

302827
21
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U. N. A. M.

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UNA TECNICA
INMUNOENZIMATICA (ELISA) PARA LA
CUANTIFICACION DE SOYA EN
PRODUCTOS CARNICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ARIADNA ZEPEDA LOZANO

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

A mis padres:

Agradeciendo todo su cariño, paciencia, esfuerzo, cuidados y consejos para que pudiera alcanzar todas mis metas.

A mi hermano:

Por estar conmigo incondicionalmente en todo momento.

A mi esposo:

Por el amor, comprensión y apoyo que siempre me ha brindado.

A la Dra. Josefina Morales de León, Jefe del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A la Q.F.B. Laura Angélica Peralta Moska y al M.en C. Francisco Enrique Gómez Rodríguez, por la asesoría y dirección del presente proyecto.

A la Dra. Yolanda López Vidal, Investigador del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, por todo el apoyo brindado para la terminación de esta tesis.

A la Dra. Amanda Galvez, de la Facultad de Química de la UNAM, por toda la ayuda proporcionada para la finalización de esta tesis.

A la Biol. Rocío Sanchezarmas Luna, Q.F.B. Hortencia Villaviciencio Alvarez y Q.F.B. María de Guadalupe Orozco del Aguila por brindarme su amistad y ayuda en todos esos momentos difíciles.

A todo el personal del Departamento de Ciencia y Tecnología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al Ing. Ernesto Bautista Canela por todas sus enseñanzas, amistad y ayuda proporcionadas.

A la Q.F.B. Graciela Sosa por toda su ayuda.

A todo el profesorado de la Universidad Motolinía.

I N D I C E G E N E R A L

CAPITULO I.- INTRODUCCION	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Hipótesis	4
1.3. Objetivo	4
CAPITULO II.- ANTECEDENTES	5
2.1. Productos cárnicos	5
2.1.1. Definiciones	5
2.1.2. Clasificación de los productos cárnicos	6
2.1.2.1. Productos crudos	6
2.1.2.2. Productos escaldados	7
2.1.2.3. Productos cocidos	7
2.1.2.4. Productos curados	8
2.2. Aditivos	9
2.2.1. Definición de aditivos	10
2.2.2. Clasificación de los aditivos por su función	10
2.2.2.1. Conservadores	10
2.2.2.2. Antioxidantes	10
2.2.2.3. Acidulantes	11
2.2.2.4. Agentes surfactantes	11
2.2.2.5. Agentes secuestrantes o quelantes	12
2.2.2.6. Edulcorantes	12

2.2.2.7. Saborizantes	12
2.2.2.8. Colorantes	13
2.2.2.9. Nutrientes	13
2.3. Soya	14
2.3.1. Generalidades	14
2.3.2. Composición química de la semilla de soya	14
2.3.3. Formas comerciales de la proteína de soya	15
2.3.3.1. Marinas	15
2.3.3.2. Texturizada	17
2.3.3.3. Concentrados	17
2.3.3.4. Aislados	17
2.3.4. Propiedades funcionales de las formas comerciales de la proteína de soya	17
2.3.5. Legislación sobre el uso de proteína de soya en productos cárnicos	18
2.4. Métodos de detección de proteína de soya	20
2.4.1. Microscopía	20
2.4.2. Determinación de dióxido de titanio	20
2.4.3. Análisis de aminoácidos y péptidos	21
2.4.4. Electroforesis	22
2.4.5. Métodos inmunológicos	22
2.4.5.1. Clasificación de los métodos inmunológicos	23
2.4.5.1.1. Precipitación	23
2.4.5.1.2. Aglutinación	24

2.4.5.1.3. Inmunofluorescencia	25
2.4.5.1.4. Radioinmunoensayo	26
2.4.5.1.5. Ensayos inmunoenzimáticos	26
2.5. Desarrollo del inmunoanálisis en el área de alimentos	30
2.6. Validación	32
CAPITULO III.- PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1. Diagrama de flujo	34
3.2. Material	35
3.2.1. Material biológico	35
3.2.2. Material de laboratorio	35
3.2.3. Reactivos	38
3.3. Preparación de soluciones	40
3.4. Metodología	43
3.4.1. Obtención y evaluación del anticuerpo anti-soya	43
3.4.2. Obtención de muestras de jamón	47
3.4.3. Desarrollo y validación de la técnica ELISA para la cuantificación de proteína de soya en productos cárnicos.	47
CAPITULO IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	55
4.1. Resultados	55
4.2. Discusión	76

CAPITULO V.- CONCLUSIONES

82

BIBLIOGRAFIA

84

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N .

1.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Desde hace cientos de años, la soya ha formado parte importante en la dieta de las poblaciones asiáticas. Sin embargo, a partir de los años 20's se ha observado en América, un incremento de su aprovechamiento en la elaboración de productos alimenticios.

El uso de la proteína de soya en la industria de productos cárnicos se basa en las propiedades físicas y químicas que esta proteína posee: interviene en la retención de agua, en la estabilización de emulsiones, presenta propiedades antioxidantes y mejora la textura de los productos. Por otra parte, en algunas ocasiones se permite su adición con el objeto de sustituir a la proteína cárnica por la de origen vegetal, lo cual si no se informa en la etiqueta, constituye un fraude para el consumidor. Con el objeto de regular su empleo en los productos alimenticios se ha procedido, a la normalización y regulación de este tipo de productos. (33)

Con relación a la legislación en México sobre la adición de proteína de soya en los productos cárnicos, en la Norma Oficial Mexicana-Jamón Cocido NOM-F-123-S-1982 y en el Diario Oficial de la Federación del 18 de enero de 1988, puede observarse que no se

permite su empleo en el producto cárnico denominado jamón. (30,33)

No obstante, con base al Acuerdo de Concertación publicado el 6 de agosto de 1990 que suscriben: la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI), Empresas Productoras de Carnes Frías, la Cámara Nacional de la Industria de la Transformación (CANACINTRA) y representantes de las Empresas Líderes del Ramo, se establece una Pirámide de Calidades para la Comercialización de Jamones, que tiene como objetivo el de ofrecer al consumidor una variedad de productos más amplia y con precios diferenciales de acuerdo a su contenido de proteína, clasificándolos en jamones de grado: Extrafino, Fino, Preferente, Económico, Intermedio y Popular donde se especifica, que se permite la adición de otro tipo de proteína diferente a la de carne de puerco, ya sea animal o vegetal en un porcentaje máximo del 2%, únicamente a los productos denominados Preferentes, Económicos e Intermedios, encontrándose al aislado de proteína de soya como la más comunmente utilizada debido a su alto contenido protéico y a su bajo costo.

En la actualidad se cuenta con varios métodos propuestos para la detección de la proteína de soya como son: microscopía, determinación de dióxido de titanio, análisis de aminoácidos y péptidos, y electroforesis, sin embargo, no todos se han podido utilizar satisfactoriamente por poseer algunas limitantes, pero a partir de 1990 la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) aceptó el

método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (AOAC 988.10) el cual, representa el enfoque más prometedor para la determinación de la proteína de soya adicionada en los productos cárnicos. De aquí el interés en el desarrollo y validación de este método en el laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. (2,31,32)

1.2.- HIPOTESIS

Si los productos cárnicos están adicionados con proteína de soya, es posible cuantificarla por métodos inmunoenzimáticos como por ejemplo la técnica de ELISA.

1.3.- OBJETIVO

Desarrollar y validar la técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) por el método 988.10 del A.O.A.C. de 1990 para la cuantificación de proteína de soya en el producto cárnico denominado jamón.

CAPITULO II

A N T E C E D E N T E S.

2.1. PRODUCTOS CARNICOS

La carne ha sido consumida desde que el hombre se convirtió en cazador y fué entonces cuando surgió la necesidad de emplear diferentes técnicas para su consumo y conservación, las cuales fueron aprendidas a través del tiempo.(21)

Probablemente el procesado de la carne tuvo su origen cuando el hombre primitivo aprendió que mediante el empleo de sal, y posteriormente por la cocción la carne conserva sus cualidades sensoriales por más tiempo.(15)

Actualmente en el procesamiento de la carne se utilizan una diversidad de técnicas de conservación, que son aplicadas de manera individual o en forma combinada para mejorar su utilidad. Entre las más comunmente usados se encuentran: la refrigeración, la congelación, la deshidratación, los tratamientos con enzimas, las radiaciones, el uso de aditivos y sales de cura.(21,15)

2.1.1. DEFINICIONES

a) CARNE: Se define como el tejido muscular de los animales que se utiliza como alimento. Este tiene las características de ser un tejido muerto, no tener aporte de oxígeno a las células, además hay reducción de la temperatura y del potencial redox, desaparición del sistema inmunológico y desnaturalización de las proteínas, no hay ciclo de Krebs.(38)

b) PRODUCTO CARNICO: Es aquel que se elabora a partir de la carne o vísceras de los animales tales como: hígado, riñones, sesos pudiendo también contener otros ingredientes como: aditivos y condimentos para su elaboración.(9,27)

El objeto de elaborar o desarrollar nuevos productos cárnicos radica en:(22)

- a) Mejorar la conservación.
- b) Desarrollar sabores diferentes.
- c) Elaborar productos con carne que provenga de ciertas partes del animal difíciles de comercializar en estado fresco.(25)

2.1.2. CLASIFICACION DE LOS PRODUCTOS CARNICOS.

Por su forma o método de preparación pueden clasificarse de la siguiente forma:

2.1.2.1. PRODUCTOS CRUDOS.

Son productos de salchichonería elaborados de: carne, grasa de cerdo, vísceras y condimentos. Dentro de estos productos se encuentra el chorizo y el salami madurado, entre otros.

Estos productos no son sometidos a un tratamiento térmico y pueden consumirse frescos o cocinados después de la maduración. Esta etapa es importante para este tipo de productos ya que en ella se llevan a cabo ciertos cambios bioquímicos que se ven reflejados en:

- a) Pérdida de peso y acidificación lo que ayuda a la conservación.

b) Aumento en la consistencia por las proteínas liberadas durante el picado.

c) Formación de colores, sabores y olores característicos. (25,26)

2.1.2.2. PRODUCTOS ESCALDADOS.

Estos productos se elaboran a partir de carne fresca, no completamente madurada los cuales, posteriormente se someten a un proceso de escaldado, que se aplica con el objeto de disminuir la carga microbiana, lo que favorece la conservación y ayuda a coagular las proteínas para obtener una masa consistente.

El escaldado se refiere a un tratamiento térmico con agua caliente a 75°C, por un tiempo que varía en función del diámetro del embutido.

Dentro de estos productos se incluyen a la mortadela y a las salchichas. (25,26)

2.1.2.3. PRODUCTOS COCIDOS.

Los productos de este tipo se elaboran a partir de carne y grasa de cerdo, vísceras y sangre los cuales se someten a un tratamiento térmico antes de ser sazonados y embutidos; posteriormente se cuecen en agua y pueden ahumarse.

El cocimiento coagula las proteínas, favoreciendo la textura del producto, además de disminuir la carga microbiana.

Dentro de esta clasificación se mencionan a la morcilla, la moronga, el paté y el queso de puerco. (21,25,26)

2.1.2.4. PRODUCTOS CURADOS.

El curado se lleva a cabo mediante la adición de sales de cura como son: sal común, nitritos, nitratos, vinagre, azúcar, hierbas y especias a los productos, con el objeto de desarrollar ciertas características como son:

- a) Formación y estabilización del color rojo característico.
- b) Olor y sabor característico de la carne curada.
- c) Textura firme que proporciona un buen corte.
- d) Destrucción de microorganismos patógenos como el *Clostridium botulinum*.
- e) Reducción del contenido de agua del producto y, por lo tanto mayor conservación.

Para realizar ésta operación existen dos sistemas de curado:

- 1).- **CURADO EN SECO:** También conocido como salazón y que consiste en cubrir la superficie de las piezas de carne por frotación con sal común o con una mezcla de sales de cura. La penetración de los ingredientes se ve favorecida por los cambios de presión osmótica provocada por las sales. El jamón serrano es uno de los productos que se elabora por este procedimiento.
- 2).- **CURADO EN HUMEDO:** Consiste en utilizar agua como vehículo de las sustancias curantes, y se realiza sumergiendo las carnes en una salmuera o bien se introduce la salmuera en la carne por medio de inyección.

Dentro de estos productos se tiene el tocino y el jamón.

Este último método tiene como ventaja una completa disolución de las sustancias curantes, dando como resultado una distribución uniforme en el interior de la carne reduciéndose el tiempo de curado, en comparación con el curado en seco. (22,25,38)

2.2. ADITIVOS.

Los alimentos industrializados están constituidos por sustancias químicas propias de todo alimento como son: hidratos de carbono, lípidos, proteínas, vitaminas, nutrimentos inorgánicos y agua, pero además pueden contener otras sustancias químicas consideradas como aditivos, cuya interacción determina muchas de las características y propiedades de cada alimento. (26)

La aceptación de los alimentos depende de varios factores, principalmente de su sabor, textura, color, costo, valor nutritivo, vida de anaquel, facilidad de preparación y apariencia. (3,15)

Actualmente muchos de los avances tecnológicos en la industria alimentaria están relacionados con el empleo de los aditivos, dichos compuestos se adicionan a los alimentos con el propósito de cumplir una función específica en ellos y se hace de acuerdo con las especificaciones legales que existen para tal efecto. La utilización de los aditivos en los alimentos se ha incrementado más cada día, por lo que es necesario que exista un estricto control de estos para evitar su uso inadecuado. (8,12,26)

2.2.1. DEFINICION DE ADITIVOS.

Un aditivo puede definirse como una sustancia o mezcla de sustancias diferentes a las propias del alimento que se encuentran presentes como resultado de su adición permitida para mejorar alguna característica del alimento. (8,11,26)

2.2.2. CLASIFICACION DE LOS ADITIVOS POR SU FUNCION.

2.2.2.1. CONSERVADORES.

Son sustancias químicas estables que se usan fundamentalmente como inhibidores de crecimiento microbiano. La efectividad de estos en los alimentos depende de varios factores como son: su composición, nivel inicial de contaminación microbiana así como la forma en que se maneje, distribuya y almacene el producto terminado. (3)

Algunos de los conservadores más utilizados son: nitritos, nitratos, sulfitos, dióxido de azufre, ácido sorbico y sus sales, benzoato de sodio, ácido propiónico y sus sales, ácido acético y acetatos, óxidos de etileno y propileno, dietil pirocarbonato y antibióticos. (3,11)

2.2.2.2. ANTIOXIDANTES.

Estos aditivos se usan para proteger a los alimentos evitando la oxidación de los lípidos y otras sustancias como son algunas vitaminas. (3,36)

Dentro de este grupo se encuentran: butilhidroxianisol (BHA),

butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroquinona (BHQ) y tocoferoles (vitamina E).(3,27)

2.2.2.3. ACIDULANTES

Las funciones que tienen los ácidos son muy variadas, siendo unas de las más importantes y comunmente empleadas las de ser: saborizantes, conservadores, modificadores de viscosidad y además poseen una acción sinérgica con los antioxidantes, lo cual previene las reacciones de oscurecimiento que llegan a ocurrir en algunos alimentos.

Algunos de los más utilizados son los ácidos: propiónico, acético, sórbico, succínico, láctico, málico, cítrico, tartárico, benzóico y fosfórico.(3,11)

2.2.2.4. AGENTES SURFACTANTES, TENSOACTIVOS O EMULSIFICANTES.

Tienen la propiedad de reducir la tensión superficial entre dos fases inmiscibles. Debido a su naturaleza química, estos agentes tienden a concentrarse entre las dos fases, favoreciendo su interacción, lo cual se ve reflejado en la formación de un sistema estable de aceite en agua (mayonesa, helados) o agua en aceite (margarina).

Entre ellos se encuentran: ácido oléico, gnetina, metilcelulosa, gomas de acacia y tragacanto, monoestearato-polioxi-etileno de sorbitan (polisorbato) y lecitina entre otros.(3,11,27,36)

2.2.2.5. AGENTES SECUESTRANTES O QUELANTES.

La principal función es eliminar los iones metálicos que pueden tener acción perjudicial sobre la estabilidad de los alimentos, ya que evitan la acción de estos como en el caso del cobre y hierro que son los catalizadores más importantes de las reacciones de oxidación.

Los más comunmente usados son: polifosfatos, EDTA (ácido etilendiaminotetracético), ácidos: acético, cítrico, tartárico, oxálico, succínico, málico así como sus sales. (3,11)

2.2.2.6. EDULCORANTES.

Tienen la propiedad de endulzar a los alimentos.

Existen dos tipos de edulcorantes:

- 1) SINTETICOS: sacarina, aspartame, propilén glicol.
- 2) NATURALES: sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, sorbitol, manitol, glicerol. (11,36)

2.2.2.7. SABORIZANTES.

Uno de los usos más comunes es reponer los sabores que se pierden total o parcialmente durante el procesamiento o también pueden emplearse con la intención de proporcionar un sabor específico a un determinado alimento.

Dentro de este grupo se pueden encontrar dos clases:

- 1) NATURALES: extractos de hierbas y especias como menta, vainilla.
- 2) SINTETICOS: benzaldehído (cereza), butirato de etilo (piña), antranilato de metilo (uva). (27,36)

2.2.2.8. COLORANTES.

Debido a que el color en los alimentos es muy importante para los consumidores, estos aditivos son añadidos para conferirle un tinte o coloración deseados a un determinado alimento.

Dentro de este grupo podemos encontrar dos clases:

- 1) SINTETICOS: colorantes anilínicos.
- 2) NATURALES: extractos de achiote, caramelo, azafrán, caroteno.

(8,11)

2.2.2.9. NUTRIMENTOS.

El objetivo de la adición de otros compuestos, como es el caso de las vitaminas, minerales, aminoácidos, proteínas vegetales, etc., es para:

- a) RECONSTITUIR: alcanzar el contenido original de alguna sustancia antes de su procesamiento.
- b) NORMALIZAR: compensar la variación natural del contenido de algunas de estas sustancias después de su procesamiento.
- c) ADICIONAR: uno o más componentes o sustancias que pueden o no haber estado presentes en el alimento antes de su procesamiento.(3)

2.3. SOYA

2.3.1. GENERALIDADES:

La soya cuyo nombre botánico es *Glycine max*, es una planta leguminosa, originaria del centro de Vavilov (China). Su cultivo se inició hace más de cinco mil años y desde entonces ha sido una planta importante en la dieta de los pueblos orientales.

En nuestro país se introdujo en el año 1911. En un principio se pensó que podría sustituir al frijol, sin embargo se encontraron algunas desventajas para su aceptación como lo que respecta en cuanto a su sabor (muy acentuado a frijol), dificultad de cocción y principalmente la falta de costumbre de su consumo.

Sin embargo, en las últimas décadas ha existido un gran desarrollo científico y tecnológico en el aprovechamiento de esta planta, básicamente por su alto contenido y calidad de la proteína, bajo costo, además de tener propiedades funcionales adecuadas para utilizarlas como sustituto de proteínas animales en la elaboración de algunos alimentos. (1,3,7)

2.3.2. COMPOSICION QUIMICA DE LA SEMILLA DE SOYA.

La semilla de soya presenta la siguiente composición química: entre los minerales encontramos: fósforo, hierro, magnesio, calcio. Ácidos grasos tales como: linoléico, linolénico y oléico. Hidratos de carbono entre los cuales se encuentran: almidón, sacarosa, galactosa, rafinosa y estaquinoso. Proteínas: éstas forman la mayor parte de la

composición química, aproximadamente el 90% de las proteínas de soya son globulinas y el 10% restante son enzimas intracelulares (lipoxigenasa, ureasa, amilasa), lipoproteínas de las membranas celulares. (5,13,14)

El porcentaje de esta composición se representa en el Cuadro 1.

Por medio del análisis de electroforesis, punto isoeléctrico y ultracentrifugación se pudieron conocer las cuatro fracciones que forman las proteínas de la soya, las cuales se designan como: 2s, 7s, 11s y 15s, y cuya clasificación está basada en su coeficiente de sedimentación. Cada una de estas fracciones están formadas a su vez por diferentes proteínas, cuyo porcentaje se presentan en el Cuadro 2. (3,14,16)

2.3.3. FORMAS COMERCIALES DE LA PROTEINA DE SOYA.

Actualmente, la semilla de soya se procesa para la obtención de diferentes productos, que se clasifican de acuerdo a su contenido de proteína. Cada uno posee ciertas características y propiedades que los hacen adecuados para su utilización en diversos alimentos.

2.3.3.1. HARINAS

Existen diferentes tipos de harina de soya, pero las más comúnmente empleadas son las harinas integrales y desgrasadas, siendo las segundas las más usuales debido a que la extracción del aceite de soya resulta ser económicamente ventajosa para los procesadores de soya.

El contenido de proteína en la harina de soya es: en la integral de 41.5% y en la desgrasada de 51.0%(1,3,13,19,23)

CUADRO 1. PORCENTAJE DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LA SEMILLA DE SOYA. (g/100g)

PROTEINAS	EXTRACTO ETEREO	HIDRATOS DE CARBONO	CENIZAS	FIBRA CRUDA	HUMEDAD
40	18	27.7	5	1.5	8

CUADRO 2. FRACCIONES Y PORCENTAJE DE LA FRACCION DE LA SEMILLA DE SOYA.

FRACCION
2s (22%)
Inhibidor de tripsina
Citocromo c
Conglicina
Globulina 2.3s
Globulina 2.8s
7s (36%)
Hemaglutinina
Lipoxigenasa
Beta-amilasa
Globulina 7s
11s (31%)
Globulina 11s
15s (11%)

2.3.3.2. TEXTURIZADA

Este producto se obtiene por un proceso de extrusión termoplástica, con el cual se forman estructuras fibrosas y voluminosas. Contiene aproximadamente 53.4% de proteína y puede estar adicionada de sazónadores, saborizantes, colorantes, enriquecedores, etc. (3,7,19,37)

2.3.3.3. CONCENTRADOS

Los productos de este tipo son más refinados que los anteriores ya que contienen un mínimo de 70% de proteína. (3,19,23)

2.3.3.4. AISLADOS

Este derivado es la forma más purificada de proteína de soya, pues contiene un mínimo de 90% de proteína. (1,3,19,37)

2.3.4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS FORMAS COMERCIALES DE LA PROTEÍNA DE SOYA:

Estas propiedades dependen básicamente del contenido y calidad de sus proteínas (Cuadro 3).

Los efectos de estas propiedades funcionales en un producto cárnico son los siguientes:

- a) Retención de agua lo cual se ve reflejado en un aumento considerable del rendimiento.
- b) Aumento en la aglutinación, debido a la incorporación de la proteína de soya con las proteínas miofibrilares por la concentración

de fosfatos y sal.

c) Textura, hay una mayor suavidad con respecto al esfuerzo cortante.

d) Actividad antioxidante. (4,12,29)

CUADRO 3. PROPIEDADES FUNCIONALES Y USOS DE LAS FORMAS COMERCIALES DE LA PROTEINA DE SOYA.

PROPIEDAD FUNCIONAL	FORMA COMERCIAL	EMPLEO EN ALIMENTOS
EMULSIFICACION		
- Formación	H,C,A	Salchicha, sopas
- Estabilización	H,C,A	Crema chantilly, pasteles
ABSORCION DE GRASA		
-Promoción	H,C,A	Embutidos
-Prevención	H,A	Donas
ABSORCION O RETENCION DE AGUA		
- Absorción	H,C	Pasteles, salchichas
-Retención	H,C	Pan, carnes
TEXTURA	H,C,A	Sopas, salsas

H= harina C= concentrado A= aislado (4)

2.3.5. LEGISLACION SOBRE EL USO DE PROTEINA DE SOYA EN

PRODUCTOS CARNICOS.

Actualmente existe una marcada tendencia a sustituir las proteínas animales por las de origen vegetal, debido a las propiedades funcionales que confieren al alimento, a su contenido y calidad protéica y por su menor costo.

Respecto a los productos cárnicos, la legislación en México de acuerdo con el artículo 490 del Diario Oficial de la Federación del 18 de enero de 1988, estipula que la adición de proteína de soya sólo se permite en productos de tipo emulsionado, en un porcentaje de hasta un 3.5% para el concentrado o harina de soya y en un 2% para el de tipo aislado. Sin embargo, con fecha 6 de agosto de 1990 se firma un Acuerdo de Concertación en el cual se suscriben la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI), Empresas Productoras de Carnes Frías, la Cámara Nacional de la Industria de la Transformación (CANACINTRA), así como los Representantes de las Empresas Líderes del Ramo, creando una Pirámide de Calidades para la Comercialización de los Jamones.

En este acuerdo se clasifica al jamón en diferentes grados de calidad con base en su contenido de proteína permitiéndose además, la adición de otro tipo de proteína, ya sea animal o vegetal en un 2% a los jamones de grado de calidad preferente, económico e intermedio (Cuadro 4). (30,31,32,33)

CUADRO 4. CLASIFICACION DE JAMONES EN GRADOS DE CALIDAD DE ACUERDO A SU CONTENIDO DE PROTEINA.

GRADO DE CALIDAD	% DE PROTEINA	% DE PROTEINA ADICIONADA
EXTRAFINO	18	0
FINO	16	0
PREFERENTE	14	2
ECONOMICO	12	2
INTERMEDIO	11	2
POPULAR	10	0

2.4. METODOS DE DETECCION DE PROTEINA DE SOYA.

En la literatura se ha informado de varios métodos para la determinación de la proteína de soya en productos cárnicos, cada uno de los cuales cuenta con ciertas ventajas y desventajas que a continuación se mencionan:

2.4.1. MICROSCOPIA.

Se identifica microscópicamente, por medio de una fuente de luz polarizada, la presencia de las células características de la soya, que son en forma de "I" o de reloj de arena. Estas pueden observarse en el residuo fibroso que se separa cuando se trata la muestra en un ácido y álcali diluido.

Este método es cualitativo y tiene la limitante de que muchas veces durante el proceso de extracción de las células de la soya, se rompen, por lo cual se dificulta su detección. Además de que sólo pueden identificarse las harinas de soya y soya texturizada mas no los aislados y concentrados de la proteína de soya en los productos cárnicos en los cuales fueron adicionadas. (10,20,24,34)

2.4.2. DETERMINACION DE DIOXIDO DE TITANIO (INDIRECTO).

Este método cuantifica de manera indirecta la concentración de soya adicionada en el producto, con base en la cantidad de dióxido de titanio presente detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 408nm.

El método resulta ser preciso, sencillo, rápido y de bajo costo,

sin embargo, posee algunas limitaciones como son las que en México muchas veces a la soya no se le adiciona este marcador y en caso de hacerlo, la legislación sólo lo permite para los productos de tipo aislado de soya, por lo que no se podrían identificar los concentrados, harinas y texturizados comunmente adicionados en los productos cárnicos. Además de que, existen muchos países en los que no permiten que estos productos contengan químicos por lo cual, para fines de comercialización internacional muchas industrias excluyen su empleo. (6,20)

2.4.3. ANALISIS DE AMINOACIDOS Y PEPTIDOS.

Se basa en la presencia y secuencia de aminoácidos. La mezcla de carne y proteína de soya es tratada con una enzima proteolítica como la tripsina, dando como resultado una mezcla de péptidos los cuales, pueden analizarse por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o en un autoanalizador de aminoácidos.

Sin embargo, éste método también presenta desventajas, ya que las diferencias entre los aminoácidos de las proteínas de soya y de la carne no son suficientemente marcadas como para desarrollar ésta técnica cuantitativamente. Además de que en algunos productos pueden estar presentes otras proteínas derivadas de alimentos como: leche, huevo, harinas de pescado, etc., por lo que el análisis resulta poco confiable. (23,24)

2.4.4. ELECTROFORESIS.

Consiste en la separación de las proteínas por su carga y tamaño en presencia de un campo eléctrico. Este método es uno de los más recomendables con respecto a los anteriores por su alto poder de resolución, pero también posee ciertas limitaciones como es la desnaturalización de las proteínas debido a el tratamiento térmico ocurrido durante la elaboración de los productos cárnicos, ya que esto dificulta su solubilización y por lo tanto, su separación.

Así mismo durante la detección de las proteínas por éste método es necesaria la adición de un agente detergente como el dodecil sulfato de sodio (SDS) que se utiliza para separar las subunidades que componen a las proteínas oligoméricas y neutralizar sus cargas, lo cual provoca una reducción al mínimo de las diferencias de carga y por lo tanto, dificulta la separación de las proteínas. (10,24)

2.4.5. METODOS INMUNOLOGICOS.

Los métodos inmunológicos se basan en la reacción antígeno-anticuerpo y son usados en ensayos o procesos de detección por su gran especificidad y sensibilidad por lo que, el usar anticuerpos o antígenos marcados es de gran utilidad para el análisis. (16,17)

Estos métodos son los más recomendables, al igual que el anterior para la determinación de proteína de soya en productos cárnicos gracias a las diferencias filogenéticas existentes entre las proteínas animales y las vegetales como es la proteína de soya.

- ANTIGENO (Ag) es toda sustancia aislada o presente en

microorganismos o células, capaz de inducir una respuesta inmune.
- ANTICUERPO (Ac) o INMUNOGLOBULINAS (Ig) son proteínas globulares producidas por un organismo, capaces de reaccionar con el antígeno que indujo su producción. El organismo produce un anticuerpo distinto para cada antígeno por lo cual, la reacción antígeno-anticuerpo es específica. Con base en su función y estructura molecular se dividen en 5 clases: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. (16,17)

2.4.5.1. CLASIFICACION DE LOS METODOS INMUNOLOGICOS.

Existen diversos métodos inmunológicos los cuales, utilizan diversas sustancias como marcadores, del uso de estos marcadores es de donde generalmente deriva su nombre.

2.4.5.1.1. PRECIPITACION.

Estas pruebas se conocen también como pruebas de Ouchterlony. Se basan en que cuando los antígenos solubles son mezclados directamente con su correspondiente anticuerpo, se forman largos complejos moleculares los cuales son visibles a simple vista. (28)

Pueden dividirse en dos:

a) DOBLE DIFUSION EN GEL: Se utiliza un gel como matriz para realizar la precipitación de las bandas. Se hacen perforaciones en el gel, comunmente se coloca un pozo central con el anticuerpo y 5 ó 6 pozos circundantes que contienen las muestras. La formación de bandas de precipitación entre el pozo central y los circundantes nos da información de la presencia de antígeno en la muestra. (28,29,35)

b) INMUNODIFUSION RADIAL: Es un método para cuantificar antígeno en una muestra.

El anticuerpo es distribuido en el gel y el antígeno es colocado en un pozo y se forma una zona opaca por la precipitación de los complejos inmunes formados.

La concentración de antígeno en una muestra se obtiene por el diámetro de la zona de precipitación comparada con una curva estándar de concentraciones conocidas de antígeno. (28,29)

Estas técnicas tienen las ventajas de:

- No consumir demasiado tiempo para su realización.
- No requiere equipo muy costoso.

Pero también posee la desventaja de que la lectura de los resultados es cualitativa o semicuantitativa. (28,29)

2.4.5.1.2. AGLUTINACION.

El fundamento es el mismo que el de las reacciones de precipitación excepto porque depende de la solubilidad que presenta el antígeno o el anticuerpo. (28)

La aglutinación ocurre cuando una suspensión apropiada de células es mezclada con un anticuerpo específico, cambiando de una solución clara a una turbia o lechosa. Esta aglutinación se mide comparándola con una curva estándar con concentraciones conocidas de antígeno. (28,29)

Este método tiene las ventajas de: no requerir equipo costoso y que los resultados se obtienen en poco tiempo.

Pero tiene las desventajas de:

- Haber interferencias en las muestras.
- Dificultad en la interpretación de resultados, especialmente en concentraciones bajas de la sustancia problema.(28,35)

2.4.5.1.3. INMUNOFLOURESCENCIA.

En éste método se usan compuestos fluorescentes como marcadores.

La inmunofluorescencia puede ser directa o indirecta:

a) DIRECTA: En este caso el antígeno en solución se localiza por el empleo de un anticuerpo que ha sido marcado con una sustancia fluorescente como la fluoresceína.

b) INDIRECTA: Este método se lleva a cabo en dos pasos:

1) Se incuba el antígeno en un sustrato con anticuerpos marcados, después se hace un lavado para remover los anticuerpos en exceso.

2) Se usa un anticuerpo anti-IgG marcado con una sustancia fluorescente (fluoresceína), que reaccionará con el anticuerpo que no fué removido por el lavado por estar unido al antígeno, así se logrará visualizar si la primera reacción del antígeno-anticuerpo tuvo lugar.

Esta técnica tiene algunas desventajas como son:

- Consume demasiado tiempo para su realización.
- No puede automatizarse.
- Es relativamente cara, pues requiere de un aparato costoso como es el microscopio de fluorescencia.

- La lectura de los resultados es cualitativa o semicuantitativa.
(12,28)

2.4.5.1.4. RADIOINMUNOENSAYO (RIA).

En el método se utilizan radioisótopos como marcadores, los cuales se colocan en una solución donde se encuentra el antígeno que se quiere medir. Se agrega el anticuerpo no marcado y se mide la cantidad de antígeno presente con base en la competencia que existe entre el anticuerpo marcado y el no marcado para unirse al antígeno. Para cuantificar la cantidad de sustancia presente debe elaborarse una curva de calibración.

Este método tiene la gran ventaja de ser muy sensible, pero también, posee desventajas como son:

- Los isótopos más utilizados que son I^{125} y I^{131} que tienen una vida media corta.
- Sus desintegraciones destruyen algunas estructuras moleculares.
- Requiere medidas especiales de seguridad debidas al manejo de materiales radiactivos.(12)

2.4.5.1.5. ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS (EIA).

En estos ensayos se utilizan enzimas como marcadores.

Este tipo de análisis poseen grandes ventajas sobre los demás como son:

- Los reactivos son baratos y fáciles de preparar.
- Son estables.

- No es dañino para el operador pues usa enzimas como marcadores.
- La lectura de resultados es objetiva y fácil de realizarse espectrofotométricamente. (12)

Los ensayos inmunoenzimáticos se clasifican en dos:

- 1) HETEROGENEOS: El anticuerpo o el antígeno marcados con la enzima se separa del complejo antígeno-anticuerpo marcado antes de la medición de la actividad enzimática.
- 2) HOMOGENEOS: En los cuales la actividad enzimática del antígeno o del anticuerpo marcado se mide en presencia del complejo antígeno-anticuerpo marcado.

En ambos tipos de EIA un antígeno o un anticuerpo puede ser unido a una enzima, conservando sus características inmunológicas y enzimáticas intactas.

Los ensayos inmunoenzimáticos se han extendido ampliamente en la industria alimentaria y dentro de estos ensayos encontramos los llamados ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). (12,28)

METODO INMUNOENZIMATICO ELISA:

En esta técnica las enzimas que más se usan como marcadores son la fosfatasa alcalina, la peroxidasa y la glucosa oxidasa. Los sustratos de estas enzimas cuando son degradados provocan una coloración la cual, puede distinguirse a simple vista y ser medida colorimétricamente.

De todos los ensayos inmunológicos éste es el más sensible, en virtud de que permite medir concentraciones muy bajas de un antígeno.

Para que una determinación por el método ELISA sea sensible, fácil de montar y barato, la enzima a utilizar debe de tener las siguientes características:

- Ser estable a 25-37°C y tener una vida de anaquel de por lo menos 6 meses a 4°C.
- La enzima purificada debe ser fácil de obtener.
- La actividad enzimática debe ser fácilmente medida por métodos colorimétricos.
- Debe detectarse en pequeñas cantidades.
- Ser relativamente barata. (12,28,29)

El método ELISA se divide en dos grupos:

1.- COMPETITIVO.

Este método se emplea para cuantificar anticuerpos o antígenos, es similar al radioinmunoensayo (RIA). Se basa en hacer reaccionar cantidades constantes y limitadas de conjugado con la finalidad de saturar sus sitios de unión adsorbidos al soporte, de manera que si existe en la muestra la misma especie molecular del conjugado ambas competirán para unirse a la fase sólida quedando libre parte del conjugado que se eliminan al momento del lavado, por consecuencia habrá un menor desarrollo de color.

En este tipo de ensayo es necesario realizar una curva estándar usando estándares de concentraciones conocidas, para interpolar la lectura obtenida de la muestra. (18,28)

2.- NO COMPETITIVOS.

Estos a su vez se dividen en dos categorías, las cuales son:

a) METODO DEL DOBLE SANDWICH O DOBLE ANTICUERPO.

Es el más empleado para la determinación de antígenos y consiste en cubrir la fase sólida con un anticuerpo al que se unirá el antígeno presente en la muestra durante el periodo de incubación. Después del lavado, se adiciona un segundo anticuerpo unido a una enzima, el que reconocerá un epítope diferente del antígeno; finalmente, se elimina el exceso de este, se adiciona el sustrato y se cuantifica el color desarrollado el cual, es directamente proporcional a la concentración del antígeno.(28)

b) ELISA INDIRECTO

Se utiliza en la determinación de anticuerpos presentes en una muestra biológica por lo que, el antígeno conocido es inmovilizado en la fase sólida. Después de que se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, se separa el exceso de anticuerpo por medio de lavados y la presencia del anticuerpo unido se muestra mediante una anti-inmunoglobulina marcada con la enzima. La actividad enzimática se mide después de una etapa final de lavado y el desarrollo de color es directamente proporcional a la concentración del anticuerpo buscado.(28)

ELISA POR INHIBICION

Este ensayo es una combinación de ELISA competitivo e indirecto. En este, la parte fundamental es la unión del antígeno con un exceso de anticuerpos; de estos anticuerpos los que quedan sin reaccionar con el antígeno se ponen en una placa previamente sensibilizada con antígeno los cuales, son los que se cuantifican. En este ensayo el color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración del antígeno.

2.5. DESARROLLO DEL INMUNOANÁLISIS EN EL ÁREA DE ALIMENTOS.

Las técnicas de análisis han sido un elemento muy importante dentro del área de la química y estas han tenido grandes avances a través del tiempo para satisfacer las necesidades de los adelantos tecnológicos.

Las técnicas de inmunoensayo han tenido un gran auge desde hace 20 años dentro del área del diagnóstico clínico. Sin embargo, hasta hace poco tiempo el inmunoensayo ha tenido poco uso dentro del análisis de alimentos siendo que estos métodos tienen una superior especificidad y sensibilidad que otros métodos químicos.

El inmunoensayo por ser selectivo y sensitivo depende de la especificidad y afinidad del anticuerpo por el antígeno. ELISA por ejemplo, puede detectar y medir nanogramos y picogramos de la sustancia a analizar en una mezcla de complejos.

En paralelo con el desarrollo en el diagnóstico clínico, el análisis de alimentos basado en anticuerpos, se ha incrementado con

el empleo de estuches comerciales, los cuales contienen todo el equipo necesario para determinar la proteína específica del alimento. El uso de estuches comerciales requiere de poca destreza técnica, la única manipulación necesaria es la extracción del alimento, la aplicación de los extractos y reactivos del estuche y los pasos intermedios de lavado.

Recientemente, los inmunoensayos han tenido un gran número de aplicaciones en el área de los alimentos por las nuevas tendencias gubernamentales en los procesos industriales y en el control industrial sobre la composición y calidad de ellos.

Los métodos inmunoenzimáticos se han utilizado para la determinación y cuantificación de especies extrañas en alimentos, contaminantes, toxinas bacterianas y fúngicas (especialmente en granos) residuos de antibióticos y pesticidas. También se han empleado para identificación de variedades o tipos de plantas, en el estudio de alteración o degradación de componentes del alimento durante su procesamiento.

Con respecto a los productos cárnicos, también se han utilizados métodos inmunológicos: inmunodifusión radial para detectar proteína de soya, especies presentes diferentes a la de cerdo. Por la técnica ELISA, se han hecho estudios sobre detección y cuantificación de diferentes especies presentes en los productos, de caseinato y de proteína de soya principalmente.

2.6. VALIDACION.

Una vez desarrollada una técnica analítica, es necesario que esta sea validada, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por ella producidos son confiables, para que de esta forma el químico se de cuenta si la técnica evaluada sistemáticamente cumple con los propósitos para los cuales fue diseñada.

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Esa capacidad se expresa, en términos de variables analíticas.

Las variables a valorar, dependiendo de la aplicación del método son:

1) ESPECIFICIDAD.

Es la propiedad del método analítico para producir una respuesta medible debida unicamente a la presencia de la sustancia de interés, libre de interferencia de otros componentes de la muestra.

2) SENSIBILIDAD.

Esta corresponde a la mínima cantidad de sustancia analizada que puede producir un resultado significativo.

3) PRECISION.

Es la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde, al grado de concordancia entre resultados

analíticos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alicuotas de una muestra homogénea.

También es la medida del grado de reproducibilidad del método analítico.

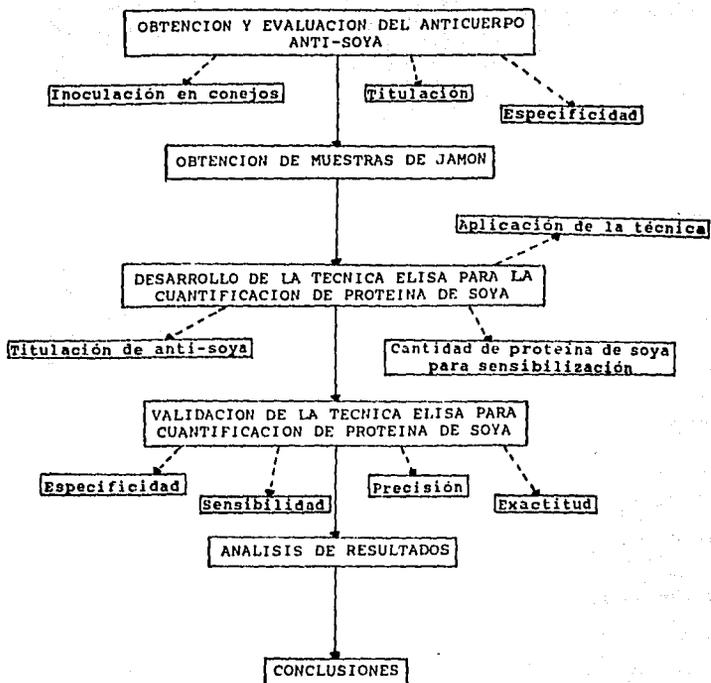
4) EXACTITUD.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente (media) y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recuperación obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. DIAGRAMA DE FLUJO.



3.2. MATERIAL

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Adyuvante de Freund's completo marca Gibco.

Anticuerpo anti-soya inmunizado en conejo marca Sigma.

Anticonejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra marca Dako.

Conejos machos raza Nueva Zelanda de 2.5Kg

Sueros de rata, conejo, cabra, borrego, gallina, res, perro, cerdo, burro, caballo y humano.

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Matraces aforados 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 mL

Vasos de precipitados 1000, 500, 250, 100, 50 mL

Matraces Erlenmeyer 1000, 500, 250, 125 mL

Pipetas Pasteur

Probetas 500, 250, 100, 50, 25 mL

Tubos de ensaye 13x100, 12x75 mm

Pipetas serológicas 10, 5, 2, 1 mL

Pipetas volumétricas 10, 5 mL

Matraces Kjeldahl 800 mL

Charolas de aluminio

Mortero 13 cm de diámetro

Recipiente de plástico

Microplacas de 96 pozos para pruebas de ELISA

Puntas para micropipeta 1-10, 10-100, 100-1000 μ l
Tubos Eppendorf 1.5 mL
Recipientes para reactivo 75 mL
Jeringas desechables 5, 10, 20 mL
Membrana de nitrocelulosa poro 0.45 micras
Matraces Kitasato 500 mL
Embudos Buchner 56 mm de diámetro
Termómetro 0-120°C
Pinzas para crisol 45 cm
Desecador 250 mm de diámetro
Papel Whatman No.4
Tubos de rosca 16x150 mm
Caja Petri 15x100 mm
Bureta 50 mL
Papel glasine
Gasa
Gradilla para tubos
Papel parafilm
Cinta adhesiva
Espátula
Algodón
Aplicadores
Micropipetas 1-10, 10-100, 100-1000 μ l
Pipeta multicanal 50-200 μ l

EQUIPO

EQUIPO	MODELO	MARCA
Agitador de tubos	LU3-3RH	Coulter Electronics
Espectrofotómetro	250	Gilford
Lector para microplacas de ELISA 410-630nm	MR600	Dynatech Laboratories
Baño de incubación 1-100°C	-----	J.M.Ortiz
Digestor y destilador Kjeldhal	-----	Labconco
Estufa	-----	Lab-line Instruments
Balanza analítica 0.1-110g	1800	Tecator
Parrilla de calentamiento y agitación	53166	Lindberg
Centrifuga 100-5000rpm	0510	IEC
Potenciómetro	Zeromatic IV	Beckman
Estufa de incubación 0-120°C	E-80	J.M.Ortiz
Agitador de tubos	1280	Lab-line Instruments
Refrigerador	Trim wall	Kelvinator
Campana de extracción	-----	-----
Balanza granataria	-----	Ohanus
Agitador orbital	-----	Lab-line Instruments

3.2.3. REACTIVOS

REACTIVO	MARCA	GRADO DE REACTIVO
Hidróxido de sodio	Mallinckrodt	G.A.
Etanol absoluto	J.T.Baker	A.C.S.
Metanol	J.T.Baker	A.C.S.
Metanol	J.T.Baker	Q.P.
Acido clorhídrico	J.T.Baker	A.C.S.
Acido sulfúrico	J.T.Baker	A.C.S.
Cloroformo	J.T.Baker	A.C.S.
Tris(hidroxiometil)aminometano	Sigma	G.A.
Albúmina sérica bovina	Sigma	G.A.
Albúmina sérica bovina libre de gamma globulinas	Sigma	G.A.
Dodecil sulfato de sodio	Sigma	G.A.
2-mercaptoetanol	Sigma	G.A.
o-fenilendiamina	Sigma	G.A.
Carbonato de sodio	Mallinckrodt	G.A.
Bicarbonato de sodio	Mallinckrodt	G.A.
Urea	Mallinckrodt	G.A.
Cloruro de sodio	Mallinckrodt	G.A.
Reactivo de Folin 2N	Sigma	G.A.
Sulfato de cobre pentahidratado	Mallinckrodt	G.A.
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado	Mallinckrodt	G.A.

Tartrato de sodio y potasio	Mallinckrodt	G.A.
Cloruro de potasio	Mallinckrodt	G.A.
Fosfato de potasio monobásico	Mallinckrodt	G.A.
Peróxido de hidrogeno al 30%	Mallinckrodt	G.A.
Xilol	Mallinckrodt	G.A.
Acetona	Merck	G.A.
Acido cítrico monohidratado	J.T.Baker	A.C.S.
Dióxido de selenio	Merck	G.A.
Sulfato de potasio	J.T.Baker	A.C.S.
Acido bórico	J.T.Baker	A.C.S.
Rojo de metilo	J.T.Baker	A.C.S.
Zinc en polvo	J.T.Baker	Q.P.
Eter	J.T.Baker	A.C.S.
Tween 20	Fisher scientific	G.A.
4-cloro-1-naftol	Biorad	G.A.

*NOTA: Q.P.= Químicamente puro

G.A.= Grado analítico

A.C.S.= Producto que cumple con las especificaciones de la Sociedad Química Americana

3.3. PREPARACION DE SOLUCIONES.

a) SOLUCIONES PARA DOT ELISA.

1.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS) pH 7.4, 0.1M

NaCl	8.00 g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	2.17 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
KCl	0.20 g

Ajustar el pH con NaOH 0.1N. Aforar a 1000 ml con agua desionizada.

2.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos 0.1M con Tween 20 0.05% (PBST)

NaCl	8.00 g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	2.17 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
KCl	0.20 g
Tween 20	0.50 ml

Ajustar el pH con NaOH 0.1N. Aforar a 1000 ml con agua desionizada.

3.- Solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS

BSA	0.30 g
-----	--------

Disolver BSA en 10 ml de PBS.

4.- Solución sustrato..

*Solución amortiguadora fosfato-citrato pH 5.0

Ac. citrico 0.5105 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.3780 g

Ajustar el pH con NaOH o HCL 0.1N. Aforar a 100 ml con agua desionizada.

*Sustrato

o-fenilendiamina 40 mg

Peróxido de hidrógeno

al 30% 40 μl

Disolver en los 100 ml de amortiguador fosfato-citrato.

Preparar inmediatamente antes de usarse y guardar en frasco ambar.

5.- Solución H_2SO_4 2.5M

H_2SO_4 33.99 ml

Agregar lentamente a el agua desionizada en baño de hielo y aforar a 250 ml

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. OBTENCION Y EVALUACION DE ANTICUERPO ANTI-SOYA

Se obtuvo el anticuerpo anti-soya por inmunización en conejos con el fin de poder sustituir el anti-soya comercial (Sigma) debido a la limitante de que es de difícil adquisición por ser un reactivo de importación, y de que su costo es más elevado.

A) PREPARACION DEL EXTRACTO DE PROTEINA

- 1.- Pesar 100 mg de aislado de proteína de soya
- 2.- Añadir 2 ml de amortiguador Tris-HCl + 6 g de urea + 2 ml de agua desionizada + 200 μ l de 2-mercaptoetanol + 6 ml de agua desionizada.
- 3.- Colocar en baño de agua a 95°C por un tiempo de 60 min.
- 4.- Enfriarlos de 3-5 min.
- 5.- Aforar a 25 ml con agua desionizada.
- 6.- Someter el extracto a diálisis en PBS a 4°C con agitación durante 3 días.
- 7.- Determinar proteínas por el método de Lowry.

B) PREPARACION Y APLICACION DEL INMUNOGENO

- 1.- Inmunizar 2 conejos machos de raza Nueva Zelanda con una mezcla de 0.5 ml de Adyuvante de Freund's completo y 0.5 ml de extracto de proteína de soya (1.4mg)
- 2.- Tomar una sangría de prueba antes de cada inoculación.

- 3.- Dar refuerzos a los 20, 40, 60 y 80 días de igual forma.
- 4.- Al final de los refuerzos hacer una sangría a blanco por punción cardiaca.
- 5.- Separar el suero por centrifugación a 3000rpm por un tiempo de 10 min.
- 6.- Alicuotar los sueros y guardarlos en congelación.

C) TITULACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA

Se realizó para conocer su potencia y determinar la dilución óptima con la cual, se trabajaron los anticuerpos:

- 1.- Aplicar 1 μ l de las diluciones de extracto de proteína de soya en concentraciones 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/ml en la membrana de nitrocelulosa.
- 2.- Secar a temperatura ambiente.
- *3.- Bloquear con 2.5 ml de albúmina sérica bovina al 3% en PBS por un tiempo tiempo de 60 min.
- *4.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 5.- Preparar en tubos de ensaye las diluciones del anticuerpo anti-soya 1:100, 1:250, 1:500, 1:800, 1:1000, 1:1500.
- *6.- Incubar las tiras de nitrocelulosa con 2.5 ml de las diluciones del anticuerpo anti-soya por un tiempo de 60 min.
- *7.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- *8.- Incubar con 2.5 ml del anti-conejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra (titulado previamente) por un tiempo de 60 min.

- *9.- Lavar 4 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
 - 10.- Sumergir en la solución sustrato por un tiempo aproximado de 15 min.
 - 11.- Sumergir en agua destilada para detener la reacción.
- * Realizar estas operaciones con agitación y a temperatura ambiente

NOTA: PBST= amortiguador de fosfatos salinos con tween 20

PBS= amortiguador de fosfatos salinos.

D) DETERMINACION DE ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA.

Esto fué con el objeto de verificar si los anticuerpos anti-soya presentan alguna reacción cruzada con otro tipo de proteína que no sea la de soya.

Se utilizaron proteínas vegetales: diferentes presentaciones de proteína de soya: harina, concentrado, aislado, soya texturizada así como trigo, lenteja, sorgo, frijol, garbanzo, maíz, arroz y dentro de las proteínas animales se tendrán: gretina, caseína y sueros de diferentes especies animales: cerdo, caballo, vaca, pollo, burro, perro, conejo, borrego, rata, cabra; como a continuación se describe:

- 1.- Obtener los extractos de proteínas disolviéndolas en PBS en una concentración de 4 mg/ml.
- 2.- Aplicar 1 µl de cada muestra en la membrana de nitrocelulosa.
- 3.- Secar a temperatura ambiente.
- *4.- Bloquear con 2.5 ml de albúmina sérica bovina al 3% en PBS.

- *5.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- *6.- Incubar con 2.5 ml del anticuerpo anti-soya en la dilución óptima, por un tiempo de 60 min.
- *7.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- *8.- Incubar con 2.5 ml del anti-conejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra (titulado previamente) por un tiempo de 60 min.
- *9.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 10.- Sumergir en solución sustrato por un tiempo aproximado de 15 min.
- 11.- Sumergir en agua destilada para detener la reaccion.
- * Realizar estas operaciones con agitación y a temperatura ambiente.

Siguiendo la metodología anteriormente descrita, se comprobó que no existiera reaccion cruzada entre las proteínas empleadas en el sistema de captura (anticuerpo anti-soya, anti-conejo conjugado con peroxidasa y soya) de acuerdo al siguiente cuadro:

SOYA	ANTICUERPO ANTI-SOYA	ANTI-CONEJO CONJUGADO CON PEROXIDASA
+	+	+
-	+	+
+	-	+
+	+	-

+ = Presencia de reactivo.
 - = Ausencia de reactivo

3.4.2. OBTENCION DE MUESTRAS DE JAMON.

Como testigos internos se utilizaron muestras de jamón elaboradas en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Estas se adicionaron de la proteína de soya en concentraciones conocidas, estos testigos internos se utilizaron para el desarrollo y validación del método ELISA que fué útil para la cuantificación de proteína de soya en productos cárnicos.

Dichas muestras fueron codificadas de la siguiente manera:

MUESTRA	TIPO DE PROTEINA ADICIONADA	% DE PROTEINA ADICIONADA
RPT	---	0
HOB	CASEINATO	12
LKE	SOYA	14
JPV	SOYA	3
WAR	SOYA	7

3.4.3. DESARROLLO Y VALIDACION DE LA TECNICA ELISA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINA DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS.

I.- DESARROLLO:

Se procedió a realizar:

A) TITULACION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO ELISA.

- 1.- Colocar 100 μ l de amortiguador carbonato-bicarbonato en todos los pozos excepto blancos.

- 2.- Añadir 25 μ l de aislado de soya.
- 3.- Hacer diluciones seriadas 1:5 a partir de la dilución 1:100 y desechar los últimos 25 μ l.
- 4.- Incubar de 16 a 18 horas a 4°C
- 5.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 6.- Bloquear con 100 μ l de albúmina sérica bovina libre de gamma globulinas al 0.2% en amortiguador carbonato-bicarbonato.
- 7.- Incubar a 37°C por un tiempo de 60 min.
- 8.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 9.- Agregar 100 μ l del anticuerpo anti-soya en dilución 1:100 y hacer 16 diluciones seriadas 1:5 desechando los últimos 25 μ l.
- 10.- Incubar a 37°C por un tiempo de 60 min.
- 11.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 12.- Agregar 100 μ l del anti-conejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra.
- 13.- Incubar a 37°C por un tiempo de 60 min.
- 14.- Lavar 4 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 15.- Agregar 100 μ l de solución sustrato y dejar reaccionar 15 min.
- 16.- Agregar 50 μ l de ácido sulfúrico 2.5M para detener la reacción.
- 17.- Leer en lector de microplacas a 490nm.

B) DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINA DE SOYA NECESARIA PARA LA SENSIBILIZACION DE PLACAS.

- 1.- Colocar 100 μ l de aislado de proteína de soya en concentraciones: 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 μ g/ml, en amortiguador

carbonato-bicarbonato.

- 2.- Incubar de 16 a 18 horas a 4°C.
- 3.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 4.- Bloquear con 100 µl de albúmina sérica bovina libre de gamma globulinas al 0.2% en amortiguador carbonato-bicarbonato.
- 5.- Incubar a 37°C por un tiempo de 60 min.
- 6.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 7.- Agregar 100 µl del anticuerpo anti-soya. (previamente titulado)
- 8.- Incubar a 37°C por un tiempo de 60 min.
- 9.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 10.- Agregar 100 µl del anti-conejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra. (previamente titulado)
- 11.- Incubar a 37°C por un tiempo de 60 min.
- 12.- Lavar 4 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 13.- Agregar 100 µl de solución sustrato y dejar reaccionar 15 min.
- 14.- Agregar 50 µl de ácido sulfúrico 2.5M para detener la reacción.
- 15.- Leer en microlector de placas a 490 nm.

C) OBTENCION DEL EXTRACTO DE PROTEINA.

- 1.- Homogeneizar la muestra.
- 2.- Pesar 20 g de muestra.
- 3.- Extraer 3 veces con 200 ml cada vez de cloroformo-metanol 2:1 v/v.
- 4.- Extraer 3 veces con 200 ml cada vez de etanol-agua 80+20 v/v acidificado con 2 gotas de HCl/1.

- 5.- Extraer 3 veces con 200 ml cada vez de acetona.
- 6.- Dejar secar de 16 a 17 horas.
- 7.- Moler y homogeneizar en mortero.
- 8.- Determinar proteínas por el método Kjeldhal.
- 9.- Pesar 100 mg de proteína (estándar y muestras).
- 10.- Agregar 2 ml de amortiguador tris-HCl + 6 g de urea + 2 ml de agua desionizada + 200 μ l de 2-mercaptoetanol + 6 ml de agua desionizada.
- 11.- Colocar en baño de agua a 94°C por un tiempo de 60 min.
- 12.- Enfriar de 3-5 min.
- 13.- Aforar con agua desionizada a 25 ml.
- 14.- Almacenar 18 horas a 2-8°C.

D) APLICACION DE LA TECNICA ELISA.

- 1.- Sensibilizar placas con 100 μ l de solución sensibilizante en la concentración previamente determinada.
- 2.- Incubar 16 a 18 horas a 4°C.
- 3.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 4.- Bloquear con 100 μ l de albúmina sérica bovina libre de gamma globulinas al 0.2% en amortiguador de carbonato-bicarbonato.
- 5.- Incubar a 37°C por un tiempo de 60 min.
- 6.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 7.- Colocar 50 μ l de muestra y estándar y hacer diluciones seriadas 1:2 (estándar 16 y muestras 8).
- 8.- Agregar 50 μ l del anticuerpo anti-soya (titulado previamente).

- 9.- Incubar a temperatura ambiente y con agitación por un tiempo de 60 min.
- 10.- Lavar 3 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 11.- Agregar 100 μ l del anti-conejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra.
- 12.- Incubar a 37' por un tiempo de 60 min.
- 13.- Lavar 4 veces con PBST por un tiempo de 3 min cada vez.
- 14.- Agregar 100 μ l de solución sustrato y dejar reaccionar 15 min.
- 15.- Agregar 50 μ l de ácido sulfurico 2.5M para detener la reacción.
- 16.- Leer en lector de microplacas a 490nm.

II.- VALIDACION:

Para realizar la validación de la técnica se tomaron en cuenta 4 variables que son:

- 1.- Especificidad
- 2.- Sensibilidad
- 3.- Precisión
- 4.- Exactitud

como a continuación se describe:

1.- ESPECIFICIDAD.

Se utilizaron los siguientes controles con una concentración de 4 mg/ml.

I.- CONTROLES POSITIVOS:

- a) Estándar de aislado de proteína de soya que fué tratado térmicamente bajo condiciones de desnaturalización. Posteriormente se

hizo una curva estándar con diluciones 1:2.

b) Proteína de soya en diferentes presentaciones comerciales: texturizada, harina y concentrado.

II.- CONTROLES NEGATIVOS

a) Proteínas vegetales: trigo

b) Proteínas de origen animal: caseína, grenetina.

c) Proteínas empleadas en el sistema de captura y revelado éstas son: la soya, el anticuerpo anti-soya y anti-conejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra.

Las proteínas vegetales diferentes a las de soya, animales y las empleadas en el sistema deben dar una reacción negativa en el ensayo, pero en caso de que alguna de las proteínas anteriormente especificadas de una reacción positiva (reacción cruzada), se le restará el valor de absorbancia que presente a todas las muestras, para obtener la concentración real de proteína de soya.

2.- SENSIBILIDAD

Se determinó de la siguiente forma:

Hacer dos curvas estándar de aislado de proteína de soya todos los días durante una semana el cual, fue tratado bajo condiciones de desnaturalización haciendo 16 diluciones seriadas 1:2 por triplicado a partir de una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. Al mismo tiempo realizar 3 veces el análisis de las muestras.

De los resultados obtenidos, se hizo un análisis de regresión lineal de la zona de mayor linealidad, tanto por métodos matemáticos como visuales. Se hizo un análisis intraensayo obteniendo el coeficiente de variación (C.V.) en cada uno de los puntos de la curva estándar el cual, debió ser menor al 10%.

Se realizó la determinación de los límites de saturación (cantidad máxima de proteína de soya que el sistema puede detectar) y sensibilidad (cantidad mínima de proteína de soya que el sistema puede detectar) del método, utilizando diferentes concentraciones conocidas de proteína de soya.

3.- PRECISION

Se utilizaron controles positivos y negativos, sometiéndose cada muestra 20 veces al análisis para obtener la variación interensayo.

Se elaboró primeramente una curva estándar con aislado de proteína de soya tratada bajo condiciones de desnaturalización, en la cual se extrapolaron los resultados obtenidos de las muestras analizadas y se les hizo el cálculo del coeficiente de variación.

- CONTROLES POSITIVOS: Muestras de jamón con una concentración conocida de proteína de soya, que fueron elaboradas en el departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

- CONTROLES NEGATIVOS: Muestras de jamón sin soya que fueron elaboradas en el departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán.

4.- EXACTITUD

Se obtuvo calculando el porcentaje de recuperación empleando los testigos internos a los cuales, se les adicionó una concentración de 5 μg del estándar de aislado de proteína de soya desnaturalizado, observando si realmente se detecta la cantidad de proteína de soya que podría contener la muestra o cuanto es lo que puede detectarse realmente.

Esta determinación se hizo por quintuplicado.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 RESULTADOS.

1.-OBTENCION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA.

Esto se realizó con la finalidad de obtener un anticuerpo anti-soya que sustituyera al de marca Sigma, por su costo elevado y por el tiempo de adquisición.

Para ir evaluando si existía producción de anticuerpos se tomó una sangría de prueba de la vena marginal de la oreja antes de cada inmunización y se procedió a esta determinación por el método DOT ELISA. Los resultados obtenidos se pueden observar en el Cuadro I, donde se aprecia que antes de que se inmunizaran a los conejos no había anticuerpos contra soya pero, a medida que se inmunizaba, aumentaba la producción de dichos anticuerpos. Esto se observó por el aumento en la intensidad de la coloración azul de los puntos sobre la membrana de nitrocelulosa.

2.- EVALUACION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA.

Obtenidos los anticuerpos anti-soya se procedió a su evaluación la cual consistió en:

A) TITULACION DE LOS ANTICUERPOS ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA.

Esto se hizo con la finalidad de determinar la dilución óptima con la que se trabajó esta técnica para detectar proteína de soya en productos cárnicos, de acuerdo a la metodología antes descrita.

El título se seleccionó por medio de la intensidad en la coloración presentada en los puntos la cual, debería ser la más tenue pero en la que aún se apreciaran todos los puntos de la curva estándar (Cuadro II).

En la titulación se pudo observar que la intensidad de la coloración de los puntos es directamente proporcional a la concentración de proteína y que los anticuerpos obtenidos por inmunización en los conejos TBC y pH son más potentes que los de la marca Sigma.

B) DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA.

Para esto se utilizaron diferentes presentaciones de proteína de soya: harina, texturizado, concentrado y aislado tanto desnaturalizada como no desnaturalizada; además de otras proteínas vegetales como: trigo, lenteja, maíz, arroz, frijol; proteínas animales: gnetina, caseína, así como sueros de especies animales: cerdo, caballo, vaca, pollo, burro, conejo, borrego, rata y cabra.

Los resultados de esta determinación se muestran en el Cuadro III, observándose que los anticuerpos anti-soya comparten sitios antigénicos con todas las presentaciones de proteína de soya, tanto

desnaturalizada como no desnaturalizada. También se detectaron las proteínas de garbanzo, lenteja y frijol y de la especie animal conejo. Con esta prueba el resultado obtenido fue que el anticuerpo anti-soya es específico para soya. Este comportamiento se presentó con los tres anticuerpos anti-soya evaluados.

Al mismo tiempo se analizó si no existía reacción cruzada entre las proteínas empleadas en el sistema de captura (anticuerpo anti-soya, anticonejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra y soya) siguiendo el esquema del Cuadro IV, donde se aprecia que no existen uniones inespecíficas entre los complejos anti-soya-conjugado, soya-conjugado y que el complejo soya-anti-soya no tiene actividad enzimática.

I.- DESARROLLO.

A) TITULACION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO ELISA.

Se hizo con la finalidad de determinar la dilución óptima con la cual se trabajó el método ELISA para la cuantificación de proteína de soya en productos cárnicos. Los resultados se obtuvieron graficando las lecturas de absorbancia contra dilución. Se tomó el punto medio de la parte perpendicular al eje de las ordenadas y se interpoló al eje de las abscisas (Gráficas I, II y III).

Fueron utilizados 10 veces concentrados para los ensayos de inhibición con los que se trabajó la técnica para cuantificar proteína de soya. Estos títulos obtenidos se muestran en el Cuadro V.

B) DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINA DE SOYA NECESARIA PARA LA SENSIBILIZACION DE PLACAS.

Se utilizaron diferentes concentraciones de proteína de soya para sensibilizar las placas, graficándose las lecturas de absorbancia obtenidas contra concentración eligiéndose la que fuera más perpendicular al eje de las ordenadas y con una concentración menor, obteniéndose así que la concentración óptima para la sensibilización es de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Gráfica IV). Este mismo comportamiento se observó con los tres anticuerpos anti-soya evaluados.

II.- VALIDACION.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1) ESPECIFICIDAD.

Para esta determinación se emplearon controles positivos y negativos.

- a) Controles positivos: Se emplearon las diferentes presentaciones de proteína de soya (harina, texturizado, concentrado y aislado) tratadas bajo las mismas condiciones de desnaturalización.

Se puede observar en la Gráfica V que los tres anticuerpos anti-soya reconocen de igual forma todas las presentaciones de proteína de soya.

b) Controles negativos: Para este fin se emplearon proteínas que en algunas ocasiones se utilizan para la elaboración de productos cárnicos como son: harina de trigo, caseína y grenetina. Estas proteínas se trataron bajo las mismas condiciones que los controles positivos.

En este caso puede considerarse que las proteínas evaluadas presentaron una reacción cruzada mínima (Gráfica V) lo cual, no interfiere en la cuantificación de proteína de soya.

Así mismo se verificó que no hubiera ninguna unión inespecífica entre las proteínas empleadas en el sistema de captura (anticuerpo anti-soya, soya y anti-conejo conjugado con peroxidasa inmunizado en cabra) siguiendo el esquema de el Cuadro IV. Se encontró que no existe ninguna unión inespecífica entre las proteínas empleadas en el sistema de captura, ya que las lecturas de absorbancias obtenidas se consideran despreciables (Gráfica V).

2) SENSIBILIDAD.

Los resultados para obtener esta variable por medio del análisis intraensayo de muestras y estándar pueden observarse en los Cuadros VI y VII respectivamente, obteniéndose así coeficientes de variación menores al 10% y que la técnica tiene una sensibilidad del 99.38%

También se determinó que la técnica no es sensible para concentraciones de proteína de soya mayores al 3%.

También se determinaron los límites de detección por medio de la curva estándar de aislado de proteína de soya (Gráfica VI), donde se

determinó que el índice de saturación del sistema es de 12.5 μg y el índice de sensibilidad es de 0.39 μg .

3) PRECISION.

Para esta determinación, fueron sometidas al análisis interensayo tanto los controles positivos (JPV, WAR y LKE) como los controles negativos (RPT y HOB) a cuyas concentraciones obtenidas se les hizo el cálculo de coeficiente de variación. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro VIII, teniéndose así una precisión del 98.84%.

4) EXACTITUD.

Los resultados de esta determinación pueden apreciarse en el Cuadro IX, obteniéndose una recuperación del 92.74% para la técnica. Se considera exacto más del 90%.

CUADRO I.- PRUEBA CUALITATIVA DE LA VERIFICACION DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA.

DIA	PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-SOYA
0	-
20	+
40	+
60	+
80	+

CUADRO II.- TITULOS DE LOS ANTICUERPOS ANTI-SOYA OBTENIDOS POR EL METODO DOT ELISA

ANTICUERPO	TITULO
Marca Sigma	1:500
Conejo TBC "	1:1000
Conejo pH	1:1000

CUADRO III.- DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA.

PROTEINA	REACCION DE ESPECIFICIDAD
Harina de soya (1,2)	+
Concentrado de soya (1,2)	+
Aislado de soya (1,2)	+
Soya texturizada (1,2)	+
Trigo	-
Lenteja	+
Garbanzo	+
Maiz	-
Arroz	-
Frijol	+
Grenetina	-
Caseina	-
Cerdo	-
Caballo	-
Vaca	-
Pollo	-
Burro	-
Perro	-
Conejo	+
Borrego	-
Rata	-
Cabra	-

(1) = Bajo tratamiento de desnaturalizacion

(2) = Sin tratamiento de desnaturalizacion

CUADRO IV.- DETERMINACION DE ESPECIFICIDAD DEL LAS PROTEINAS DEL SISTEMA DE CAPTURA.

ANTICUERPO	AISLADO DE SOYA	ANTI-SOYA	CONJUGADO	REACCION
Marca Sigma	o	*	*	-
	*	o	*	-
	*	*	o	-
	*	*	*	+
Conejo TBC	o	*	*	-
	*	o	*	-
	*	*	o	-
	*	*	*	+
Conejo pH	o	*	*	-
	*	o	*	-
	*	*	o	-
	*	*	*	+

o = Ausencia de reactivo
 * = Presencia de reactivo

CUADRO V.- TITULOS DE LOS ANTICUERPOS ANTI-SOYA OBTENIDOS POR LA TECNICA ELISA

ANTICUERPO	TITULOS OBTENIDOS PARA LA TECNICA ELISA	TITULOS EMPLEADOS PARA LA TECNICA ELISA POR INHIBICION
Marca Sigma	1:2500	1:250
Conejo TBC	1:25000	1:2500
Conejo pH	1:12500	1:1250

CUADRO VI. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE LA TECNICA ELISA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINA DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS, EMPLEANDO MUESTRAS

% DE PROTEINA DE SOYA					
DIA	JPV	RPT	HOB	WAR	LKE
1	2.40	0.021	0.045	2.55	2.97
	2.40	0.020	0.045	2.56	3.00
	2.39	0.020	0.044	2.53	2.99
C.V.	0.19%	2.31%	1.05%	0.48%	0.41%
2	2.41	0.020	0.045	2.53	2.98
	2.43	0.020	0.044	2.54	2.97
	2.40	0.020	0.044	2.56	2.95
C.V.	0.51%	0%	1.06%	0.49%	0.42%
3	2.42	0.020	0.045	2.52	2.95
	2.39	0.020	0.045	2.53	2.95
	2.40	0.020	0.045	2.55	2.97
C.V.	0.51%	0%	0%	0.19%	0.31%
4	2.36	0.020	0.046	2.54	2.93
	2.40	0.020	0.045	2.54	2.99
	2.38	0.021	0.046	2.55	2.95
C.V.	0.68%	2.31%	1.03%	0.18%	0.84%
5	2.38	0.021	0.045	2.52	2.96
	2.39	0.020	0.044	2.52	2.95
	2.41	0.021	0.044	2.54	2.99
C.V.	0.52%	2.28%	1.06%	0.37%	0.57%

C.V. = Coeficiente de variacion

CUADRO VII. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE LA TECNICA ELISA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINA DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS, EMPLEANDO ESTANDAR

C.	DIA							
	1			C.V.	2			C.V.
200	0.038	0.038	0.038	0	0.038	0.039	0.038	1.22
100	0.086	0.086	0.085	0.55	0.094	0.088	0.092	2.73
50	0.163	0.164	0.158	1.62	0.163	0.161	0.164	0.76
25	0.259	0.260	0.260	0.18	0.254	0.262	0.264	1.66
12.5	0.418	0.418	0.415	0.33	0.421	0.425	0.424	0.40
6.25	0.706	0.707	0.705	0.11	0.714	0.711	0.714	0.19
3.125	1.022	1.023	1.022	0.04	1.022	1.015	1.016	0.30
1.560	1.237	1.235	1.238	0.10	1.240	1.235	1.244	0.29
0.781	1.585	1.586	1.585	0.02	1.591	1.593	1.588	0.12
0.390	1.855	1.849	1.858	0.20	1.861	1.858	1.864	0.13
0.190	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.097	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.048	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.024	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.012	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.006	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0

C. = Concentración (μg)
 C.V. = Coeficiente de variación.

CONTINUA...

DIA								
C.	3			C.V.	4			C.V.
200	0.038	0.038	0.038	0	0.039	0.038	0.038	1.22
100	0.088	0.091	0.087	1.91	0.095	0.095	0.085	5.14
50	0.158	0.155	0.165	2.62	0.161	0.156	0.153	2.10
25	0.252	0.261	0.254	1.50	0.263	0.266	0.255	2.21
12.5	0.416	0.425	0.415	1.07	0.414	0.416	0.413	0.36
6.25	0.703	0.708	0.712	0.52	0.704	0.706	0.713	0.54
3.125	1.014	1.018	1.015	0.16	1.017	1.012	1.016	0.31
1.560	1.241	1.234	1.242	0.28	1.234	1.232	1.245	0.46
0.781	1.592	1.605	1.594	0.35	1.581	1.585	1.591	0.25
0.390	1.835	1.835	1.854	0.48	1.851	1.865	1.872	0.46
0.190	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.097	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.048	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.024	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.012	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0
0.006	1.935	1.935	1.935	0	1.935	1.935	1.935	0

C. = Concentración (μg)
C.V. = Coeficiente de variación.

CONTINUA...

DIA				
C.	5			C.V.
200	0.039	0.039	0.038	1.21
100	0.089	0.083	0.081	4.03
50	0.155	0.157	0.174	5.26
25	0.253	0.267	0.256	2.32
12.5	0.429	0.425	0.416	1.28
6.25	0.722	0.702	0.703	1.35
3.125	1.023	1.029	1.016	0.51
1.560	1.246	1.252	1.236	0.53
1.781	1.606	1.576	1.579	0.85
0.390	1.875	1.855	1.837	0.83
0.190	1.935	1.935	1.935	0
0.097	1.935	1.935	1.935	0
0.048	1.935	1.935	1.935	0
0.024	1.935	1.935	1.935	0
0.012	1.935	1.935	1.935	0
0.006	1.935	1.935	1.935	0

C. = Concentración (μg)
C.V. = Coeficiente de variación.

CUADRO VIII. DETERMINACION DE LA PRECISION DE LA TECNICA ELISA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINA DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS.

% DE PROTEINA DE SOYA					
	JPV	RPT	HOB	WAR	LKE
1	2.39	0.020	0.044	2.52	2.96
2	2.39	0.020	0.045	2.54	2.97
3	2.40	0.020	0.045	2.55	2.96
4	2.41	0.021	0.045	2.56	2.98
5	2.40	0.020	0.044	2.56	2.98
6	2.43	0.020	0.045	2.56	3.00
7	2.43	0.020	0.045	2.57	3.03
8	2.43	0.021	0.045	2.56	3.00
9	2.41	0.020	0.043	2.56	3.00
10	2.41	0.020	0.044	2.56	2.97
11	2.41	0.020	0.044	2.58	3.03
12	2.38	0.021	0.044	2.55	2.98
13	2.39	0.020	0.048	2.55	2.96
14	2.39	0.020	0.045	2.54	2.97
15	2.39	0.020	0.045	2.54	2.97
16	2.38	0.020	0.045	2.53	2.96
17	2.39	0.020	0.044	2.53	2.98
18	2.40	0.020	0.044	2.54	2.99
19	2.39	0.020	0.045	2.55	2.97
20	2.40	0.020	0.045	2.54	2.97
C.V.	0.63%	1.77%	2.13%	0.56%	0.68%

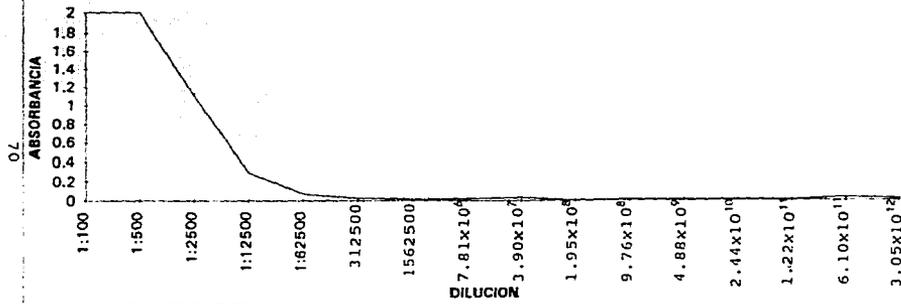
C.V. = Coeficiente de variacion

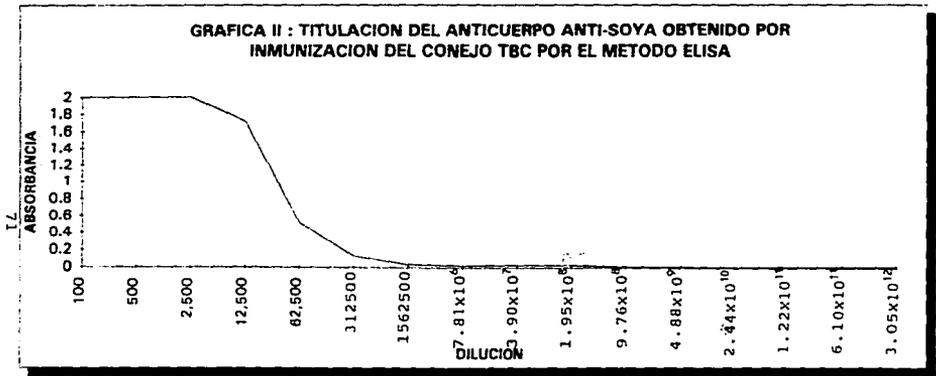
CUADRO IX. DETERMINACION DE LA EXACTITUD DE LA TECNICA ELISA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINA DE SOYA EN PRODUCTOS CARNICOS.

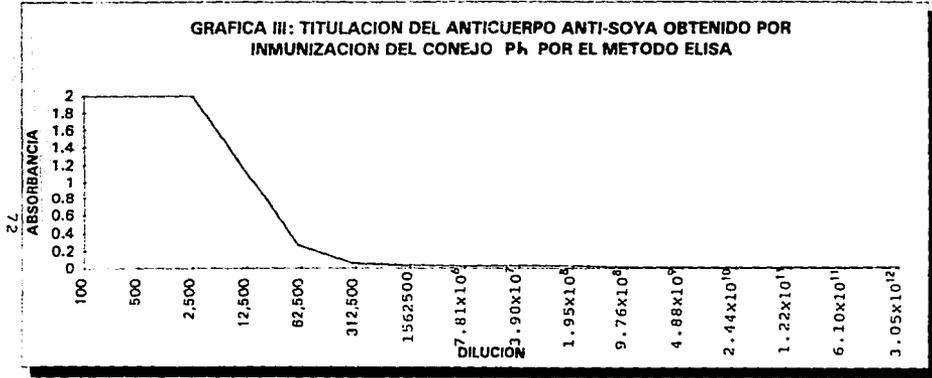
μg DE SOYA EN LA MUESTRA	μg DE SOYA ADICIONADOS	μg DE SOYA TEORICOS	μg DE SOYA DETECTADOS	% DE RECUPERACION
3.90	5	8.90	8.54	92.9
3.84	5	8.84	8.48	92.8
3.90	5	8.90	8.52	92.8
3.92	5	8.92	8.56	92.8
3.80	5	8.80	8.44	92.7
				$\bar{x} = 92.74$

\bar{x} = Media

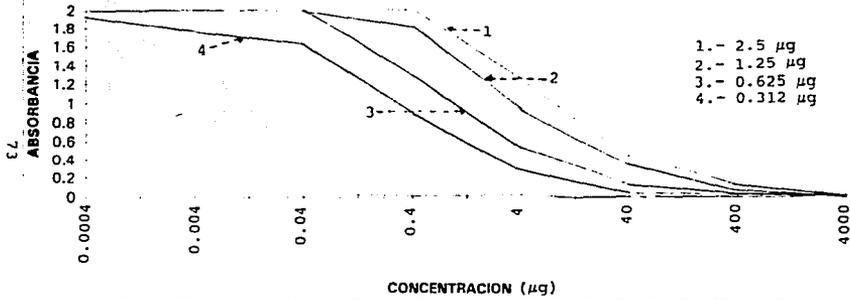
GRAFICA I : TITULACION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA MARCA SIGMA
POR EL METODO ELISA





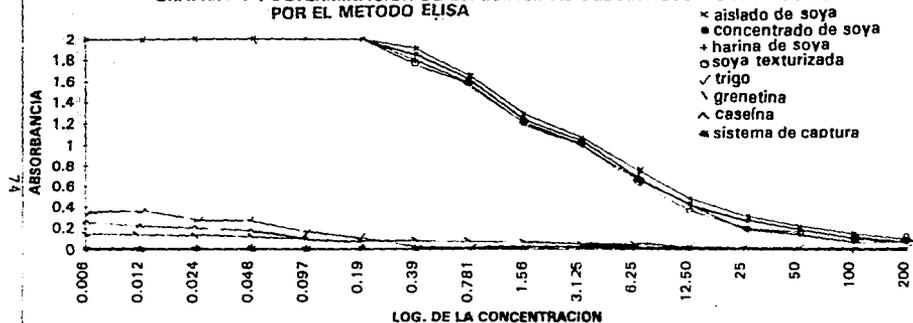


GRAFICA IV: DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINA DE BOYA
NECESARIA PARA LA SENSIBILIZACION DE PLACAS

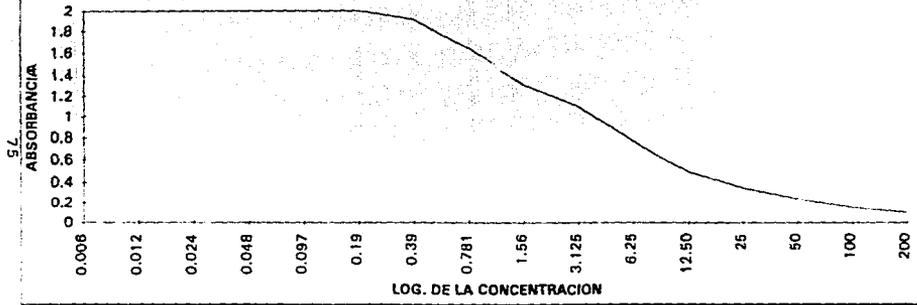


FALLA DE ORIGEN

**GRAFICA V : DETERMINACION DE ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA
POR EL METODO ELISA**



GRAFICA VI : CURVA STANDARD DE AISLADO DE PROTEINA DE SOYA.



4.2. DISCUSION

1.- OBTENCION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA.

Para poder obtener el anticuerpo anti-soya por inmunización en los conejos TBC y pH fue necesario someter el extracto de aislado de soya a una diálisis, con la finalidad de eliminar la urea y el 2-mercaptoetanol y evitar así que se pudiese presentar una intoxicación en los conejos y morir o que se produjeran anticuerpos que no fueran contra soya los que no servirían para este estudio.

Al determinarse que no existía producción de anticuerpos contra soya, se pudo continuar con el esquema de inmunización para la obtención de los anticuerpos por no haber ninguna unión inespecífica.

Se observó que conforme se inmunizaban con respecto al tiempo aumentaba la producción de anticuerpos, por el aumento en la intensidad de la coloración azul de los puntos.

2.- EVALUACION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA.

A) TITULACION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA.

Esta titulación se hizo con la finalidad de conocer la dilución óptima para trabajar la técnica de detección de proteína de soya, con el objeto de utilizar la cantidad mínima de este anticuerpo disminuyendo así los costos y a la vez obtener resultados confiables.

Se pone de manifiesto que los anticuerpos anti-soya obtenidos en el Instituto por inmunización en los conejos TBC y pH son más

potentes que los de la marca Signa lo cual, nos da un mayor rendimiento por utilizar una cantidad menor del anticuerpo y una seguridad de disponibilidad del mismo.

Estos títulos son bajos comparandolos con los utilizados en la técnica ELISA pero, esto es debido a que la prueba DOT ELISA no tiene tanta sensibilidad como la técnica ELISA.

B) DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO DOT ELISA

Los anticuerpos anti-soya evaluados detectan todas las presentaciones de proteína de soya tanto desnaturalizada como no desnaturalizada, debido a que comparten epitopes semejantes. Presentan reacción cruzada con las proteínas de frijol, garbanzo y lenteja puesto que pertenecen a la misma familia de la soya: las leguminosas por lo que, tienen ciertas características filogenéticas similares, teniendo así sitios antígenicos compatibles con el anticuerpo anti-soya.

La reacción cruzada existente con la especie animal conejo, se pudo deber a que el conjugado empleado es un anticuerpo hecho contra inmunoglobulinas de conejo pero, esto no interfiere en la cuantificación de proteína de soya pues el producto cárnico denominado jamón es elaborado con carne de cerdo, de acuerdo con la Norma Oficial.

Respecto a las proteínas empleadas en el sistema de captura no se observó reacción cruzada entre ellas puesto que no hubo aparición

FALLA DE ORIGEN

de puntos sobre la membrana de nitrocelulosa pues de haberlos, nos indicaría una reacción positiva.

I.- DESARROLLO.

A) TITULACION DEL ANTICUERPO ANTI-SOYA POR EL METODO ELISA

Como en la tecnica DOT ELISA, los anticuerpos anti-soya obtenidos por inmunización de los conejos TBC y PH por este método, son mucho más potentes ya que los titulos fueron más altos con respecto al anticuerpo anti-soya de la marca Sigma. En este caso, esto pudo ser debido a la alta sensibilidad de la tecnica ELISA.

Los anticuerpos anti-soya se utilizaron 10 veces concentrados de los titulos obtenidos para los ensayos de ELISA por inhibición, ya que en esta tecnica la parte fundamental es hacer reaccionar el antigeno con un exceso de anticuerpos y al utilizarlo en esa concentracion, se asegura ese exceso de anticuerpos.

Con estos titulos tan elevados hay un mayor rendimiento del anticuerpo anti-soya, así como de una seguridad de disponibilidad del mismo.

B) DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINA DE SOYA NECESARIA PARA LA SENSIBILIZACION DE PLACAS.

En este caso se pudieron utilizar cualquiera de las siguientes concentraciones para sensibilizar las placas: 1.25 ó 0.625 μ /ml, por ser las más rectas y perpendiculares al eje de las ordenadas pero,

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

tratando de utilizar la menor cantidad de antígeno y por facilidad de manejo de cantidades tan pequeñas se decidió utilizar la de 1 $\mu\text{g/ml}$ para la sensibilización.

II.- VALIDACION

1) ESPECIFICIDAD

Los anticuerpos anti-soya evaluados (Sigma, pH y TBC) detectan cualquier presentación de proteína de soya ya que, comparten sitios antigénicos iguales. Con esto se obtiene un gran avance pues, el no poder detectar todas las presentaciones con una misma técnica era una gran limitante para la identificación de proteína de soya.

Se considero que las proteínas utilizadas para la determinación de la especificidad (harina de trigo, caseína y germen) no interfieren en la cuantificación de proteína de soya aun cuando existieran en una muestra, puesto que sus valores de absorbancia se encontraron por debajo de la zona de linealidad de la curva estándar (Gráfica V) sobre la cual, se hacen los cálculos de cuantificación.

Así mismo los valores de absorbancia presentados por las proteínas empleadas en el sistema de captura se consideraron despreciables por ser sumamente bajas ya que, se encontraban por debajo del punto de corte (absorbancia = 0.063) y por lo tanto, tampoco interfieren estos valores en la cuantificación de proteína de soya.

2) SENSIBILIDAD

Durante el análisis intraensayo, observamos que los coeficientes de variación obtenidos en las muestras y en las curvas estándar en su porción más lineal, fueron muy bajos, teniéndose en consideración que el valor máximo permitido era de un 10%.

Por lo tanto, esto nos dió como resultado una sensibilidad del método muy alta (99.38%) y el error del 0.62% pudo ser debido principalmente por fallas del analista durante el pipeteo.

También se determinó con los porcentajes de proteína de soya obtenidos de las muestras, que la técnica no detecta contenidos mayores del 3%, puesto que las muestras WAR y LKE se les adicionó proteína de soya en un 7 y 14% respectivamente y no con 2.56 y 2.98% que fueron los encontrados durante el análisis. De igual forma la muestra JPV a la que se le adicionó un 3% de proteína de soya solo se le cuantificó un 2.43%

Estos errores pudieron deberse a la pérdida de proteína de soya así como de sus sitios antigénicos durante los procesos de desgrasado y desnaturalización de las muestras, por ser muy enérgicos o incluso durante su misma elaboración pudo haber pérdidas. Pero puede considerarse también que la técnica no puede detectar un porcentaje mayor.

Pero pese a esto, para la finalidad con que fue desarrollada la técnica, se considera que si puede ser utilizada pues, el porcentaje máximo permitido de adición es de 2%.

Los índices de saturación y sensibilidad se determinaron por medio de la curva estándar, ya que sólo se trabajó con la porción más lineal de ella, y estos valores son los límites bajo los cuales se hicieron las cuantificaciones de proteína de soya.

3) PRECISION.

Se obtuvieron coeficientes de variación muy bajos tomando como referencia el 10% máximo permitido para esta determinación por lo tanto, se obtuvo una precisión muy alta (98.84%), presentando así un error del 1.16% de las muestras analizadas durante varios días.

Esto pudo deberse a la variabilidad que se tiene al aplicar la técnica en las condiciones estandarizadas en diferentes días.

4) EXACTITUD

El haber obtenido un 92.74% de recuperación se considera aceptable ya que, en general, las técnicas analíticas con un porcentaje por arriba del 90% son buenas.

El que no se halla obtenido una recuperación del 100% se debió posiblemente a que el proceso de desnaturalización de la muestra es muy enérgico por lo que, se pierden sitios antigénicos en la proteína de soya.

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos fue posible llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- Se obtuvieron anticuerpos específicos contra soya, pudiéndose detectar soya en cualquiera de sus diferentes presentaciones. De esta manera se podrá utilizar esta técnica en una gran variedad de productos, logrando así un gran avance, pues antes se tenía la limitante de requerir diferentes técnicas según la presentación.
- 2.- Los anticuerpos anti-soya obtenidos por inmunización en los conejos TBC y pH tuvieron una mayor potencia que el comercial Sigma, pudiendo resolverse así, el problema del alto costo y el tiempo de adquisición de este anticuerpo.
- 3.- Se establecieron las condiciones adecuadas para realizar una prueba cualitativa de proteína de soya a la cual, se pueden someter las muestras a analizar y en caso de resultar positivas, someterlas a la prueba cuantitativa, ahorrando así tiempo y dinero.
- 4.- Se establecieron las condiciones adecuadas para desarrollar la técnica ELISA para la cuantificación de proteína de soya.

- 5.- La técnica inmunoenzimática ELISA para la cuantificación de proteína de soya puede considerarse altamente específica, sensible, precisa y exacta ya que durante su validación mostró este comportamiento en los datos obtenidos. Observándose que conforme pasaba el tiempo no había variaciones importantes en los resultados.
- 6.- La técnica no detecta cantidades mayores al 3% de proteína de soya. Sin embargo, puede ser utilizada para el análisis de muestras puesto, que el Acuerdo de Concertación donde se muestra la Pirámide de Calidades del producto cárnico denominado jamón, se indica que solo puede ser adicionada esta proteína en un máximo de 2%. Posiblemente esto pueda solucionarse:
- A) Modificando las técnicas de desgrasado y desnaturalización de las muestras.
- B) Elaborando testigos con intervalos de concentraciones de proteína de soya pequeños, para determinar exactamente cual es el mayor porcentaje de detección.
- 7.- Aunque esta técnica se desarrolló específicamente para el producto cárnico denominado jamón, por el interés existente en nuestro país respecto a la legislación sobre la adición de proteína de soya en este producto, no se descarta la posibilidad de utilizarla en otros productos cárnicos.

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A.

- 1.- Asociación Americana de la Soya. Cocinando con soya. Asociación Americana de soya. 1990.
- 2.- Association of Official Analytical Chemists. Soy Protein in Raw and Heat-processed Meat Products. Official Methods of Analysis. 15a. Edición. p.242-245. USA. 1990
- 3.- Badui, D.S. Química de los Alimentos. Alhambra Mexicana. p.319-330, 403-412,414-415. México. 1988.
- 4.- Bressani, R. The Role of Soybeans in Food Systems. J. Am. Oil Chemists' Soc. 58:392-400. 1981.
- 5.- Bourges, H. Introducción a la Proteína de Soya en la Alimentación Humana. Cuadernos de Nutrición. 3, 4. 1978.
- 6.- Burket, R.E. Introducción a la Proteína de Soja Comestible. Alimentaria. 78:29. 1977.
- 7.- Dehesa, S. Manual sobre uso de la Soya en Panificación. Asociación Americana de Soya. 1989.
- 8.- Desrosier, W. N. Conservación de Alimentos. CECSA. p.33-337. México. 1989.
- 9.- Desrosier, W. N. Elementos de Tecnología de Alimentos. CECSA. p.319-320, 346-356. México. 1989.
- 10.- Eldridge, C. A. Determination of Soya Protein in Processed Foods. J. Am. Oil Chemists' Soc. 58:483-485. 1981.
- 11.- Furia E. T. Handbook of Food Additives. CRC Press. 2a. Edición. p.70-327. USA. 1972.

- 12.- Gómez, R.F.E. Ensayos Inmunoenzimáticos. Vol. No. 2. División de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos INHSZ. México. 1985.
- 13.- Guy, E.C.R., Jayaram, R., Willcox, J.C. Analysis of Commercial Soya Additives in Meat Products. J. Sci. Ed. Agric. 24 (72):1551-1563. 1973.
- 14.- Kinsella, E.J. Functional Properties of Soy Proteins. J. Am. Oil Chemists' Soc. 56:242-257. 1979.
- 15.- Kramlich, W.E., Pearson, A.M., Towber, F.W. Processed Meats. The AVI Publishing Company. p.6-12. USA. 1973.
- 16.- Lehninger, L.A. Bioquímica. Editorial Omega. 2a. Edición. p.297 España. 1985.
- 17.- Leiner, I. Nutritional Aspects of Soy Protein Products. J. Am. Oil Chemists' Soc. 54:454-A-469-A. 1987.
- 18.- Maggio, T.E. Enzyme-Immunoassay. CRC Press. p.40-135. USA. 1981.
- 19.- Mandigo, W.T.R., Sander, C.R. Reglamentación Norteamericana para el uso de Proteína de Soya en Productos Derivados de la Carne. Directorio de la Industria Cárnica.
- 20.- Mandigo, W.T.R., Sander, C.R. Usos, Restricciones y Detecciones de las Proteínas de la Soya en Productos de la Carne. Directorio de la Industria Cárnica.
- 21.- Mendoza, M.E., Colon, H.M.C, Covarrubias, E.C. y Hernández, R.L. La Calidad Microbiológica del Jamón Cocido que se Comercializa en el Area Metropolitana de la Ciudad de México. La Industria Cárnica Latinoamericana. 93:33-40. 1993.

- 22.- Mendoza, M. E. Manual de Técnicas para el Análisis y la Elaboración de Productos Cárnicos. Publicación L-75 de la División de Nutrición INNSZ. México. 1990.
- 23.- Nowacki, A.J. Retorted Meat and Vegetable Protein Combinations. J. Am. Chemists' Soc. 56:328-329. 1979.
- 24.- Olsman, J.W. Methods for Detection and Determination of Vegetable Protein in Meat Products. J. Am. Oil Chemists' Soc. 56:285-287. 1979.
- 25.- Paltrinieri, G., Meyer, M.R. Elaboración de Productos Cárnicos. Vol. 29 Trillas. p.3-12. México. 1988.
- 26.- Peralta M. L. A. Determinación del Contenido de Conservadores (benzoato de sodio y sorbato de potasio) en Productos Cárnicos de Diferentes Marcas que se Expenden en Mercados del D.F. y Area Metropolitana. Tesis U. Motolinia, A.C. México. 1990.
- 27.- Potter, N.N. La Ciencia de los Alimentos. EDUTEX. p.675-679, 686-689. México. 1978.
- 28.- Rittenburg, H. J. Development and Application of Immunoassay for Food Analysis. Elsevier Applied Science. p.80-127. USA. 1990.
- 29.- Rojas, M.W. Inmunología. CIB. 7a. Edición. p.13-14, 164-165. Colombia. 1988.
- 30.- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Norma Oficial Mexicana para Jamón Cocido NOM-F-123-S-1983. México. 1983.
- 31.- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Análisis de la Norma de Jamones. México. 1990.

- 32.- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Pirámide de Calidades para la Comercialización de Jamones. México. 1990.
- 33.- Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. Tomo CDXII No.11. 18 de enero de 1988. Mexico.
- 34.- Secretaría de Salud. Control Fisico-Químico de Productos Cárnicos. México.
- 35.- Stites, P. D., Stobo, D. J, Vivian, W. J. Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno. 6a. Edición. p.97 México. 1988.
- 36.- Taylor, R.J. Food Additives. British Library. p.13-61. USA. 1986.
- 37.- Waggle, H.D., Decker, D.C. Soya Products in Meat Poultry and Seafood. J. Am. Oil Chemists' Soc. 58:341-342. 1981.
- 38.- Weining, H., Gutmatcher, E. Tecnología Práctica de la Carne. p.11-16. Acribia. España. 1983.