

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DERIVADOS DE SOJA EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Comparison of analytical techniques for qualitative detection of soybean derivatives in meat products

Natalia Vázquez, Gonzalo Rodríguez Girault, Matías Agnese, Enrique Flores, Marcelo Bello.

Departamento de Evaluación y Desarrollo, Coordinación de Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal, Dirección de Laboratorio Animal, Dirección de Laboratorios y Control Técnico, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Buenos Aires, Argentina.

Contacto: nvazquez@senasa.gob.ar

Recibido: 1 de octubre de 2020. Aprobado: 18 de noviembre de 2020.

RESUMEN

El adecuado rotulado de los alimentos es muy importante ya que la falta de información puede ser perjudicial para el consumidor. En nuestro país, el SENASA es responsable de la fiscalización de los establecimientos que elaboran alimentos cárneos y, estos productos, a su vez, se encuentran normados en el Capítulo VI del Código Alimentario Argentino. Dicha normativa permite la adición de derivados de soja en chacinados como ligantes y/o extensores, mientras que en las salazones está prohibido su uso. En este marco, el objetivo de este trabajo fue comparar las técnicas de microscopía, enzimoimmunoanálisis y la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (ELISA y Real time-PCR, por sus siglas en inglés respectivamente) para la detección de soja en productos cárnicos. Para ello se analizaron 4 matrices de chacinados y salazones fortificados con derivados de soja al 1% y 20 muestras comerciales. En todas las muestras fortificadas se detectó la presencia de soja por las tres metodologías y la totalidad de las muestras comerciales se encontró conforme con la legislación. Si bien, las tres técnicas son aptas para el objetivo planteado, se puede concluir que la microscopía tiene la ventaja de ser de bajo costo, aunque es limitada la cantidad de muestras que se pueden observar simultáneamente y depende de la pericia del analista. La técnica ELISA tiene la desventaja del costo de los kits comerciales y que se deben reunir cierta cantidad de muestras para optimizar su uso. Y, finalmente, el método basado en la detección de ADN permite analizar gran cantidad de muestras en forma simultánea en poco tiempo, y con alta sensibilidad y especificidad; considerando esto sumado a la estabilidad de la molécula de ADN frente a los tratamientos térmicos utilizados en la elaboración de los alimentos, la técnica de PCR se presenta como una herramienta alternativa y confiable para el control de los mismos. En adición, un desarrollo más específico del método cualitativo de PCR permitirá, a futuro, cuantificar el contenido de soja en diversas matrices alimentarias.

Palabras clave: Soja, microscopía, ELISA, real time PCR.

ABSTRACT

Proper food labeling is very important since lack of information can be detrimental to the consumer. In our country, SENASA is the organization responsible for the inspection of establishments that manufacture meat products, and these products, in turn, are regulated by Chapter VI of the Argentine Food Code. This regulation allows the addition of soybean derivatives in sausages as binders and/or extenders, but, the use in cured meats is prohibited. The aim in this framework was to compare the techniques of microscopy, enzyme immunoassay and real-time polymerase chain reaction (ELISA and Real-Time PCR, respectively) for the detection of soybean in meat products. For this purpose, 4 matrices of sausages and cured meats fortified with 1% soybean derivatives and 20 commercial samples were analyzed. In all fortified samples, the presence of soybean was detected by the three methodologies, and all commercial samples were in compliance with the legislation. Although the three techniques are suitable for the proposed objective, it can be concluded that microscopy has the advantage of being low cost, however, the number of samples that can be observed simultaneously is limited and depends on the expertise of the analyst. One disadvantage of the ELISA technique is the cost of commercial kits, also, that a certain amount of samples must be gathered to optimize its use. Finally, the method based on DNA detection allows to analyze a large number of samples simultaneously in a short time with high sensitivity and specificity; considering this, as well as the stability of the DNA molecule against heat treatments used in food processing, the PCR technique is presented as a reliable alternative tool. In addition, a more specific development of the Qualitative PCR method will allow, in the future, to quantify the content of soybean in different food matrices.

Keywords: Soybean, microscopy, ELISA, real-time PCR.

INTRODUCCIÓN

El rotulado de alimentos tiene por objeto suministrar al consumidor información sobre características particulares de los mismos, tales como su forma de preparación, manipulación, conservación, composición y propiedades nutricionales. En este sentido, es importante que la información sea acorde al producto que se comercializa y se ajuste a la legislación vigente, de otra manera, la falta de cumplimiento de estos requisitos puede derivar tanto en un engaño al consumidor, como en un riesgo para su salud.

Algunos ejemplos pueden ser el agregado de sustancias para enmascarar ingredientes de menor calidad, la sustitución de un ingrediente o un alimento por otro sin hacer mención en la etiqueta, o las declaraciones falsas en el origen o procedencia de las materias primas.

La proteína de soja es muy utilizada en la industria cárnica debido a sus propiedades físico-químicas, composición y bajo costo^[2]. La misma es de fácil producción por tratarse de un derivado secundario de la obtención de aceite a partir de soja. Su extracción y el grado de purificación alcanzado a partir del poroto de soja, permite obtener diversos ingredientes como: harina de soja, concentrado de soja y aislado proteínico de soja, cuyos contenidos proteicos son de aproximadamente 50, 70 y 90 %, respectivamente. La calidad de cada uno de estos productos se encuentra normada por el Capítulo XIX del Código Alimentario Argentino^[3]. Por otra parte, en el capítulo VI se encuentra reglamentada la utilización de derivados de soja en determinados alimentos cárnicos. En estos últimos, dichos ingredientes son utilizados para cumplir una función tecnológica específica, como ser ligantes en la formación de la emulsión agua-grasa realizando además un aporte nutricional, de ahí su doble función de aditivo e ingrediente. De todas maneras, y para no terminar provocando una sustitución de las proteínas de origen animal características de estos alimentos, su contenido en el producto final se encuentra estrictamente regulado.

Para clasificar su uso se pueden definir entonces, dos grandes grupos de alimentos cárnicos: las salazones y los chacinados. En la elaboración de salazones no se permite el agregado de derivados de la soja en su composición. En el caso de los chacinados, se permite el agregado de concentrado y/o aislado de soja hasta un máximo de 2% en peso referido al producto terminado. Para éstos, se permite además el agregado de cualquier derivado de soja hasta un máximo de 10% en base seca en el producto terminado, si este contenido se declara en su denominación. Una de las funciones del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria es controlar el cumplimiento de dicha reglamentación.

En la actualidad existen diversos métodos para determinar la presencia de soja y sus derivados en distintos componentes alimenticios^[8,9,11]. Entre los más utilizados se encuentran los kits de enzimo-inmunoanálisis (ELISA, por sus siglas en inglés) comerciales que permiten determinar la presencia de proteína de soja en diversas matrices alimentarias. Su alto costo y la

necesidad de contar con un gran número de muestras para optimizar su rendimiento, llevan a la búsqueda de alternativas que permitan obtener resultados igualmente satisfactorios. Ante tal desafío, el objetivo de este trabajo se basó en el estudio y comparación de distintas técnicas analíticas para la detección de soja en productos cárnicos de manera de otorgar diversas alternativas que permitan dar cumplimiento a los requisitos de la legislación vigente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra: Se analizaron, en una primera instancia, 4 matrices distintas de chacinados y salazones (M1 a M4) fortificados al 1% con harina de soja desgrasada (H) y aislado proteico de soja (A) de manera de cubrir un amplio espectro de productos cárnicos e ingredientes utilizados habitualmente en la industria frigorífica. Las matrices utilizadas fueron:

- Jamón cocido (M1)
- Jamón crudo (M2)
- Salchicha fresca (M3)
- Hamburguesa (M4)

Las muestras fueron homogeneizadas en picadora antes y después de las fortificaciones correspondientes. Una vez finalizada esta etapa, se procedió a su análisis por los distintos métodos analíticos que se detallan a continuación.

Muestras comerciales: Se analizaron 20 muestras comerciales que incluyeron salazones cocidas y chacinados embutidos y no embutidos, frescos, secos y cocidos.

Métodos Analíticos

Microscopía

El método utilizado está basado en AOAC 913.01 (AOAC, 2012)^[1]. Sobre 2,5 gramos de cada muestra se realizó una digestión básica con solución alcohólica de hidróxido de potasio al 8% en estufa a 100°C durante una hora. Posteriormente, se agregó alcohol 96%, se agitó y se descartó el sobrenadante. Al *pellet* obtenido se adicionaron 25 ml de agua caliente. Se dejó reposar hasta que se asentara la espuma y luego se centrifugó (HERMIE Z400K) 15 minutos a 3500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregó 5 ml ácido clorhídrico y 7.5 ml de etanol al 25%. Se centrifugó 15 minutos a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante y se homogeneizó el residuo. Se montó el homogeneizado con micropipeta sobre un portaobjeto, se colocó un cubreobjeto y se procedió a la observación microscópica con un microscopio óptico binocular (Nikon Eclipse 50i) provisto de luz polarizada (Nikon C-SP 757196).

ELISA

Se utilizó un kit comercial 3M™ Kit ELISA Soy Protein (E96SOY 70-2011-7571-1-7100151351)^[7]. A 0.5 gramos de muestra se le agregaron 4.5 ml de *buffer* de extracción suministrado por el kit precalentado (UNITRONIC 100, P-SELECTA) a 50°C. Los tubos fueron incubados en un baño termostatzado a 50°C durante 25 minutos y cada 5 minutos fueron agitados manualmente durante

1 minuto. Luego de la incubación se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 segundos. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se mezclaron con 900 µl de la solución diluyente del kit, con agitación durante 20 segundos en vortex. De esta solución se tomaron 100 µl y se procedió a la realización del ensayo según el manual^[7]. Una vez finalizado, se midieron las absorbancias de los estándares que provee el kit y de las muestras a 450 nm en un lector de microplacas (Biotek ELX-808). El rango analítico del método está comprendido entre 20 y 600 mg/kg, aproximadamente.

PCR

Extracción de ADN: existen numerosas publicaciones con diversos métodos de extracción de ADN para los productos de soja y sus derivados^[5]. En este caso se realizó utilizando un método desarrollado en nuestro laboratorio que permite el análisis de identificación de especies en productos cárnicos^[13]. Las muestras se procesaron según lo descrito en Tartaglia y col (1997)^[12]: a 1 gramo de muestra se le agregaron 4 ml de *buffer* de extracción de tiocianato de guanidina y 10 µl de solución de proteinasa K (20 mg/ml). Se homogeneizó en vortex por 10 segundos y se incubó en baño termostático a 60°C durante 90 minutos. Una vez finalizada la incubación, los tubos se conservaron en heladera por 15 minutos. Terminada esta etapa, se centrifugaron a 6°C y 3500 rpm durante 15 minutos. Se trasvasaron 900 µl del sobrenadante a un tubo tipo eppendorf de 2 ml y se centrifugaron a 13000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. A 500 µl de sobrenadante se le agregaron 500 µl de *buffer* de extracción, 40 µl de una suspensión de sílica en agua, y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación constante. Se centrifugó (SIGMA I-14) a 13000 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Al *pellet* residual se lo lavó tres veces por resuspensión y posterior centrifugación con 1 ml de *buffer* de lavado, dos veces con 1 ml de etanol 70% y una vez más con 1 ml de acetona.

El *pellet* se dejó secar en estufa a 20°C durante 60 minutos aproximadamente, se le agregó 50 µl de solución *Buffer* Tris-EDTA (pH=7.5) y, previa agitación, se incubó por 10 minutos a 56°C en baño termostático. Una vez finalizado se centrifugó a 13000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo, y se centrifugó a 13000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. Este paso se repitió dos veces más a fin de eliminar los posibles restos de sílica que pudieran quedar en el sobrenadante y que interfieren en la reacción de amplificación del ADN. El sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su corrida.

Primer y sondas de hidrólisis: Se utilizaron las secuencias definidas por Popping y col (2010)^[10]:

- *Primer Lectin Forward:* 5'TCC ACC CCC ATC CAC ATT T 3'
- *Primer Lectin Reverse:* 5'GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA3'
- Sonda de hidrólisis *Lectin Probe:* 5'(6-FAM) AAC CGG TAG CT TGC CAG CTT CG 3'con marcación FAM – TAMRA.

Condiciones de corrida: El análisis se realizó en un termociclador (ROCHE LightCycler 2.0), utilizándose capilares de 20 µl para las distintas corridas. En los capilares se agregaron 10 µl de master mix (QuantiTec Probe PCR Kit, Qiagen)^[6], 0.9 µl de *primer Lectin Forward* (10uM), 0.9 µl *primer Lectin Reverse* (10 µM), 0.4 µl de sonda *Lectin Probe* (5 µM), 0.4 µl de solución MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl de Albúmina de Suero Bovino (BSA), 0.5 µl de Uracil DNA Glicosilasa (UNG), 2.4 µl de agua provista por el kit y 4 µl del volumen del extracto de cada muestra a analizar y de los controles positivos (harina de soja desgrasada y aislado proteico de soja) y negativo (blanco de reactivos).

Las condiciones de amplificación fueron:

- 1 ciclo de activación para la UNG de 50°C durante 2 minutos
- 1 ciclo de activación para la ADN polimerasa a 95°C por 15 minutos
- 35 ciclos de desnaturalización del ADN doble a 95°C por 15 segundos
- Hibridación de los *primers* y elongación a 60°C durante 1 minuto
- 1 ciclo enfriamiento a 40°C durante 30 segundos.

RESULTADOS

Microscopía

La metodología permitió identificar en todas las muestras fortificadas al 1% con harina de soja desgrasada y aislado proteico de soja, la presencia de estructuras celulares con forma de reloj de arena características de la soja (Ferrado y Henry, 1967)^[4] (**Figura 1**). Ninguna de estas estructuras se observó en los controles sin fortificar. Según puede verse, las muestras fortificadas con harina, presentaron un mayor número de estructuras celulares de soja en relación con las muestras fortificadas con aislado, mostrando incluso el formato de lo que se conoce como tortas de soja dispuestas, en este caso, de manera lateral. La composición y proceso de elaboración de ambos derivados de la soja podrían ser la causa de tales diferencias. Así, la harina de soja presenta muchos más restos vegetales ya que deriva directamente de la molienda y desgrasado del grano, mientras que el aislado proteico de soja tiene muchos más pasos de elaboración para lograr alcanzar el porcentaje de proteína cercano al 90%.

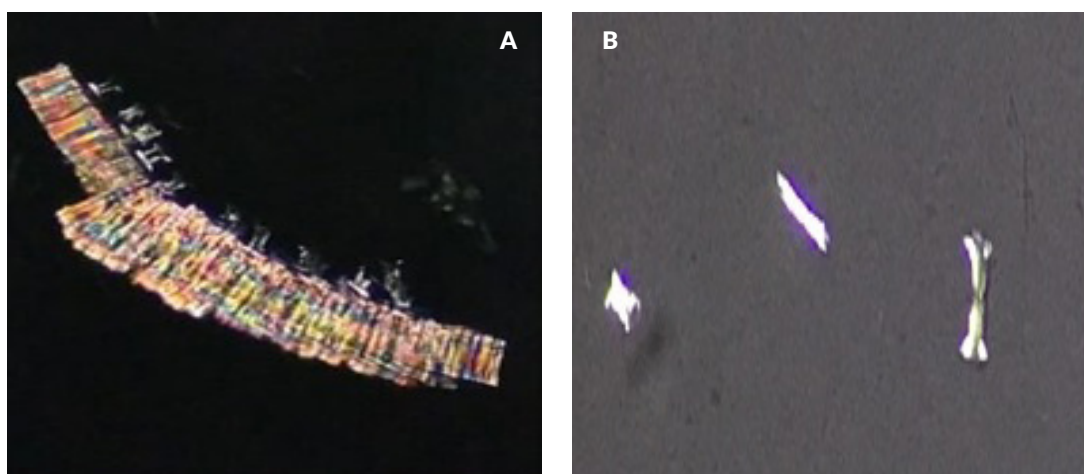


FIGURA 1. A. TORTA DE SOJA OBSERVADA EN EL EXTRACTO DE UNA MUESTRA DE SALCHICHA FRESCA FORTIFICADA AL 1% CON HARINA DE SOJA. OBSERVACIÓN CON MICROSCOPIO ÓPTICO BINOCULAR, A 100X CON LUZ POLARIZADA. B. ESTRUCTURAS CELULARES DE SOJA OBSERVADAS EN EL EXTRACTO DE UNA HAMBURGUESA FORTIFICADA AL 1% CON AISLADO DE SOJA. OBSERVACIÓN CON MICROSCOPIO ÓPTICO BINOCULAR, A 100X CON LUZ POLARIZADA.

ELISA

En la **Tabla 1** se presentan los datos obtenidos para las distintas matrices analizadas con y sin fortificación. Los resultados muestran una alta sensibilidad de esta metodología para los distintos productos independientemente del patrón de soja utilizado para fortificar. Cabe destacar que los valores de absorbancia encontrados permiten suponer que el límite de detección del ELISA se encuentra muy por debajo de los niveles

de fortificación utilizados. De todas maneras, a los fines de detectar la adulteración en un producto cárnico, esta propiedad no parece ser una cuestión determinante.

El método, debido a su alta sensibilidad, se presenta como una opción a considerar a la hora de evaluar la presencia de proteína de soja en el control de alérgenos en alimentos.

TABLA 1: RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE ELISA DE LOS ESTÁNDARES DEL KIT Y LAS MATRICES CON Y SIN FORTIFICACIÓN.

Muestra	Absorbancia a 450 nm	Resultado cualitativo
Blanco reactivos	0.281	-
Standard 1 kit	0.365	+
Standard 2 kit	0.941	+
Standard 3 kit	1.977	+
Standard 4 kit	2.787	+
Harina soja desgrasada (H)	>3.000	+
Aislado proteico de soja (A)	>3.000	+
M1 (Jamón cocido)	0.105	-
M2 (Jamón crudo)	0.168	-
M3 (salchicha fresca)	0.289	-
M4 (hamburguesa)	0.125	-
M1 + 1% H	>3.000	+
M1 + 1% A	>3.000	+
M2 + 1% H	>3.000	+
M2 + 1% A	>3.000	+
M3 + 1% H	>3.000	+
M3 + 1% A	>3.000	+
M4 + 1% H	>3.000	+
M4 + 1% A	>3.000	+

PCR

En la **Tabla 2** pueden observarse los resultados obtenidos para las corridas de PCR. Según puede verse, los mismos son comparables a los obtenidos por las técnicas anteriormente estudiadas, con valores de *crossing point* (Cp) comprendidos entre 23 y 31 ciclos para las muestras en las que se detectaron derivados de soja. No se observó amplificación en las corridas de las matrices que no fueron fortificadas.

En la **Figura 2** se muestran las corridas obtenidas para los patrones de fortificación y para jamón cocido fortificado con los distintos patrones utilizados, respectivamente. El método presenta buena sensibilidad para todas las opciones

analizadas y permite detectar la presencia de derivados de soja a concentraciones características de posible adulteración. **Análisis de muestras comerciales:** Al analizar un amplio abanico de productos cárnicos (**Tabla 3**), se obtuvieron resultados similares para las tres metodologías utilizadas, mostrando además que los mismos cumplían con la legislación. Las distintas técnicas mostraron una alta especificidad y sensibilidad para los fines propuestos, independientemente de la matriz estudiada.

En la **Figura 3** pueden observarse las corridas por PCR de algunos de los alimentos analizados.

TABLA 2: RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA CORRIDA POR PCR DE LOS ESTÁNDARES DEL KIT Y LAS MATRICES CON Y SIN FORTIFICACIÓN.
ND: no se detecta. Cp: valor de *crossing point* obtenido.

Muestra	Cp	Resultado cualitativo
Harina soja desgrasada (H)	23.30	+
Aislado proteico de soja (A)	29.20	+
M1 (Jamón cocido)	ND	-
M2 (Jamón crudo)	ND	-
M3 (salchicha fresca)	ND	-
M4 (hamburguesa)	ND	-
M1 + 1% H	30.12	+
M1 + 1% A	28.49	+
M2 + 1% H	30.09	+
M2 + 1% A	29.51	+
M3 + 1% H	30.83	+
M3 + 1% A	28.21	+
M4 + 1% H	29.27	+
M4 + 1% A	27.91	+

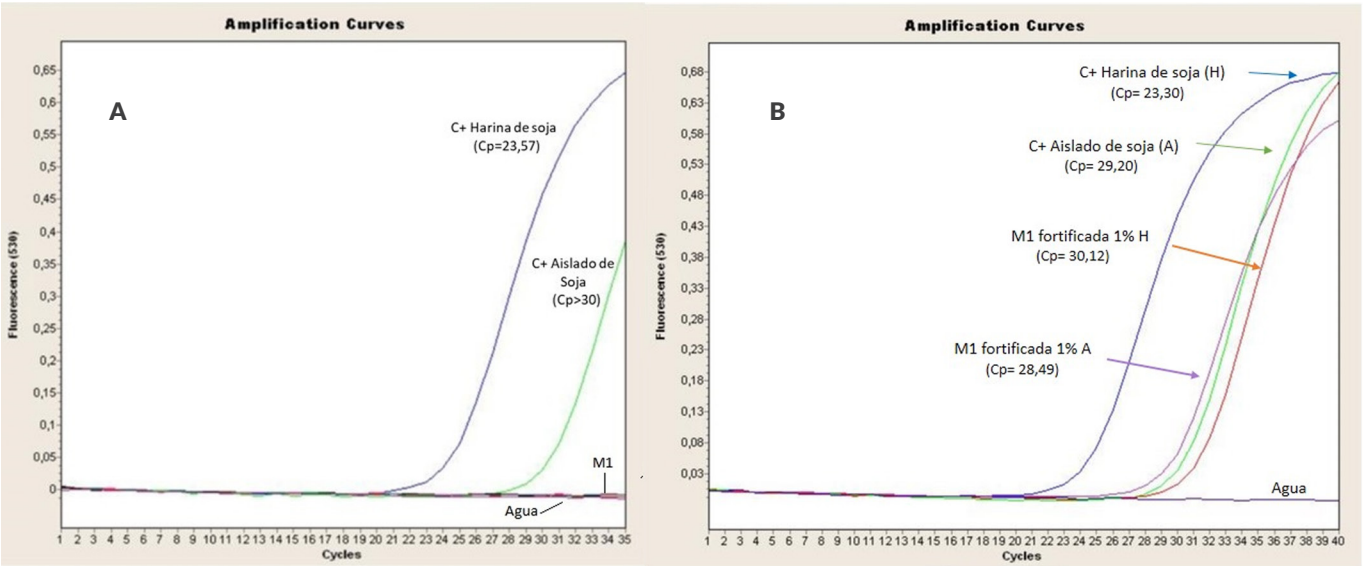


FIGURA 2. A. CORRIDAS DE PCR PARA EL JAMÓN COCIDO (M1) SIN FORTIFICAR Y PARA LOS PATRONES HARINA DE SOJA DESGRASADA Y AISLADO PROTEICO DE SOJA. B. CORRIDAS DE PCR PARA LA MUESTRA DE JAMÓN COCIDO FORTIFICADO Y PARA LA HARINA DE SOJA DESGRASADA Y EL AISLADO PROTEICO DE SOJA.

TABLA 3: RESULTADOS OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALES POR LAS TRES METODOLOGÍAS PROPUESTAS.

ND: no se detecta; SD: se detecta; Cp: valor de crossing point obtenido.

Muestra	Microscopia	ELISA	PCR
Jamón cocido con cuero	Ausencia	ND	ND
Jamón cocido	Ausencia	ND	ND
Lomo de cerdo	Ausencia	ND	ND
Lomo Horneado	Ausencia	ND	ND
Espetec	Ausencia	ND	ND
Panceta salada 1	Ausencia	ND	ND
Pernil de cerdo	Ausencia	ND	ND
Panceta salada 2	Ausencia	ND	ND
Chorizo fresco	Ausencia	ND	ND
Hamburguesa 1	Ausencia	ND	ND
Hamburguesa 2	Ausencia	ND	ND
Hamburguesa 3	Ausencia	ND	ND
Medallones de carne vacuna	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Salchicha cocida 1	Presencia	SD	SD (Cp=27,34)
Salchicha cocida 2	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Salchicha cocida 3	Presencia	SD	SD (Cp=28,39)
Mortadela	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Embutido cocido a base de cerdo	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Fiambre cocido de paleta de cerdo	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Matambre Vacuno arrollado	Ausencia	ND	ND

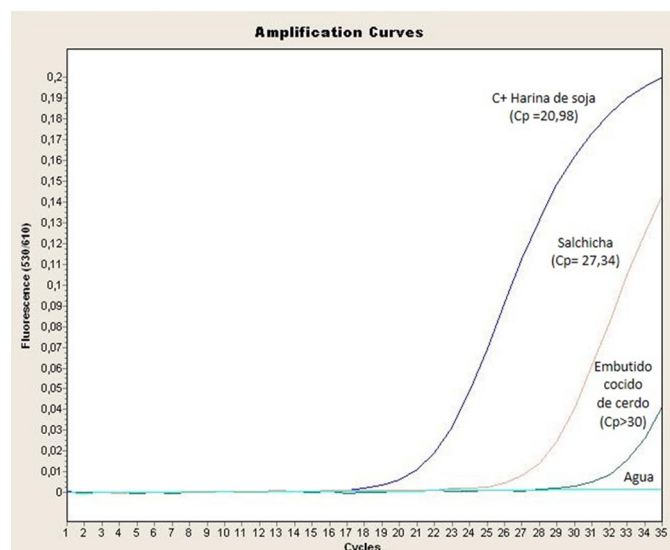


FIGURA 3. CORRIDAS DE PCR PARA EL PATRÓN DE HARINA DE SOJA DESGRASADA Y PARA LAS MUESTRAS COMERCIALES DE LOMO DE CERDO, SALCHICHA Y EMBUTIDO COCIDO DE CERDO.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado la utilidad de la soja por sus propiedades tecnológicas y biofuncionales, y la industria la ha incorporado a numerosos productos del rubro alimenticio como la leche y sus derivados, los cárnicos, los farináceos, productos para mascotas, vitaminas y hasta en cosméticos. Asimismo, hay que tener en cuenta su gran poder alergénico, sobre todo en infantes y niños pequeños. Dado que en la actualidad no existe una cura para las alergias, la única manera eficaz de prevenirlas es eliminar los alérgenos de la dieta. La detección analítica de los alérgenos alimentarios permitiría minimizar el riesgo de episodios en personas sensibles, y maximizar las posibilidades de elección de alimentos nutritivos por parte de los consumidores. Los alérgenos alimentarios más comunes intervienen en una gran variedad de alimentos elaborados y cada uno de los principales alérgenos contienen múltiples proteínas, muchas de las cuales no han sido caracterizadas. Es por ello que la trazabilidad y el etiquetado de los productos comercializados se consideran factores importantes para solucionar esta problemática. La necesidad de cumplir con estos requisitos legales hace necesario disponer de técnicas analíticas altamente sensibles y precisas para lograr un etiquetado confiable y comprobable científicamente.

Es por ello que a lo largo del tiempo han surgido diferentes metodologías analíticas para su detección.

A estos fines, la microscopía se ha constituido como una técnica sencilla, de muy bajo costo que requiere únicamente de un microscopio óptico con luz polarizada o polarizador. Pero es limitada la cantidad de muestras que pueden observarse simultáneamente ya que la extracción se realiza por duplicado y depende principalmente de la pericia y la experiencia del analista. El ensayo inmunoenzimático (ELISA), por otro lado, es una herramienta de análisis poderosa para la detección de proteínas específicas. Su ventaja radica en la capacidad de análisis de numerosas muestras en simultáneo con altos niveles de sensibilidad y en que no requiere el uso de gran cantidad de instrumental. En este caso, ofrece la posibilidad de cuantificar proteína de soja, por la curva de calibración empleada, aunque es necesario optimizar su rendimiento por el alto costo que actualmente tienen estos kits comerciales. Su principal desventaja es que no permite detectar a las proteínas desnaturalizadas, lo que puede ocurrir durante el proceso de elaboración de los alimentos procesados, ya que se altera la interacción conformacional de la reacción antígeno (proteína de soja)-anticuerpo. Un ejemplo de esto puede ser la proteína hidrolizada de soja usada como aditivo aromatizante.

En cuanto a la técnica de PCR en tiempo real, hay que tener en cuenta que no se detecta la proteína de soja específicamente, sino una secuencia de ADN específica, que suele ser el gen de la lecitina de soja. Permite el análisis simultáneo de una gran cantidad de muestras con alta sensibilidad y especificidad, y la obtención de los resultados sucede a tiempo real, es decir, a medida que la amplificación del gen en cuestión va ocurriendo. Esto acorta mucho los tiempos de análisis, pero el pre-tratamiento de las muestras en la etapa de extracción de ADN es extenso. Y aunque pueden emplearse procedimientos *in-house* o kits comerciales, lo cierto es que estos suelen ser costosos. Además, depende también de la complejidad de la matriz alimentaria analizada. En el caso de los productos cárnicos, el alto contenido de grasa se presenta como una barrera difícil de sortear que hace compleja la etapa de extracción de ADN.

Analizando los resultados obtenidos, es posible afirmar que en todas las muestras fortificadas se detectó la presencia de derivados de soja por las tres metodologías, y la totalidad de las muestras comerciales se encontraron conformes con la legislación, con lo cual el objetivo propuesto para el presente trabajo fue cumplido.

Considerando las ventajas y desventajas de los tres métodos analizados, y teniendo en cuenta la estabilidad de la molécula de ADN frente a los tratamientos térmicos utilizados en la elaboración de los alimentos, la técnica de PCR se presenta como una herramienta alternativa y confiable para el control de los mismos. El desarrollo a futuro del método de Real Time PCR, permitirá cuantificar el contenido de soja en diversas matrices alimentarias, ya que también existe la posibilidad de realizar una curva de calibración para evaluar el contenido de soja y derivados en diversos productos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- AOAC Official Methods of Analysis 19th Ed. (2012), Method 913.01 Soybean Flour in Meat, Qualitative Test.
- 2- Belloque. J; García M. C.; Torre M, and. Marina M. L. Analysis of Soybean Proteins in Meat Products: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2002; 42(5):507-532.
- 3- Código Alimentario Argentino, Ley 18.284, Decreto 2126/1971.
- 4- Ferrado R; Henry N. Editorial Acribia, Determinación Microscópica de los componentes de los piensos S.A.; Edición: 1; 1967.
- 5- Mafra, I.; Silva, S.; Moreira, E y colaboradores. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. Food Control 19. 2008; 1183 - 1190.
- 6- Manual del QuantiTec Probe PCR Kit - For quantitative, Real time PCR and two-step RT- PCR using sequence-specific probes Marca Qiagen.
- 7- Manual 3M Kit ELISA Soja.
- 8- Meyer. R; Chardonnens. F; Hubner. P; Luthy. J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. Springer-Verlag. 1996; 203: 339-344.
- 9- Montserrat. E; Herrero. B; Vieites. JM; Santaclara. F. Validation of end-point and real-time PCR methods for the rapid detection of soy allergen in processed products. Food Additives & Contaminants: Part A. Volume 27, 2010 - Issue 4.
- 10- Popping. B; Diaz-Amigo. C; Hoenicke. K; Gatti. M; Ferreti. C. Soy Allergen Detection, Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists Chapter 17, Microbiotech Department, Neutron S.p.a, Modena, Italy. 2010. ISBN: 978-0-470-63768-5.
- 11- Soares. S; Mafra. I; Amaral. J; Oliveira. M.B. A PCR assay to detect trace amounts of soybean in meat sausages. International Journal of Food Science and Technology. 2010; 45, 2581-2588.
- 12- Tartaglia. M; Saulle. E; Pestalozza. S; Morelli. L; Antonucci. G; Battaglia. P. Detection of Bovine Mitochondrial DNA in Ruminant Feeds: A molecular Approach to Test for the Presence of Bovine-Derived Materials., Journal of Food Protection. 1998; Vol 61, N 5, 513-518.
- 13- Vázquez. N; Bachur. S; Bello. M; Binotti. S. Identificación de Especies de Origen animal en productos cárnicos por PCR en Tiempo real; S./Revista Ingeniería Alimentaria, / 111. 2014; 46-50.