durante 4 minutos, desechar el sobrenadante y agregar 10 ml. de ácido clorhídrico

1:3 al residuo, homogeneizar con un agitador de vidrio. Añadir 15 ml. de etanol al 25 %, agitar y centrifugar durante 4 minutos a 1700 rpm.. Decantar el sobrenadante y examinar el residuo bajo el microscopio de luz polarizada para identificar las células características en forma de I (29).

Anexo 2

Cuantificación de proteínas por el método micro-Kjeldahl

Las proteínas y demás materiales orgánicos son oxidados por el ácido sulfúrico y así el nitrógeno orgánico de las proteínas se fija como sulfato de amonio.

Esta sal se hace reaccionar con una base fuerte para desprender amoníaco, que se destila y se recibe en un ácido débil, en el cual se puede titular el amoníaco con un ácido fuerte (29).

El método micro-Kjeldahl es una variedad del método Kjeldahl, en donde para la digestión se usan tubos en un bloque de digestión de aluminio calentado electricamente.

- Método :

Se precalienta el bloque digestor por 40 minutos antes de usarlo, entre 370 y 420°C, pasar la muestra (máximo 2 gramos), al tubo de digestión, adicionar una tableta de catalizador Kjeltas (sulfato de potasio, sulfato de cobre y óxido de titanio), agregar un gramo de sulfato de cobre, 10 ml de ácido de digestión (ácido sulfúrico concentrado en 75 % y ácido orto - fosfórico en 5 %), se agrega 10 ml. de agua oxigenada, mezclar y dejar la digestión por 45 minutos.

Pasado el tiempo se quita el tuho de digestión, se deja enfriar y se le agrega 75 ml. de agua.

Se colocan 25 ml. de una solución de ácido bórico al 4 % en un matraz recibidor, se conecta a la unidad del destilador, y se inicia la destilación, agregándole poco a poco hidróxido de sodio.

Al detener la destilación, se agrega al matraz recibidor 5 gotas de solución indicadora de rojo de metilo y se titula con ácido sulfúrico 0.05 N. hasta un punto de vire gris (38).

$$\% N = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{\text{peso de muestra}}$$

V = Mililitros del ácido sulfúrico titulador.

N = Normalidad del ácido sulfúrico titulador. (0.05)

% Proteína = 5.71 (factor harina de soya) x % N

Anexo 3

Técnica de doble difusión en gel de Outcherlony.

- Preparación de agar :

Se utiliza agar agarosa o agar noble al 2 % (p/v) y se mezcla con una solución de cloruro de sodio al 0.85 % (p/v), y se hierve por un espacio de 10 minutos.

El agar líquido deberá ser claro de lo contrario se continúa el calentamiento y se filtra, después de una solubilización completa el agar se mezcla con un agente bacteriostático (azida de sodio 0.1 %), y es vaciado en tubos con tapa los cuales se almacenan a 4 C°(4).

- Preparación de placas : (microtécnica)

Se utilizan laminillas, en la mayoría de las veces porta-objetos, se cuales son cubiertos con 3 ml. de agar previamente fundido.

Se colocan las laminillas sobre un papel blanco que tiene el patrón de corte deseado, y los orificios son succionados al vacío con un orador de 2 mm. de diámetro. Los reaccionantes son vaciados en sus orificios y canales respectivos. Se deja correr por 24 horas a 32°C y se leen los resultados (4).

11.- Bibliografía

- 1.- Astudillo V., " El problema de la validez de una prueba de diagnóstico para uso masivo como procedimiento estadístico de clasificación ", Centro Panamericano, 43:37-43,1981.
- 2.- Badui S., " Química de los Alimentos ", Ed. Alhambra, México 1988, pp. 319-320, 405-411.
- 3.- Cesareo E., " Enciclopedia de la Carne ", Ed. Espasa Calpe, Madrid España 1987, pp. 583-584.
- 4.- Clausen J., " Técnicas Inmunoquímicas para la Identificación y Estimación de Macromoléculas ", Ed. El Manual Moderno, México 1975, pp. 16-19, 22, 97, 102-103.
- 5.- David B., " Determination of soy in meat ", J. Assoc. Off Anal. Chem, 70:85-90,1987.
- 6.- Dehesa S., " Manual sobre Usos de la Soya en Panificación ", Asociación Americana de Soya, México 1989, pp.7-13.
- 7.- Dottfrot P., " Elaboración de Productos Carnícos ", Ed. Trillas, México 1987, pp. 63-73.

8.- Eldridge A.C., " Determination of soy protein in processed foods", J.A.O.C.S. , 58:473-485, Marzo 1981.

9.- Esquinca E., " Determinación de dióxido de titanio en productos cárnicos adicionados con soya ", Tesis ULSA, 1990 pp.28-30.

10.- Fleischerei A., " Revista Internacional para la técnica de chacinería y elaboración cárnica", Hans Holzmann, Julio 1987, pp. 1-3.

11.- Flores G., " Diagnóstico de Gestación en ovejas mediante un Radio-inmunoanálisis rápido ", Tesis UNAM, Veterinaria 1988, pp. 5-9, 25-28.

12.- Gaston V., " Handbook of International Food Regulatory Toxicology ", Medical Scientific Book, 2:76, 1980.

13.- INCO, " Revista del consumidor ", Publicaciones del Instituto Nacional del Consumidor, México Marzo 1989, pp. 10-17.

14.- Instituto de Salud Pública de Chile, " Procedimiento y Técnicas de Laboratorio ", Editorial H. Lobes. Chile 1983, Volumen III, pp. 49-52, 124.

15.- John F., " Fundamentos de la Ciencia de la Carne ". Editorial Acribia, Zaragoza España 1975, pp. 183-189, 191.

16.- Kinsella E., " Criterio funcional para incrementar la utilización de proteínas de soya en alimentos ". Asociación Americana de soya, México 1989.

17.- Leiner I., " Nutritional Aspects of soy protein products ", J.A.O.C.S., 54:454 A-469 A, June 1987.

18.- Libby J., " Higiene de la Carne ". Compañía Editorial Continental, México 1981, pp. 467-468.

19.- Macías G., " Determinación del contenido de soya en productos cárnicos ", Tecnología de Alimentos, 21:21-28, 1986.

20.- Ministerio de Agricultura, " La Soya ". Dirección general de producción agraria, Madrid España 1983, p. 84.

21.- Price J.F. y Schweigert B., " Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos ", Editoria Acribia, Zaragoza España 1976, pp. 509-512.

22.- Rackis J.J., " Soybean protein : uses, problems and potential", J.A.O.C.S., 54:290-294 A, 1977.

23.- Rokosky J., " Soy grits, flour, concentrates and isolates in Meat product ", J.A.O.C.S., 51:123 A-127 A, 1974.

24.- Robert L., " Utilization of high levels of soy protein in comminutes processed meat product ", J.A.O.C.S., 51:195, 1974.

- comminutes processed meat product ", J.A.O.C.S., 51:195,1974.
- 25.- Roitt J., " Immunology ", Gower medical publishing, Second Edition, England 1989, pp. 251-253.
- 26.- Ronald K., " Analisis Químico de los Alimentos de Pearson ", Editorial C.E.C.S.A., México 1988, pp. 29-31.
- 27.- Saloma A., " Determinación Electroforética de las proteínas de soya en productos cárnicos ", Ralston Purina Company, 2:2-5, 1989.
- 28.- Schweigr R., " Soy protein and isolates in comminuted meat system ", J.A.O.C.S., 51:192 A-194A,1974.
- 29.- Secretaria de Salud, " Control Fisico-químico de Productos Cárnicos ", México 1989, pp. 13-15, 20-21.
- 30.- Sistema Alimentario Mexicano, Informe de resultados de la producción agrícola, ganadera y forestal ", S.A.R.H., México 1981, p. 93.
- 31.- Taylor R.J., " Food Aditives ", British Library 1986, pp. 13, 74-87.
- 32.- Tocaghi H., " Soya ", Editorial Albatros, Buenos Aires Argentina 1985, pp. 40-51.
- 33.- Wolf W. J., " Proteínas Comestibles de la soya y sus usos ", Asociación Americana de Soya, México 1977.
- 34.- Vazquez S., " Aditivos en Alimentos ", Editorial Acribia, Zaragoza España 1989, pp. 52, 60-61.