



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA.
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA.**

**“DETECCIÓN DE GLICOMACROPEPTIDO POR INMUNOENSAYOS EN
LECHE DE CABRA COMO INDICATIVO DE ADULTERACIÓN CON SUERO DE
QUESERÍA CAPRINO.”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS ÁREA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

PRESENTA:

BIOL. FERNANDO ANTONIO GUERRERO ROQUE

TUTORAS:

DRA. NORMA ANGÉLICA CHÁVEZ VELA

DRA. EVA MARIA SALINAS MIRALLES

ASESOR:

M. en C. FERNANDO BON ROSAS

AGUASCALIENTES, AGS., NOVIEMBRE DE 2012.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Aguascalientes, Ags. Miércoles 7 de Noviembre de 2012.

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio de este conducto le notifico que alumno de la Maestría en Ciencias área en Biotecnología Vegetal, BIOL. FERNANDO ANTONIO GUERRERO ROQUE, esta en posibilidad de presentar el examen de grado, ya que ha cubiertos los objetivos y las metas del proyecto de tesis de Maestría "DETECCIÓN DE GLICOMACROPÉPTIDO POR INMUNOENSAYOS EN LECHE DE CABRA COMO INDICATIVO DE ADULTERACIÓN CON SUERO DE QUESERÍA CAPRINO". Además se ha revisado el escrito de la tesis y se esta de acuerdo con el contenido del mismo ya que atendió a las sugerencias hechas por el comité tutorial.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo y quedo a sus órdenes para cualquier duda y/o aclaración

ATENTAMENTE

DRA. NORMA ANGÉLICA CHÁVEZ VELA
Profesor e Investigador y Tutora

DRA. EVA MARIA SALINAS MIRALLES
Profesor e Investigador y Tutora

M. en C. FERNANDO BON ROSAS
Profesor y Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

BIOL. FERNANDO ANTONIO GUERRERO ROQUE,
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Guerrero:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Detección de Glicomacropéptido por Inmunoensayos en leche de cabra como indicativo de adulteración con suero de quesería caprina"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 7 de noviembre de 2012
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor reconocimiento y gratitud a la Dra. Norma Angélica Chávez Vela, quien a lo largo de la realización de esta tesis ha seguido de cerca, en el proyecto demostrando su constante dedicación, interés y paciencia por mi formación, además de haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación.

A la Dra. Eva María Salinas Miralles por su paciente y amable asistencia y asesoramiento continuo que ayudaron a la realización de esta investigación.

Al M. C Fernando Bon Rosa por sus valiosas orientaciones.

En especial dar las gracias a la A.Q.B. Dulce María Diana Pérez Téllez, amiga, por su apoyo y colaboración fue muy importante en el desarrollo de la tesis.

También quiero dar las gracias al Dr. José Luis Quintanar Stephano por las facilidades y ayuda proporcionadas para poder llevar a cabo la parte práctica del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me otorgó para realizar los estudios de maestría y por haber aportado parte de los recursos que permitieron realizar esta investigación.

DEDICATORIAS

El presente trabajo quiero dedicar por su apoyo y comprensión en especial a:

A mi pareja y futura esposa Norma por siempre estar a mi lado y motivarme a seguir mejorando día a día.

A mis padres Fernando y Esthela que me dieron el apoyo y las herramientas para poder desarrollarme como persona y profesionista.

A mis hermanos Abisai y Daniel por su cariño.

A mis Abuelos por darme el cariño y el ejemplo de que el trabajo es la clave para poder seguir adelante en la vida en especial a mi abuela Esthela por siempre confiar en mí.

ÍNDICE GENERAL.

TÍTULO	PAGINA
RESUMEN	<u>10</u>
I. INTRODUCCIÓN	<u>12</u>
1.1 ANTECEDENTES	<u>12</u>
1.1.1 Generalidades de la Leche de Cabra.	<u>12</u>
1.1.1 Definición de leche.	<u>12</u>
1.1.2. Leche de cabra.	<u>12</u>
1.1.2.1 Historia de la leche de cabra.	<u>12</u>
1.1.2.2 Características Bioquímica de la leche de cabra.	<u>13</u>
1.1.2.2.1. Proteínas de la leche de cabra.	<u>14</u>
1.1.2.2.1.2 Carbohidratos de la leche de cabra.	<u>15</u>
1.1.2.2.1.3 Grasas de la leche de cabra.	<u>15</u>
1.1.2.2.1.4 Minerales y Vitaminas de la leche de cabra.	<u>15</u>
1.1.3 Características organolépticas de leche de cabra.	<u>16</u>

1.1.4 Comparación de la leche de cabra y la leche de vaca.	<u>17</u>
1.1.5 Importancia de la leche de cabra en la economía mundial.	<u>19</u>
1.1.5.1 Importancia de la leche de cabra en la economía en México.	<u>20</u>
1.1.6 Perspectivas de la producción de leche de cabra en el Mundo.	<u>21</u>
1.1.6.1 Perspectivas de la producción de leche de cabra en el México.	<u>22</u>
1.1.7 Problemática de adulteración de la leche.	<u>24</u>
1.1.8 Glicomacropéptido (GMP).	<u>25</u>
1.1.8.1 Técnicas de detección del GMP.	<u>26</u>
1.1.8.2 Sistema ELISA.	<u>27</u>
1.1.8.3 Antecedentes de estudios de detección de GMP en leche.	<u>30</u>
1.1.8.4 Importancia de los estudios relacionados con la leche de cabra.	<u>33</u>
1.2 JUSTIFICACIÓN.	<u>35</u>

1.3 HIPÓTESIS.	<u>36</u>
1.4 OBJETIVO.	<u>37</u>
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	<u>38</u>
2.1 Obtención de GMPc.	<u>38</u>
2.2 Determinación de la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales Anti-GMPb frente al GMPc	<u>39</u>
2.3 Desarrollo de un método mediante inmunoblot para detectar suero caprino.	<u>41</u>
2.3.1 Determinación del límite de detección de suero caprino por inmunoblot.	<u>42</u>
2.4 Desarrollo de un sistema ELISA para la detección de GMPc utilizando anticuerpos policlonales anti-GMPb.	<u>42</u>
2.4.1 Conjugación de los anticuerpos policlonales (Anti-GMPb) con la biotina.	<u>43</u>
2.4.2 Estandarización de un sistema ELISA tipo sándwich.	<u>44</u>
2.4.2.1 Procedimiento de ELISA sándwich.	<u>45</u>

2.4.2.2	Título de reactantes.	<u>46</u>
2.4.2.3	Optimización de los tiempos de incubación.	<u>47</u>
2.4.2.4	Determinación de la sensibilidad del sistema ELISA sándwich para detección de suero caprino de quesería.	<u>47</u>
2.4.3	Viabilidad del anticuerpo policlonal anti-GMP	<u>48</u>
III.	RESULTADOS	<u>49</u>
3.2	Reactividad de los anticuerpos policlonales frente al GMPC.	<u>49</u>
3.2.1	Especificidad de los anticuerpos policlonales frente al GMPC.	<u>49</u>
3.3	Desarrollo de un método mediante inmunoblot para cuantificar suero caprino de quesería.	<u>50</u>
3.3.1	Determinación del límite de detección del suero de quesería.	<u>51</u>

3.4 Estandarización del ensayo de la prueba de ELISA.	<u>53</u>
3.4.1 Verificación de la biotilación de los anticuerpos anti-GMPb.	<u>53</u>
3.4.2 Título de los reactantes.	<u>54</u>
3.4.3 Optimización de los tiempos de incubación.	<u>59</u>
3.4.4 Determinación de la sensibilidad del sistema ELISA sándwich para detección de suero de quesería caprino.	<u>61</u>
3.5 Viabilidad del anticuerpo anti-GMPb.	<u>63</u>
IV. DISCUSIÓN	<u>64</u>
Reactividad y especificidad del anticuerpo policlonal anti-GMPb.	<u>64</u>
Sensibilidad del inmunoblot para detección de suero de quesería caprino.	<u>66</u>
Estandarización y sensibilidad del sistema ELISA sándwich para detección de suero de quesería caprino.	<u>66</u>

CONCLUSIÓN	<u>70</u>
GLOSARIO.	<u>71</u>
BIBLIOGRAFÍA	<u>72</u>



ÍNDICE DE TABLAS

	PAGINA.
Tabla 1. Contenido de Leche de Cabra.	<u>13</u>
Tabla 2. Vitaminas de la leche de cabra.	<u>16</u>
Tabla 3. Producción mundial de leche cabra (millones de toneladas).	<u>20</u>
Tabla 4. Producción mundial de leche por especie (millones de toneladas).	<u>22</u>
Tabla 5. Comparación de la producción de leche bovina y caprina del año 2004 hasta el 2008.	<u>22</u>
Tabla 6. Respuesta de adulteración con porcentajes de suero caprino.	<u>23</u>
Tabla 7. Absorbancias de la curva estándar del sistema ELISA para detectar adulteración con suero caprino de quesería.	<u>62</u>

ÍNDICE DE FIGURAS.

	PAGINA.
Figura 1. Columna de Sephadex.	<u>44</u>
Figura 2. Lector de ELISA iMARK™.	<u>46</u>
Figura 3. Inmunoblot para probar la reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente al GMPc.	<u>49</u>
Figura 4. Inmunoblot para probar la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente al GMPc.	<u>50</u>
Figura 5. Inmunoblot para determinar la inmunotinción.	<u>51</u>
Figura 6. Inmunoblot para determinar el límite de detección del Inmunoblot para detectar suero caprino de quesería.	<u>52</u>
Figura 7. Curva estándar del inmunoblot para detección de suero caprino de quesería.	<u>53</u>
Figura 8. Inmunoblot para verificar la biotilación de los anticuerpos anti-GMPb frente al GMPb.	<u>54</u>
Figura 9. ELISA para determinar el título del anticuerpo de captura.	<u>55</u>
Figura 10. ELISA para determinar el título del antígeno mediante el anticuerpo conjugado.	<u>56</u>
Figura 11. ELISA para determinar el título del suero caprino de quesería.	<u>57</u>
Figura 12. Elisa para determinar el título del Anticuerpo Biotinilado.	<u>58</u>
Figura 13. ELISA para obtener el tiempo de incubación del tiempo de incubación del suero de quesería caprino.	<u>59</u>
Figura 14. Variación de los tiempos de incubación del anticuerpo biotilado (Anti-GMPb*) para reducción de tiempo de realización del sistema ELISA para detectar suero caprino de quesería.	<u>60</u>
Figura 15. Variación de tiempos de incubación del sustrato y enzima del sistema ELISA para reducción de tiempo de realización del sistema ELISA para detectar suero caprino de quesería.	<u>61</u>
Figura 16. Curva estándar del sistema ELISA para detección de suero caprino.	<u>62</u>

Figura 17. Efecto del almacenamiento a -20°C del anticuerpo anti-GMPb.

63



RESUMEN.

En México y en el mundo la demanda de derivados de leche caprina se ha incrementado paulatinamente por sus propiedades biológico-químicas y benéficas para la salud. Una práctica común de los productores de leche es la adulteración de esta con suero de quesería (SQ), lo que hace que tenga una mayor utilidad, sin embargo esto afecta a industrializadores pues tiene un efecto negativo en el rendimiento y las características nutrimentales del producto a obtener. Es necesario, por lo tanto, una metodología rápida, eficaz, sensible y precisa para detectar SQ de leche de cabra. Los inmunoensayos cumplen estos requisitos. El GMP es obtenido de la κ -caseína durante la elaboración del queso por la acción de la quimosina, estando presente en el SQ pero no en la leche. En este trabajo se desarrollaron dos inmunoensayos, un inmunoblot y un sistema ELISA tipo sándwich, para detectar GMP caprino (GMPc) como indicador de adulteración de la leche con SQ, utilizando un anticuerpo policlonal anti-GMP bovino (GMPb). Primeramente fue necesario comprobar la reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb (que ya se habían generado en el laboratorio) frente al GMPc, detectándose dos fracciones proteicas (11.26 y 9.12 kDa) de peso molecular diferentes en la fracción mas pesadas y similar en la fracción ligera respecto con el GMP bovino comercial. El inmunoblot tuvo un limite de detección de 0.5% v/v con un tiempo de realización de 8h. El sistema ELISA se desarrolló y se estandarizó con los títulos de los reactantes: anticuerpo de captura (anti-GMP), antígeno (GMPc) y anticuerpo marcado (anti-GMP*) y el tiempo mínimo de reacción de los mismos que dieron respuestas máximas de absorbancia. Estos fueron: anti-GMP de 0.2254 $\mu\text{g/ml}$, anti-GMP* 0.0073 $\mu\text{g/ml}$ y para el GMPc 0.75 $\mu\text{g/ml}$. Los tiempos de incubación de los reactantes fueron de 1h para el suero de quesería caprino, 1h para anti-GMP conjugado con biotina, 1h de la enzima Extravidina peroxidasa® y 1 h de sustrato OPD, con una duración total de la metodología de 4.5h, este ensayo se obtuvo un LD de 0.0019% . Ambos ensayos son una buena alternativa para aplicarse en el análisis de leche de cabra en las industrias lácteas para control de calidad de sus productos.

SUMMARY.

In Mexico and all over the world the demand for goat milk products has increased gradually by its biological-chemical properties and health benefits. A common practice of milk producers is its adulteration with cheese whey (CW), which affects milk processing industries as it has a negative effect on yield and nutritional characteristics of the product to obtain. Therefore, it is necessary a rapid, effective, sensitive and accurate methodology to detect CW in goat milk. Immunoassays have these requirements. Glycomacropptide (GMP) is obtained from the κ -casein during cheese making by the action of chymosin, being present in CW but not in raw milk. In this work it was performed two immunoassays, immunoblot and sandwich ELISA system, to identify goat GMP (GMPc) as indicative of milk adulterated with CW, using a polyclonal anti-GMP bovine (GMPb) antibody. First, it was necessary to test the reactivity of the polyclonal anti-GMPb antibody (previously developed in our laboratory) against GMPc. The antibody detects two protein fractions (11.26 and 9.12 kDa) corresponding to GMPc, with different molecular weights from those of commercial GMPb. The immunoblot has a sensitivity of 0.5% v/v, with a full time development of 8h. The ELISA system was developed and the title of the reactants was fixed: capture antibody (anti-GMP), antigen (GMPc) and biotin-labeled antibody (anti-GMP*). The minimum reaction time that gave the highest absorbance was also analyzed. The results were: 0.2254 $\mu\text{g/ml}$ of anti-GMP, 0.0073 $\mu\text{g/ml}$ of anti-GMP * and 0.75 $\mu\text{g/ml}$ of cGMP. Incubation times of the reactants were 1h for the goat CW, 1h for anti-GMP*, 1h for enzyme Extravidina ® and 1 h for peroxidase substrate OPD, with a total duration of the methodology of 4.5h, this assay had 0.0019% (v/v) for LQ. Both immunoassays can be used in milk industries to detect milk adulteration.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 ANTECEDENTES.

1.1.1. Generalidades de la leche cabra.

1.1.1.1 Definición de la leche.

La leche es el líquido segregado por las hembras de dichos mamíferos a través de las glándulas mamarias, que tiene como finalidad básica alimentar a la cría durante su crecimiento.

La leche de cabra y la de vaca, son de las más comercializadas, sin embargo existen otras muchas variedades de leche dependiendo del organismo que provenga (Kirk y col., 1996).

1.1.2. Leche de cabra.

1.1.2.1 Historia de la leche de cabra.

En la actualidad se ha considerado a través de pruebas obtenidas por diversos estudios arqueológicos, que hace aproximadamente unos 10,000 años, la especie humana dejó la caza y la colección de diversos recursos alimentarios vegetales y animales disponibles en el medio, para paulatinamente iniciar nuevas actividades que favorecieron su subsistencia, ellas fueron la agricultura y la ganadería.

La ganadería lechera, tiene sus orígenes como se ha demostrado, en la migración, que consiste, en una forma de vida humana siguiendo a los rebaños de animales de acuerdo con sus emigraciones anuales, obteniendo de las hembras leche y otros recursos (Vega y col., 2005).

Se dice que la cabra fue uno de los primeros animales que domesticó el hombre y el único que le proporcionó leche durante la antigüedad. Se extendió su crianza por todo el mundo dada su fácil adaptación a los más variados climas, ocupando el área de distribución más amplia de los animales domésticos. Su talla pequeña, pocas exigencias, facilidad de movimiento para cosechar su dieta, docilidad y elevada producción, tuvieron que hacerla muy apreciada por el hombre primitivo, como lo ponen de manifiesto las pinturas y tallas del arte rupestre, que hablan de su proximidad al hombre.

La leche es el principal producto de la cabra y un componente esencial de la "dieta mediterránea" en sus orígenes, especialmente mediante su transformación en queso. Esto fue señalado por los autores clásicos Catón, Virgilio, Columela, Plinio, Ateneo, mostrando no sólo las formas de hacer el queso, sino los tipos que existían ("oxigala", "moretum") o incluso algunas especialidades culinarias como un pastel ("sabilium") a base de queso de cabra, miel, harina y huevos, espolvoreado con semillas de amapolas y cocido al horno (Boza y col, 1996).

1.1.2.2 Características bioquímica de la leche de cabra.

En lo que concierne a la composición bioquímica de la leche de cabra, se le considera en la actualidad como poseedora de unas características sumamente benéficas, como lo es, que tiene menor cantidad de grasas ya que tiene menor contenido de ácidos grasos de cadena media (AGCM) entre otras más, lo que le confieren un alto interés como alimento y como objeto de investigación (Boza y col, 1996).

La composición general de la leche se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de leche de cabra. Se muestra el contenido de los diferentes componentes en porcentaje, además de su pH. (Boza y col, 1996).

CONTENIDO	CANTIDAD (p/v)
Sólidos totales	11.70- 15.21%
Proteína	2.9-4.6%
Grasa	3-6.63%
Lactosa	3.8-5.12%
Cenizas	0.69-0.89%
pH	6.41-6.70

La leche de verano tardío contiene menor cantidad de grasa y de extracto magro, alrededor de dos unidades porcentuales menos para la grasa y de una para dicho extracto. Junto con ello, también influye el momento de la lactación, fluctuaciones en la composición de la leche que son más pronunciadas en la cabra que en la vaca (Boza y col, 1996).

1.1.2.2.1 Proteínas de la leche de cabra.

La leche de cabra contiene alrededor de 5.2 gramos de nitrógeno por kilogramo, que equivalen a 33.2 g de proteína. Las proteínas mayoritarias de la leche de cabra, al igual que sucede en la de vaca, son las caseínas que se caracterizan porque precipitan a pH 4.6. Las proteínas que permanecen en solución a dicho pH son las del lactosuero, formadas por α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina, inmunoglobulinas, péptidos y otras proteínas menores, algunas con carácter enzimático.

Entre las proteínas lácteas existen seis productos genéticos de la glándula mamaria de carácter mayoritario: α 1-caseína, α 2-caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas, todos las cuales exhiben polimorfismo genético puesto que son productos de genes autosomales, alélicos, codominantes.

Las concentraciones de proteínas y enzimas menos abundantes en la leche de cabra son: la lactoferrina (20-200 g/ml), prolactina (44ng/ml), transferrina (20-200 ng/ml) e inmunoglobulinas (IgA μ g/ml: 30-80; IgM μ g/ml: 10-40 y IgG μ g/ml: 100-400), en cantidades comparables a la leche de vaca.

En lo que concierne a la lactoferrina, el contenido en la leche de cabra es de 10 a 100 veces menor del existente en la leche de la mujer. Teniendo en cuenta al alto contenido de inmunoglobulinas, especialmente de la de isotipo IgG, estas se van a encargar de responder a la presencia de antígenos derivados de bacterias y virus que llegan a la glándula mamaria vía conducto del pezón.

Las investigaciones han demostrado que la proteína de la leche de cabra “es de mejor calidad que la de la leche vaca y de más fácil absorción para el organismo”. La distribución de enzimas en la leche de cabra y vaca son bastante diferentes, la actividad proteolítica de la leche de cabra fresca, es más alta que la de vaca, mientras que la de la xantina-oxidasa es un 10% menor, que la misma. Dentro de las diferentes formas que tiene la leche en su industrialización la actividad enzimática se distribuye de la siguiente manera: en la crema, suero y fracciones caseínicas de la leche de cabra, la actividad lipolítica llega a ser entre el 46 y 48% de la total, mientras que en la de vaca el 78% de esta se asocia a la caseína, el 6% se relaciona con la crema y el 16% con el suero. La actividad lipasa en la leche humana se localiza en un 92% en la fase de crema (Boza y col, 1996).

1.1.2.2.2 Carbohidratos de la leche de cabra.

Boza (1996) menciona que el nivel del contenido de carbohidratos es de 3,8 a 5,12%, el cual es similar al de la leche de vaca e inferior al existente en la de la mujer (7,41%). Las dos formas isómeras de la lactosa α y β se hallan en equilibrio en la leche, con una cantidad del 38% de α -lactosa y el 62% de β -lactosa (o los 2/3 de la lactosa de la leche), conociéndose desde hace muchos años, que la β -lactosa favorece la formación de una flora intestinal acidófila (*bifidus*), mientras que la α -lactosa induce a un medio alcalino (*colis* y *enterococos*).

1.1.2.2.3 Grasas de la leche de cabra.

El porcentaje de grasa en la leche de cabra es superior a la de vaca, ya que la leche de vaca tiene un 3.38% mientras que la de cabra tiene 4.81%. En relación al tamaño de la micela o glóbulo graso, la de la leche de cabra es por término medio de 3,5 μm , con un alto porcentaje de glóbulos con diámetros de 1,5 μm a 3 μm , considerablemente inferior a los que presenta la leche de vaca (4,5 μm); este menor tamaño de los glóbulos de grasa de la leche de cabra, le proporcionan una emulsión fina y más uniforme, lo cual influye favorablemente en su digestibilidad. Se afirma que la diferencia principal entre la leche de cabra y la de vaca es en cuestión de los componentes de la grasa, siendo un 35% de AGCM (C6-C14), alcanzando la de vaca sólo el 17%. Es por esto, por lo que los ácidos grasos caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0), toman su nombre concretamente de la leche en donde mayormente aparecen, alcanzando estos tres ácidos en la leche de cabra un 15% del total, valor que sólo llega al 5% en la vaca. Otro aspecto importante y que hoy en día es crucial para la alimentación sana es el contenido del colesterol, el cual se encuentra en la leche de cabra en menor concentración dentro del rango de 10-20 mg/100 ml (Boza y col, 1996).

1.1.2.2.4 Minerales y vitaminas de la leche de cabra.

La leche de cabra contiene minerales en cantidades que varían entre 0.70 y 0.85% la cual es similar a la de la leche de vaca y su composición en vitaminas se muestra en la Tabla 2 (Boza y col, 1996).

Tabla 2. Concentración de las vitaminas de la leche de cabra. Se muestra la concentración de cada vitamina y diferentes ácidos que contiene la leche de cabra. (Boza y col, 1996).

VITAMINA	CANTIDAD
A	2030 UI/L
D	0.6 µg/L
K	12 µg/L
B1	0.5 mg/L
B2	1.4 µg/L
B6	0.5 mg/
B12	0.7 mg/L
Niacina	2.7 mg/ L
Ac. Ascórbico	12.6 mg/L
Ac. Pantotenico	3 mg/L
Ac. Fólico	6 µg/L
Colina	150mg/L
Inositol	210mg/L

1.1.3 Características organolépticas de la leche de cabra.

Cuando la leche de vaca se calienta y posteriormente se enfría rápidamente, se separa la nata, facilitando la aglomeración de las globulinas del plasma lácteo. Este hecho con la grasa de la leche de cabra no sucede. Esto puede ser debido al pequeño volumen de sus glóbulos de grasa, a su bajo contenido en euglobulinas y aglutininas, responsables de la escasa capacidad de la leche de cabra para formar crema o bien que estas pierdan consistencia cuando se enfrían (Boza y col, 1996). Como señalan Juárez y colaboradores (1991), el comportamiento de la leche de cabra frente al cuajo es diferente al de la leche de vaca. Su coágulo es menos firme, pero coagula y desuera más rápidamente que la leche de

vaca, dando lugar a un gel de baja cohesión y con mayores pérdidas de finos, lo que conlleva a la obtención de menor rendimiento quesero.

Kim Ha y Lindsay (1991) mencionan que en el sabor de la leche tienen implicación los ácidos grasos de cadena ramificada tipo 4-metil octanoico y 4-etil octanoico. Se piensa también, que las mayores concentraciones de los ácidos grasos cáprico, caproico y caprílico, de 6, 8 y 10 átomos de carbono, confieren a esta leche un sabor característico. Igualmente su mayor contenido en cloro y otros minerales contra el de la leche de vaca, le dan un sabor ligeramente salobre. Además esta leche tiene un pH 6.7, debido a su mayor contenido proteico y a las diferentes combinaciones de sus fosfatos (Saini y Gilí, 1991). Por esta razón menciona que los ácidos grasos de cadena ramificada influyen en el sabor de la leche de cabra (Jandal, 1996).

1.1.4 Comparación de la leche de cabra con la leche de vaca.

La leche de cabra al igual que las leches de otras fuentes animales, es una emulsión de grasa en una solución de agua, cuya composición varía según la especie. La mayoría de los componentes son similares a la leche de vaca, como son sólidos totales, grasa, lactosa y los componentes nitrogenados y proteínas. Entre las proteínas del suero se encuentran las proteínas solubles, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas y las caseínas. Las proteínas solubles se encuentran en pequeñas cantidades junto con las proteasas-peptonas. Por su parte, las caseínas, que son las proteínas que coagulan en la leche, presentan marcadas diferencias respecto a la leche de vaca, esencialmente estas diferencias ocurren en el polimorfismo genético así como en la estructura, composición y tamaños de las micelas de las caseínas. En la leche de vaca la α -S1 caseína es la principal caseína con 6 diferentes tipos A, B, C, E, F y “nula”. Por otro lado, las caseínas en la leche de cabra están constituidas por cuatro fracciones principales: α -S1, α -S2, beta y kappa (Haenlein, 2004; Vega y León et al., 2005). En la leche de vaca es la α -S1 la caseína más abundante, mientras que en la leche de cabra es la variante α -S2. Las diferencias en los tipos de variantes genéticas son debidas a los aminoácidos presentes en las cadenas de las proteínas, los cuales son los responsables de las diferencias en la digestibilidad, en las propiedades para la elaboración de quesos y en los sabores generados a los productos de la leche de cabra (Haenlein, 2004).

La acción de las proteasas sobre las caseínas de la leche de cabra genera péptidos de sabor menos amargo que los obtenidos de las caseínas de leche de vaca (Haenlein, 2004).

Las micelas de las caseínas de leche de cabra tienen un rango de dispersión más elevado, mayor mineralización y un nivel más bajo de hidratación que las micelas de la leche de vaca (Ohiokpehai, 2003; Vargas et al., 2008). Por su parte, la acidez de la leche de cabra (6.4%) es ligeramente menor que la de vaca (6.7%). Otro aspecto importante que diferencia las leches de cabra y de vaca, es que la leche de cabra no contiene carotenos por lo que sus productos no son de color amarillo como ocurre con los productos de la leche de vaca (Ohiokpehai, 2003).

En relación a la grasa, la leche de cabra contiene glóbulos de grasa más pequeños que los de la leche de vaca. La presencia de estos glóbulos de grasa pequeños en la leche de cabra se ha relacionado con una leche más digerible y con propiedades nutricionales importantes (Le Jaouen, 1988). En promedio la grasa de la leche de cabra difiere significativamente en el contenido de sus ácidos grasos respecto a la leche de vaca. El contenido de los ácidos: butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), laúrico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y linoleico (C18:0) es mayor, pero menor en los ácidos esteáricos (C18:0) y oleico (C18:1). Tres de los triglicéridos de cadena media (C6-C14) son llamados de “cabra” debido a que predominan en la leche de cabra. Estos ácidos han llegado a ser utilizados en tratamientos médicos de diversos desórdenes clínicos (síndrome de la mala absorción, alimentación de bebés prematuros, desnutrición infantil, fibrosis cística, epilepsia, por mencionar algunos) debido a que estos ácidos proveen directamente la energía en lugar de ser depositados en tejido adiposo, así como una baja presencia de colesterol en suero. La leche de cabra excede a la leche de vaca en ácidos grasos monoinsaturados, poliinsaturados y en triglicéridos de cadena media, los cuales son conocidos por ser benéficos para la salud, especialmente para enfermedades cardiovasculares (Haenlein, 2004).

Estudios experimentales en modelos animales (cerdo) y en estudios clínicos (niños, principalmente) han demostrado que la leche de cabra tiene propiedades bioquímicas que favorecen su valor nutricional al compararla con la leche de vaca y la leche humana (Pellerin, 2001). El consumo de leche de cabra reduce los niveles de colesterol y mantiene

normales los niveles de triglicéridos; lipoproteínas de alta densidad (HDL), transaminasa glutamicooxalacética (GOT) y transaminasa glutámico pirúvico (GPT). La leche de cabra es rica en triglicéridos de cadena media, lo que le da una ventaja sobre la leche de vaca; ya que en el metabolismo de los lípidos se degradan más rápido por lo que se sugiere su uso en pacientes con síndrome de mala absorción (Alfárez, 2001).

1.1.5 Importancia de la leche de cabra en la economía mundial.

La leche de cabra y sus derivados son recursos alimentarios que han recibido en los últimos años mayor atención mundial. Su producción se ha incrementado notablemente en las últimas dos décadas y por ello está contribuyendo cada vez más a mejorar la economía. Lo anterior y la buena adaptabilidad de las cabras a las zonas marginales y desfavorecidas, han contribuido a que surjan numerosas pequeñas explotaciones, que han hecho que la producción de leche cabra de los países desarrollados sea cada vez más significativa (Haenlein y Cacéese, 1984).

De acuerdo con datos de la FAO (2010) la producción de leche a nivel mundial presentó un crecimiento ligeramente mayor en comparación con la población humana (1.8 contra 1.4%) incluso superior en comparación con la leche bovina (1.8 contra 0.2%), lo que demuestra la importancia en cuanto a crecimiento de ésta especie.

La población de cabras a nivel mundial pasó de 456 millones de animales entre 1979 a 1981 a 609 millones en 1994, con una producción de leche de 7,78 millones de toneladas en 1979-81, que aumentó a 10.48 millones de toneladas en 1994, según el anuario de la FAO (1995), pero la FAO (2010) a nivel mundial menciona que la población de cabras es cercana a los 800 millones de cabezas con más del 90% localizada en países en desarrollo perteneciendo principalmente a pequeños productores. En cuanto a los principales países productores de leche de cabra a nivel mundial fueron: La India, Bangladesh, Sudán, Pakistán, Francia y Grecia, como se muestra en la tabla 3, los cuales produjeron el 55% de la leche de cabra a nivel mundial.

Tabla 3. Producción mundial de leche cabra (millones de toneladas). Se muestra las países con mayor producción de leche y carne de cabra (FAO, 2010).

País	Leche (MT)	País	Carne (MT)
India	4,000,000	China	1,835,872
Bangladesh	2,016,000	India	546,285
Sudan	1,456,000	Nigeria	266,640
Pakistan	682,000	Pakistan	256,500
Francia	579,000	Bangladesh	195,300
Grecia	505,523	Sudan	174,020
España	488,500	Iran	120,249
Iran	410,000	Indonesia	73,214
Somalia	393,000	Etiopía	64,655
Rusia	259,693	Somalia	59,619

MT=Miles de toneladas, Fuente: FAO, 2010

Uno de los derivados de la leche de cabra de mayor importancia es el queso. El cual es considerado un producto de alto valor nutricional y sano. Esto está asociado a la alta digestibilidad y asimilación de los productos lácteos caprinos por tener, glóbulos de grasa pequeños y mayor cantidad de vitamina A, calcio, potasio, cobre, magnesio y fósforo en comparación a la leche de vaca. La leche de cabra contiene un mayor porcentaje de ácidos grasos de cadena corta que intervienen en el sabor del queso, como butírico, caproico, cáprico y caprílico en comparación a la leche de vaca (menor al 17% contra el 5%), los cuales le confieren al queso sabores diferentes y atractivos para los consumidores, por ello, contribuyen cada vez más a mejorar la economía de productores y a incrementar el aporte de nutrientes de los consumidores. Otros productos derivados de la leche de cabra que se comercializan en menores escalas son el yogurt, helado, leche en polvo y leche pasteurizada (Duran y col, 2010).

1.1.1.5.1 Importancia de la leche de cabra en la economía en México.

En 2002, México aportó aproximadamente el 1.2 % del total de la producción mundial de leche de cabra con 131,200 toneladas métricas, ocupando el lugar 17 del mundo. Para el año de 2003 la FAO estimó una producción en México de 148,000 toneladas métricas manteniéndose constante en los últimos diez años (FAO, 2004), mientras que la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y

Alimentación (SAGARPA) informó que en el país se produjeron 150,305 toneladas métricas de leche de cabra (SAGARPA, 2004). En el periodo 2001 a 2003, esa Secretaría informó que el crecimiento en la producción de leche de cabra fue casi del 70%. Se calcula que la población de cabras en el mundo es aproximadamente de 700 millones de cabezas, de las cuales sólo el 5% se encuentra en Latinoamérica (35 millones) y aproximadamente de estas unos 9 millones en México (Vega, 2005). La FAO en 2004 estimó que la población de cabras en México no rebasaba 9.5 millones de cabezas (FAO, 2004). Así pues, la caprinocultura genera anualmente cerca de 43,000 toneladas de carne y más de 160 millones de litros de leche caprina (SAGARPA, 2010), más del 70% es producido en los sistemas extensivos de producción de las zonas áridas y semiáridas y aproximadamente el 25% es producida en los sistemas de zonas húmedas.

En México, la demanda de derivados de leche caprina, se ha incrementado paulatinamente a través del consumo de algunas variedades de quesos y confites como cajetas y dulces similares. De la producción total anual estimada, porque no existen datos oficiales, el 70 % de la leche se consume cruda o se utiliza para elaborar quesos artesanales y su comercialización es local. El 30 % restante se usa en la industria. De este porcentaje, alrededor del 20% se transforma industrialmente en queso y el 10 por ciento restante en cajeta y dulces (Vega y col., 2005).

1.1.6 Perspectivas de la producción de leche de cabra en el Mundo.

La demanda de leche de cabra se ha incrementado debido fundamentalmente por el especial interés en los países desarrollados hacia los productos de la leche de cabra, especialmente quesos y yogurt, ya que estos pueden ser consumidos por grupos de personas que presentan intolerancia a los lácteos de origen bovino. Por su composición, la leche de cabra se encuentra asociada con ciertos beneficios nutrimentales en niños, así como en el desarrollo de alimentos funcionales y productos derivados con características sensoriales demandadas por consumidores. Este alimento y sus derivados, son también una opción para dinamizar las economías regionales (Arbiza, 1996; Haenlein, 2004; Vega y León et al., 2005).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la producción mundial de leche de todas las especies en el año 2005 alcanzó las 629.2 millones de toneladas, de las

cuales 12.4 millones fueron de cabra (Tabla 4). Mientras que la FAO (2010) menciona que Norteamérica ocupa el segundo lugar en cuanto a volumen de producción por cabra después del continente europeo, la transformación de la leche se posiciona principalmente en Europa, donde a pesar de contar con un menor número de cabras en comparación con el resto de los continentes su eficiencia productiva la ubica en el primer lugar de producción mundial (tabla 5).

Tabla 4. Producción mundial de leche por especie (millones de toneladas). Se muestra el crecimiento en porcentaje de producción de leche de diferentes especies desde 1965 hasta 2005 (FAO, 2001).

Animal	Años					Crecimiento en el período (%)
	1965	1975	1985	1995	2005	
Bovino	332.5	387.7	458.0	464.4	529.8	59.3
Caprino	6.7	6.6	8.3	11.7	12.4	85.0
Ovino	5.5	5.8	7.2	7.9	8.5	54.5
Otros	0.9	1.2	1.4	1.4	1.5	66.6

FAO (2001)

Tabla 5. Producción mundial de leche cabra (millones de toneladas). Se muestra la regiones productoras del mundo además de la eficiencia de producción de cada región (FAO, 2010).

Región	Producción	cabezas	lt/cabra
Africa	2,793	51.0	41.6
Norte América	143	0.8	178.7
Sudamérica	183	5.7	32.1
Asia	6,404	82.0	78.2
Europa	2,432	9.7	250.7
Total	11,987		

1.1.1.6.1 Perspectivas de la producción de leche de cabra en México.

Existen aproximadamente 10 millones de cabras en México y se considera el rebaño más grande del continente, a pesar de que la población caprina se ha visto disminuida desde 1993. En México existen 494,000 unidades de producción caprina y, aproximadamente 1.5

millones de mexicanos la tienen como actividad productiva primaria o complementaria (Cantú et al., 1989).

Los sistemas de producción regionales son heterogéneos, con rezagos tecnológicos y de sanidad, y con poca ó nula organización e integración. Así pues, la actividad caprina genera anualmente cerca de 43,000 toneladas de carne (SAGARPA, 2010) y más de 165 millones de litros de leche caprina (Tabla 5).

Tabla 6. Comparación de la producción de leche bovina y caprina del año 2004 hasta el 2008. Se muestra la producción de leche de cabra del 2004 hasta el 2008 (INEGI, 2010).

Periodo	Leche (miles de litros)	
	Bovino	Caprino
2004	9 864 301	160 960
2005	9 854 805	160 952
2006	10 088 551	163 958
2007	10 345 982	167 423
2008	10 589 481	165 197

Las entidades federativas de México con mayor población caprina son: Puebla con el 15.4 % de la población total nacional, Oaxaca con el 12%, San Luís Potosí con el 10.5%, Guerrero con el 7.9% y Zacatecas con el 6.1%. Las cabras producen anualmente 42,859 toneladas de carne y 163.6 millones de litros de leche. Dentro de los estados más productores de leche, sobresale Coahuila con el 37.2 % del total nacional, Durango 21%, Guanajuato 16.8%, Nuevo León 9.9%, Jalisco 3.7% y Zacatecas 3.2 % (Aréchiga et al., 2008).

La demanda industrial de leche de cabra se encuentra insatisfecha, debido a que la mayor disponibilidad de la leche de cabra se ubica en los meses de julio, agosto y septiembre y decrece a partir de octubre en adelante. Esta estacionalidad tan marcada se explica por la predominancia que tienen los sistemas extensivos de nuestra región. Las industrias que demandan grandes cantidades son las fábricas de queso y las plantas acopiadoras de la industria de la cajeta y sus derivados. La mayoría de estas empresas se

encuentran trabajando por debajo de su capacidad instalada. Parte de la producción de leche de cabra se consume bronca o se utiliza de manera artesanal para elaborar quesos y dulces en la misma granja. La comercialización de estos quesos y dulces se realiza a través de intermediarios que trasladan la producción a mercados de ciudades cercanas. Las empresas “Chilchota” y “Coronado” reciben casi la totalidad de la leche de cabra que se vende a la industria. Chilchota se dedica principalmente a la producción de quesos. Coronado procesa la leche en forma de pasta y la transporta a su fábrica central ubicada en la Ciudad de San Luis Potosí, en donde es elaborada finalmente para producir cajeta y paletas entre otros productos (SAGARPA, 2010).

Sin duda, la oportunidad de diversificación en los productos de leche de cabra, como lo son el helado y el yogurt, es muy clara debido a sus propiedades nutricionales y beneficios a la salud, por lo que la convierten en una alternativa atractiva de valor agregado así como en un beneficio económico potencial y de bajo riesgo para los productores de la misma, ya que tanto el helado como el yogurt son productos de reconocida aceptación.

1.1.1.7 Problemática de adulteración de la leche.

Duran y colaboradores en el 2010 mencionan que debido a su condición de alimento perecedero y al gran riesgo de pérdida en lo económico que esto significa, la calidad de la leche se ve afectada en ciertos aspectos, entre ellos destaca el microbiológico a causa de la falta de higiene y el fisicoquímico a causa de adulteraciones, con las consiguientes consecuencias de índole nutricional, económica y legal (Galindo y col., 2006). Hazard (1997) define como adulteración algo que se le agrega a la leche y que produce cambios en el volumen y/o composición química.

Entre las adulteraciones más frecuentes que se hacen a la leche, se pueden mencionar la adición de sustancias químicas no permitidas por la legislación. Una de ellas es la adición de agua y cloruros; adición de preservativos o neutralizantes; tratamientos térmicos inadecuados que alteran la conformación nativa de las proteínas; adición de suero dulce, entre otros. Estas adulteraciones ocurren en cualquier etapa de la producción como en el transporte o en el procesamiento de la misma, y con el fin de aumentar los volúmenes de leche, por ende incrementar las ganancias.

Una de las prácticas más comunes de adulteración de leche es la adición de suero dulce, definido como el subproducto lácteo que se separa de la cuajada durante el proceso de fabricación de quesos frescos. En el suero dulce se encuentra una porción peptídica hidrofílica, de carácter ácido, llamada glicomacropéptido (GMP), la cual se mantiene en solución (Galindo y col., 2006). Debido a esta característica se han desarrollado técnicas de detección de GMP para identificar adulteración de leche con suero dulce, también conocido como suero de quesería.

1.1.1.8 Glicomacropéptido (GMP).

El GMP es una fracción peptídica e hidrofílica de la kappa-caseína, la cual mantiene la caseína micelar en una solución acuosa. El GMP se obtiene por coagulación enzimática de la leche, mediante la acción de la enzima quimosina, la cual hidroliza la kappa (κ)-caseína de la leche a nivel del enlace Fenilalanina-Metionina (105-106), produciendo dos fragmentos. La primera fracción es la porción hidrofílica, de carácter ácido, constituida por 64 aminoácidos, llamada GMP ó caseinomacropéptido (CMP), la cual se mantiene en solución en el suero. La segunda porción es hidrofóbica, esta es de carácter básico, compuesta por 105 aminoácidos, llamada paracaseína- κ , la cual queda retenida en el coágulo (Duran y col, 2010).

Existen diferencias entre el GMP de vaca y cabra, como lo menciona Silva-Hernández (2002). La composición de aminoácidos y la secuencia del GMP caprino (residuos 105-171) difiere del GMP bovino (residuos 105-169). Existen 19 substituciones y dos inserciones (valina 132, histidina 133) en la secuencia caprina comparada con la secuencia bovina (2, 3 y 14). Las diferencias marcadas entre el GMP_b y GMP_c es la presencia en la fracción de GMP_b de restos de glicina y leucina, contra la histidina que se presenta en GMP caprino. Otra diferencia se observa en los ensayos de López-Fadiño (1993) mediante un estudio de cromatografía de líquidos se obtuvieron diferentes tiempos de retención para el GMP de cabra, oveja y vaca. Donde el pico principal para el GMP bovino se presentó al 14.6 minutos mientras que en el ovino y caprino fueron de 8.9 y 9.3 minutos respectivamente. Los patrones de retención del GMP de las diferentes especies son similares ya que presenta similitudes en su secuencia de aminoácidos (Merciek, 1976).

1.1.1.8.1 Técnicas de detección del GMP.

Hasta ahora se han desarrollado varios métodos para detectar GMP como indicador de la adulteración de la leche por adición de suero. Estos métodos se diferencian por su sensibilidad y la versatilidad de los equipos empleados en el análisis.

Para la detección de GMP en productos lácteos existen diferentes metodologías, como lo son los métodos colorimétricos (De Koning y col, 1966; Fukada y col, 2004), cromatográficos (Elgar et al., 2000; Kawakami y col, 1992; Léonil y Molle, 1991; Olieman y van den Bedem, 1983; Olieman y van Riel, 1989), inmunológicos (Bitri y col, 1993; Picard, y col, 1994) y más recientemente, los métodos basados en electroforesis de zona capilar (Olieman, 1995, Cherkaoui y col, 1997; Recio, y col, 1996; Recio y col, 2000). También existen los de espectrometría de masas (De Noni & Resmini, 2005; Molle´ & Léonil, 2005) y biosensores (Haasnoot, 2005; Haasnoot y col, 2006).

Para la detección de solidos de suero dulce de leche en polvo los métodos colorimétricos no tiene la suficiente especificidad ni un adecuado límite de detección. Los métodos cromatográficos sufren de baja resolución, además co-liberan componentes como el plomo que producen resultados falsos positivos, siendo además laboriosos. La electroforesis de capilaridad también es laboriosa. La espectroscopía de masas es más específica pero es intensamente laboriosa y requiere de equipamiento y materiales caros; por lo tanto no es un método para análisis de rutina (Official Journal of the European Communities L 037, 2001).

El aislamiento del GMP mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) ha sido ampliamente utilizado para detectar la presencia del GMP en leches procesadas para el consumo humano (Galindo-Amaya y col, 2006), sin embargo presenta la desventaja de que puede dar falsos positivos, pues varias fracciones proteicas pueden tener similar peso molecular.

Muchos inmunoensayos han sido desarrollados para la detección de GMP como un indicador de la proteólisis en leche cruda o indicador de adición de leche bovina en productos de leche ovina y caprina. Uno de los mas recientes emplea tiras reactivas y se demuestra su utilidad para la detección de adición del suero de cuajo bovino en leche en polvo por encima del 1% (p/p). Sin embargo, la especificidad de las tiras reactivas es baja y

su alto costo no lo hacen comercialmente disponible (Haasnoot et al., 2006). Entre todas las técnicas usadas para la detección de GMP, destaca el inmunoensayo absorbente ligado a enzima (ELISA), el cual desde 1900 ha sido el de uso más frecuente para la detección de leche de diferentes especies.

1.1.1.8.2 Sistema ELISA.

Se trata de un sistema de ensayo sencillo, sensible, rápido, fiable y versátil para la cuantificación de antígenos y anticuerpos. Se basa en la producción de color por un anticuerpo o antígeno marcado con enzima (generalmente peróxido o fosfatasa conjugada), tras la hidrólisis de un sustrato cromogénico. Pueden detectar hasta 10 pg/ml de antígeno, en función de la afinidad de los anticuerpos disponibles y del tipo de sistema ELISA desarrollado. La concentración del producto sustrato es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que se analizó (Reen, 2004).

Una amplia gama de sistemas de ELISA utiliza técnicas de fase sólidas y se pueden clasificar de la siguiente manera. (i) Análisis directo, el anticuerpo o el antígeno se unen a una fase sólida y reacciona directamente con un conjugado de antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, respectivamente (ii) Análisis indirecto, anticuerpos específicos para un antígeno determinado (primer anticuerpo) y producidos en una determinada especie reaccionan con el antígeno para el que con específicos unido a una fase sólida. Cualquier anticuerpo unido al antígeno se detecta mediante la adición de un antisuero marcado con la enzima y específico para las Ig de la especie en la que se generó en primer anticuerpo (iii) ELISA tipo sándwich, en el formato de directo, los anticuerpos específicos para el antígeno de interés se unen a la fase sólida (anticuerpo de captura). Se añade y captura el antígeno. Esto se detecta con un anticuerpo conjugado y específico para el mismo antígeno (anticuerpo de detección). Los anticuerpos de captura y de detección pueden ser los mismos o provenir de fuentes diferentes. El antígeno debe tener por lo menos dos epítopos diferentes. En el formato indirecto, el anticuerpo de detección es de diferentes especies que los anticuerpos de captura. Un anticuerpo anti-especies marcado con enzima se une al anticuerpo de detección específica y no con el anticuerpo de captura (iv) ELISA de competencia, éstos pueden ser directos o indirectos, se utilizan dos tipos de antígenos o anticuerpos que tengan una cierta afinidad por su complementario y el que tenga mayor

afinidad será el que produzca la reacción colorimétrica. Esto implica una adición simultánea de los dos competidores (Moatsou y col, 2003).

Los factores que determinan cuál es el formato del sistema ELISA idóneo para el desarrollo de una aplicación específica son: la muestra objeto de análisis (tipo y cantidad), el tiempo disponible para efectuar cada determinación, el grado de exactitud requerido o los medios materiales disponibles (infraestructura, equipos de análisis) y especialización de los técnicos. Se ha dividido al sistema ELISA en 4 fases, la primera es la conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina). El anticuerpo conjugado con la enzima se emplea en ensayos tipo sándwich directos e indirectos; la segunda etapa la cual es la unión del antígeno o del anticuerpo a los pocillos, donde la unión se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas; después la etapa de formación de una o más capas de inmunocomplejos y por último el revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría (Gosling, 1990).

Estos métodos han sido ampliamente utilizados, ya que reducen el uso de costosos y sofisticados equipos y el tiempo de análisis y son adecuadas para análisis de rutina de un gran número de muestras.

Los métodos inmunoenzimáticos constituyen en la actualidad las técnicas inmunológicas más ampliamente utilizadas. Al marcar o conjugar los anticuerpos o los antígenos con una enzima se debe mantener la actividad de la enzima y preservar la actividad del anticuerpo o la capacidad del antígeno de unirse a su anticuerpo específico (Anguita, 1996; Crowther, 2001).

El empleo de enzimas como sustancias marcadoras en los inmunoensayos, fue introducido por Engvall y Perlmann (1971). Las enzimas presentan ciertas ventajas con respecto a otras sustancias marcadoras, como son su disponibilidad en formas altamente purificadas, su facilidad de manejo, su estabilidad a lo largo del tiempo, su bajo costo y la facilidad de su acoplamiento a las proteínas. La enzima deberá tener una alta actividad catalítica y un rango amplio de sustratos que den productos solubles o insolubles. La enzima ideal dependerá del costo, estabilidad, tamaño y facilidad de conjugación.

Las enzimas que se utilizan con mayor frecuencia en las técnicas inmunoenzimáticas son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina. Estas enzimas presentan la ventaja de que se pueden conjugar por técnicas simples y tienen varios sustratos. Los sustratos solubles que más se utilizan para la peroxidasa son: o-fenildiamina (OPD), la 2,2'-azino-(3-etil-benzotiazolina) sulfónico (ABTS) y la tetrametilbencidina (TMB). El sustrato soluble más usado para la fosfatasa alcalina es el p-nitrofenil fosfato (p-NPP) (Harlow y Lane, 1988; Crowther, 2001).

La unión específica entre la avidina o la estreptavidina con la biotina (vitamina hidrosoluble) ha sido explotada en el sistema ELISA, ya que la biotina puede acoplarse muy fácilmente a anticuerpos sin alterar sus propiedades y estos anticuerpos biotinilados pueden detectarse con estreptavidina o avidina marcada o conjugada con una enzima. La biotinilación normalmente no tiene un efecto adverso sobre los anticuerpos, y las condiciones de acoplamiento son suaves. Los anticuerpos acoplados a biotina son estables bajo condiciones normales de almacenamiento (-20° C).

La avidina, una glicoproteína básica tetramérica presente en gran abundancia en la clara de huevo, y la estreptoavidina, su equivalente sintetizado por bacterias del género *Streptomyces* tienen una alta afinidad por la biotina ($K_a 10^{14} M^{-1}$) y por tanto su unión al anticuerpo biotinilado es irreversible. Debido a que la avidina y la estreptoavidina pueden acoplarse de forma sencilla con diversas actividades enzimáticas implicadas en reacciones colorimétricas o quimio-luminiscentes, el sistema biotina/avidina o biotina/estreptoavidina es un sistema de elección como intermediario en las reacciones de detección de antígenos.

El complejo que se forma por la unión avidina (estreptoavidina)-biotina permite amplificar la sensibilidad de las reacciones inmunoenzimáticas (ELISA). En una primera fase, el pequeño tamaño molecular de la biotina favorece que por cada inmunoglobulina se unan varias moléculas de biotina. Posteriormente, al contener la avidina (estreptoavidina) varios lugares de unión con la biotina, permite que por cada inmunoglobulina conjugada a la biotina, se unan varias moléculas de avidina (estreptoavidina). Por consiguiente, se permite detectar la molécula del antígeno con una sensibilidad mayor (Harlow y Lane; 1988; Anguita, 1996; Crowther, 2001).

Los sistemas ELISA para análisis de alimentos y en específico el uso de anticuerpos policlonales para la probable detección de proteínas cuando son alteradas o desnaturalizadas se ha incrementado, ya que los anticuerpos policlonales reconocen diferentes epítopes de diferentes proteínas y que los alimentos pasan por diferentes técnicas de procesamiento lo cual cambia o destruye los epítopes de las proteínas, por lo que es aceptable y favorable el uso de anticuerpos policlonales para análisis de alimentos (Holden y col., 2005).

1.1.1.8.3 Antecedentes de estudios de adulteración en leche

Existen muchos trabajos diseñados para determinar adulteraciones de leche cruda y de quesos con leches de otras especies. En ellos se utilizan anticuerpos policlonales contra diferentes proteínas de la leche y específicas de determinadas especies. Entre ellos, se han reportado diferentes tipos de ELISAs que se usan anticuerpos policlonales contra proteínas de suero de leche:

1. García y colaboradores (1990) utilizan un ELISA indirecto para la detección y cuantificación leche bovina en leche ovina, con anticuerpos marcados con biotina en contra de proteínas de suero bovino y caprino, utilizando extravidina peroxidasa[®] para la detección y teniendo como resultado la detección de 10 a 50% de la leche bovina en la leche ovina. Esto podría ser detectado mediante una curva de referencia estándar, pero la respuesta obtenida para la leche comercial esterilizada bovina fue baja. Este mismo investigador reporta en el año 1993 con un ELISA tipo sándwich usando anticuerpos policlonales de conejo contra proteínas del suero caprino un límite de cuantificación de 0.5-100% leche caprina en leche ovina, pero como en la otra investigación la resolución del método fue bajo en leche caprina esterilizada.

2. Rodríguez (1990), en relación a sistemas ELISAs contra caseínas, se tiene reportado que desarrolló uno de tipo indirecto para la detección de 10 a 50% de leche de bovino en las mezclas de leche de ovino y bovino y en los extractos de los quesos respectivos a pH 7.2. Los anticuerpos policlonales se desarrollaron en conejo contra las caseínas de la especie bovina. En otras investigaciones (1991 y 1993) se menciona también que siguieron una estrategia similar para facilitar la detección de leche de cabras del 1-25% en leche en ovejas y en queso utilizando anticuerpos policlonales anti-caseína caprina.

3. Sauer y colaboradores (1991), reportan un inmunoensayo tipo sándwich para la detección de inmunoglobulinas G (IgG) bovina en leche de oveja y de cabra usando anticuerpos de borrego específicos para IgG bovina sin reacción de cruzamiento con IgG ovina o caprina y los mismos anticuerpos pero marcados con peroxidasa de rábano.

4. Beer y colaboradores (1996) usan un ELISA indirecto competitivo, donde se menciona que la proteólisis durante la maduración de la leche puede alterar las características antigénicas de alguno de sus componentes. Sin embargo, la reacción inmunológica de caseínas no es afectada por el tratamiento de calor, por lo tanto los métodos inmunológicos son más adecuados para ser utilizados en la detección de mezclas de leche en productos lácteos con tratamiento térmico.

5. Bitri y colaboradores (1993). En el trabajo hecho por estos investigadores utilizaron un sistema de ELISA competitivo para la detección de CMP bovino. La detección de este péptido se realizó en leche y queso hecho de mezclas de leche ovina y caprina ya sea cruda o calentada. Para esta detección de la adulteración de la leche se usaron anticuerpos policlonales (hechos en conejo) contra CMP y anticuerpos de cabra contra IgG de conejo marcados con fosfatasa alcalina. Se detectó en la muestras analizadas una adulteración de 0,25% a 64% (v / v) de leche bovina en las mezclas de leche ovina y caprina.

6. López-Fadiño y colaboradores (1993), realizan investigaciones que se hacen para identificar las diferencias entre las fracciones proteínicas de los diferentes tipos de leches, en la que se describe el aislamiento y caracterización por HPLC de los productos de hidrólisis de caseínas tratadas con cuajo de la leche de oveja. En algunos casos las especies ovinas de CMP se comparan con los péptidos derivados de cuajo de las especies bovinas y caseínas caprinas. Dentro de las especies que se analizaron la caseína bovina tiene un pico principal en 12.6 minutos, mientras que la caprina está en 9.3 y la ovina en 8.9 minutos.

7. Rolland y colaboradores (1995), muestran que la sustitución de un residuo de aminoácido en el sitio 148 del CMP afecta el reconocimiento del CMP. Sin embargo, no mostraron reconocimiento por el antisuero contra la especie bovina de caseína (α S1), sino que reconoce al conjunto de componentes menores de α S1-caseína.

8. Silva-Hernández (2002), analizó y detectó la κ -caseína del GMP del suero de leche de cabra. La detección fue mediante una electroforesis. Teniendo como resultado que

la fracción de GMP dio amplias bandas mayores y menores. La fracción de GMP mostró dos bandas que tenían un peso molecular de 31 kDa y 14.4kDa.

9. Galindo-Amaya y colaboradores (2006), es una de las diversas investigaciones a nivel mundial que han evidenciado la presencia del GMP en muestras de leche a las que se les adicionó suero de quesería, lo que hace que se considere como un indicador de adulteración de leche cruda con fines comerciales, representando un fraude para el consumidor o el industrial. Sin embargo significa un aumento en los volúmenes de ganancia para quien lo practica, ya que este suero tiene un costo muy bajo comparado con el precio de la leche. Esta práctica se hace posible debido a que el suero es un componente natural de la leche y, por lo tanto, sus propiedades coligativas son similares, lo cual hace casi imperceptible su presencia cuando éste ha sido agregado a la leche. Estos autores estandarizaron la detección de GMP como índice de adulteración de leche pasteurizada, a partir de muestras de suero dulce, suero ácido, leche cruda recién ordeñada, mezclas de suero de leche y leches pasteurizadas y en polvo comercializadas en la región. Los precipitados fueron analizados por PAGE-SDS y el GMP se evidenció como un trímero de 20,9 kDa en muestras de suero dulce y mezclas de suero leche, pero ausente en muestras de suero ácido y leche cruda fresca. Los resultados demuestran que la detección del GMP por este método en leche, representa un parámetro específico y sensible para detectar porcentajes de adulteración con suero, a niveles tan bajos como 1%, algo que no puede ser revelado con la evaluación de los parámetros físico-químicos de la leche.

10. Bremer y colaboradores (2008), realizaron un ELISA para la detección de suero de leche bovino en leche descremada en polvo y la presencia de suero de leche. La detección se realizó con un anticuerpo monoclonal contra la κ caseína bovina de acuerdo con una curva de calibración donde se utilizaron diferentes concentraciones de suero de leche (0-5.8%). El método tiene un límite de detección de 0.1% (p/p) de suero de leche. Esta sensibilidad cumple con los requerimientos de la legislación de la Unión Europea, además que es de bajo costo, fácil realización y de tiempo de ensayo corto.

11. Mientras que Chávez y colaboradores (2008), desarrollaron un nuevo método de análisis mediante inmunoblot para la detección de GMP, usando anticuerpos policlonales anti-GMP. Detectaron tres bandas en suero de leche de 45, 20 y 14 kDa en muestras de suero de quesería líquido. Estas bandas corresponden al GMP en diferentes estados de

agregación. No se observaron estas bandas proteicas en muestras de leche no adulterada, indicando que no hubo reactividad cruzada con los componentes de la leche. Este método tuvo una sensibilidad de 0.5% leche líquida. Además, estos mismos autores en el 2011 (Chavez y cols., 2011) desarrollaron un sistema ELISA sándwich para la detección y cuantificación de suero en la leche cruda utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-GMP. Las curvas de calibración se construyeron mediante el análisis de muestras que contienen diferentes concentraciones conocidas de suero de queso (0,02-20%). El método tenía un límite de detección de 0,047% (v/v) y un límite de cuantificación de 0,14% (v/v). El anticuerpo mostró una alta especificidad y no hay reacción cruzada con componentes de la leche (que no sea κ -caseína) y tuvo éxito en la detección de GMP en los productos lácteos comerciales. La relación de recuperación fue de entre 95,62% y 113,88% para todas las matrices probadas. Los coeficientes intra e inter ensayo de variación fueron <6% y <7%, respectivamente. Finalmente, se puede almacenar durante 3 meses para utilizar el kit, manteniendo al mismo tiempo su precisión y reproducibilidad.

1.1.1.8.4 Importancia de los estudios relacionados con la leche de cabra.

La cabra en los países desarrollados, últimamente ha despertado un creciente interés, debido a que su leche y los productos derivados de ésta se consideran adecuados a la nueva tendencia de consumo de alimentos sanos.

Las características benéficas que soportan el interés por el consumo de la leche de cabra son varias. Existen numerosas reacciones adversas que a veces se presentan por el consumo de leche de vaca, concretamente las alergias frente a ciertas fracciones de su proteína, así como la intolerancia a su lactosa. Estas reacciones pueden frecuentemente evitarse por el simple cambio a leche de cabra. Se había descrito, desde hace muchos años, su utilidad en los problemas de acidez, úlcera de estómago, colitis, desordenes digestivos, de hígado y vesículobiliar, asma, migraña, eczemas, postración y debilidad nerviosa general y ha resultado de gran utilidad en la nutrición de convalecientes y ancianos, dada la elevada digestibilidad de su proteína y grasa. Más recientemente, se ha demostrado experimentalmente que el consumo de dietas que contienen leche de cabra reduce el total y colesterol de bajo peso molecular (LDL-colesterol). Respecto al uso medicinal de la leche

de cabra, mencionar que en Suiza su mantequilla se emplea en pomadas destinadas a tratar la artrosis, artritis, reumatismo y neuritis.

El tema de intolerancia a la lactosa es importante, ya que en casi todos los mamíferos y en diversas razas humanas, la actividad láctica intestinal es alta al nacer, declina durante la niñez y permanece baja en la edad adulta; los valores bajos de lactasa se asocian a la intolerancia a la leche. La mayoría de los europeos y sus descendientes americanos conservan su actividad láctica intestinal en la edad adulta, ya que sólo el 15% de los europeos del norte y los de occidente son deficientes en lactasa. Por el contrario la frecuencia de individuos deficientes en esta enzima en la raza negra, indios americanos y poblaciones árabes mediterráneas, es del 70 al 90%. Sobre este particular, al hablar de intolerancia a la lactosa señala, que diversas poblaciones (africanas y asiáticas) producen menos β -galactosidasa, provocándoles problemas de mal absorción de lactosa, cursando con colitis, formación de gases intestinales y dolores abdominales.

La mayor tolerancia a la lactosa de la leche de cabra y en general su mejor digestibilidad contra la de vaca, pudieran estar debidas a la relación entre cantidad y calidad de la proteína y la naturaleza de su coagulación y en consecuencia, tasas más adecuadas de liberación de nutrientes desde el estómago al intestino, lo que optimizará la utilización digestiva de la lactosa (Boza y col, 1996).

1.2 JUSTIFICACIÓN.

Debido al incremento en la producción y en el consumo de la leche de cabra tanto en México como en el mundo, por sus propiedades biológico-químicas y benéficas para la salud, y que a menudo su principal aprovechamiento es para la producción de queso, dulces y cajetas, es necesario el desarrollo de una metodología rápida y eficaz para la detección de adulteración de leche de cabra con suero de quesería. Esto porque la adulteración de la leche con suero de quesería afecta el rendimiento de los subproductos y por lo tanto tiene implicaciones legales y económicas importantes.

1.3. HIPÓTESIS.

Que los anticuerpos policlonales anti-GMP bovino se utilicen para desarrollar dos métodos inmunológicos para detectar adulteración de leche de cabra con suero de quesería.

1.4 OBJETIVOS.

1.4.1 General.

Utilizar anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido bovino (anti-GMPb) para definir adulteración de leche de cabra con suero de quesería.

1.4.1.1 Específicos.

1. Determinar la reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente al suero de cabra.
2. Desarrollar un sistema de análisis mediante inmunoblot, para detectar y cuantificar adulteración de leche de cabra con suero de quesería:
 - a. Definir límite de detección.
 - b. Construir una curva estándar utilizando leche de cabra adulterada con concentraciones crecientes de suero de quesería
3. Desarrollar un sistema ELISA para detectar adulteración de leche de cabra con suero de quesería. Se definirá:
 - a. Concentración de anticuerpo conjugado.
 - b. Concentración de anticuerpo sin conjugar.
 - c. Concentración de enzima de revelado.
 - d. Tiempo de incubación de antígeno.
 - e. Tiempo de incubación de anticuerpo conjugado.
 - f. Tiempo de revelado.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIALES.

Material Biológico.

La leche cruda de cabra utilizada en este trabajo fue proporcionada por la Posta Zootécnica del Centro de Ciencia Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) y se utilizó en los inmunoensayos como control negativo (leche sin suero de quesería); también se usó para la extracción de GMP caprino con el que se desarrollaron los inmunoensayos.

Aparte, para los inmunoensayos se utilizaron anticuerpos policlonales anti-GMPb los cuales fueron proporcionados y obtenidos por los Departamentos de Bioquímica y Microbiología del centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Se trabajo con GMPb comercial (LACPRODAN CGMP-10 de ARLA foods (Dinamarca) como control positivo para la estandarización del inmunoblot.

MÉTODOS.

2.1 Obtención de glicomacropéptido caprino (GMPc).

- A partir de leche de cabra se obtuvo lactosuero mediante la adición 0.0001% v/v de quimosina comercial (renina).
- Al lactosuero obtenido se le adicionaron 0.5 volúmenes de ácido tricloroacético (TCA) al 24% (la concentración final de TCA en esta solución es de 8%). La adición se realizó en un periodo de 2min, se calentó y se dejó reposar durante 30 minutos (Rojas *et al*, 2009).
- La solución se filtró utilizando filtros Ahlstrom grado 94 (11 cm de diámetro). Se recuperó el filtrado.
- Se adicionaron 0.4 volúmenes de TCA al 50% al filtrado y se dejó reposando durante la noche a 4°C.
- Se recuperó el precipitado por centrifugación a 14 000 rpm por 10 minutos.
- Se resuspendió el pellet con 300µL de Tris HCl (75 mM pH 8) por cada 25 ml de suero de leche que se utilizó.

- Se neutralizó la muestra con 4 M NaOH y se aforó con agua a 500 μ L.
- Se cuantificó proteína por el método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) como estándar.

2.2 Determinación de la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente al GMPc.

a) Reactividad de los anticuerpos policlonales frente al GMPc.

La reactividad de los anticuerpos policlonales frente al GMPc se verificó mediante inmunoblot, para lo cual se desarrolló de la siguiente manera:

- Se realizó una electroforesis continua "Bio-Rad Protean III" de 19.4 μ g de GMPc en un gel de poliacrilamida al 13.5% (p/v) en condiciones reductoras la cual tiene las siguientes condiciones:
 1. Gel de Poliacrilamida al 13.5% (Gel de separación: 3.5mL de agua destilada, 2.85 ml de buffer de separación (1.5 M Trizma[®] base, 0.014 M SDS a un pH de 8.8), 4.5 ml de acrilamida (Acrilamida al 30% y Bis acrilamida al 0.8%), 50 μ L de persulfato de amonio 0.44M (APS) y 10 μ l de Tetrametilen etilen-diamina (TEMED). Para el gel concentrador: 3.5ml de agua destilada, 5 ml de buffer concentrador (0.5 M Trizma[®] Base, 0.014 M SDS a un pH de 6.8), 1.3 ml de acrilamida (Acrilamida al 30% y Bis acrilamida al 0.8%), 50 μ L de APS 0.44M y 10 μ L de TEMED.
 2. Se corrió la electroforesis durante 2 h a 80 volts (V) utilizando la siguiente solución de corrida: 0.025 M Trizma[®] base, 0.25 M Glicina, 3.5 mM SDS, pH 8.3, según Gallagher (1995). Las muestras se mezclaron con solución de carga: 2.5 ml de buffer concentrador, 4 ml de 0.35 M SDS, 2 ml de Glicerol (5% v/v), 400 μ l de 0.0058 M Azul de bromofenol y 1 ml de 0.00143 M β -mercaptoetanol.
- Las fracciones proteicas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de Polivinildieno fluorado (PVDF) (Millipore Corporation, Bedford, EUA) por dos horas a 100 mA usando para ello una solución de transferencia (0.024 M Trizma[®] base, 0.186 M glicina, 4.1 M metanol).

- Una vez hecha la transferencia de las proteínas a la membrana, se lavó esta con la solución de transferencia limpia y se puso a secar para posteriormente llevar a cabo la *inmunotinción*, la cual se describe a continuación:
- Se equilibró la membrana de PVDF en metanol al 100% y se bloqueó con una solución Tris salina (TBS) 0.5 M NaCl, 0.02 M Tris HCl con leche en polvo al 5% por 1 h en agitación a temperatura ambiente.
- La membrana se incubó 2 h en agitación a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con los anticuerpos anti-GMPb diluidos 1:500 (2.254 µg/ml) en TBS con leche en polvo 5%. Este tiempo de incubación se determinó de manera experimental.
- Se lavó la membrana 1 vez durante 5 min. con agua destilada, 2 veces durante 10 min. cada una con TBS al 0.2% Tween 20 (TTBS) y se incubó por 2 h con un anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra unido a fosfatasa alcalina (PA) (Zymed, San Francisco, EUA) diluido 1:10,000 en la solución de TBS más leche en polvo al 5%.
- Después se lavó la membrana con TTBS (2 veces durante 15 min y 5 veces por 5 min) y se incubó con 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) hasta la aparición de bandas de intensidad satisfactoria de 2 a 10 min.
- Todos los pasos de lavado e incubación se realizaron en agitación suave.
- Los marcadores de peso molecular fueron realizados con un marcador molecular de amplio rango de la marca General Electric Healthcare basado en colores, donde el color azul (225 KDa), rojo (150 KDa), verde (102 KDa), amarillo (76 KDa), púrpura (52 KDa), azul (38 KDa), naranja (31 KDa), verde (24 DKa), azul (17 KDa) y rojo (12KDa). El peso molecular de las principales bandas proteicas obtenidas se determinó interpolando el valor experimental obtenido para cada proteína en forma de RF (coeficiente entre la movilidad de la proteína y la del frente de electroforesis) en la recta de calibración obtenida con los patrones de peso molecular. La representación del peso molecular de las proteínas patrón frente a su RF obtenido se ajustó a una recta mediante regresión lineal.

b) Especificidad de los anticuerpos policlonales frente al GMPc.

Esta se determinó desarrollando inmunoblots de muestras de GMPc obtenidas de leche de cabra y muestras de leche cruda de cabra sin suero de quesería. La leche cruda se trató previamente con una solución de TCA a una concentración final de 8%, con el fin de precipitar la κ -caseína (Benítez y col. 2001), de la cual se deriva el GMP y por lo tanto puede dar reacción cruzada. Posteriormente se trató con TCA a una concentración final de 14% para concentrar y precipitar el GMP que estuviera presente. El GMP precipitado se resuspendió en solución 0.75 mM Tris HCl y se neutralizó con 5 N NaOH.

2.3 Desarrollo de un método mediante inmunoblot para detectar suero caprino.

Se desarrolló un inmunoblot para detectar suero caprino de quesería. En este se probaron dos inmunotinciones; una que utiliza anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina y otra con el anticuerpo primario unido a Extravidina peroxidasa[®] (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Esto con el fin de determinar cual era más sensible y rápida. La metodología fue la siguiente:

a) Inmunotinción con fosfatasa alcalina

Se desarrollo un inmunoblot como se describió anteriormente en el apartado 3.2

- Se incubó el blot con 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) hasta la aparición de bandas de intensidad satisfactoria (2-10 min).

b) Inmunotinción con Extravidina Peroxidasa[®]

- Se equilibró la membrana de PVDF en metanol al 100% y se bloqueó con una solución tampón NaCl 0.5 M, 0.02 M Tris HCl (TBS) con leche en polvo al 5% por 1 h en agitación a temperatura ambiente.
- La membrana se incubó 2 h en agitación a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-GMP biotinilados diluidos 1:25 (35.2 μ g/ml) en TBS con leche en polvo 5%, los cuales se obtuvieron de acuerdo al punto 2.4.1. Este tiempo de incubación se determinó de manera experimental.

- Se lavó la membrana 1 vez durante 5 min. con agua destilada, 2 veces durante 10 min. cada una con TTBS y se incubó por 1 h con Extravidina peroxidasa[®] diluido 1:100 en la solución de TBS más leche en polvo al 5%.
- Se lavó la membrana con TTBS (2 veces durante 15 min y 5 veces por 5 min) y se incubó con la 3,3-diaminobencidina hasta la aparición de bandas de intensidad satisfactoria de 2 a 5 min.

2.3.1 Determinación del límite de detección de suero caprino por inmunoblot.

Una vez desarrollado el inmunoblot con los anticuerpos policlonales anti-GMPb para detectar GMPc como indicativo de la presencia de suero de quesería, se determinó el límite de detección de suero de quesería (% v/v) de este método. Para esto se analizaron mediante inmunoblot las siguientes muestras:

Muestras de leche con concentraciones crecientes de suero de quesería (0.01, 0.05, 1, 2.5, 5, 10, 20 % v/v).

Todas las muestras a analizar se sometieron previamente a tratamiento con TCA como ya se describió anteriormente en el punto 2.1. Las bandas proteicas obtenidas se analizaron por densitometría (intensidad por milímetro cuadrado) mediante el programa QUANTITY ONE y se realizó una curva estándar con el porcentaje del suero de quesería caprino contra la intensidad por milímetro cuadrado (Int*mm²), esto con el fin de tener una referencia para determinar el porcentaje de suero de quesería caprino mediante el inmunoblot.

2.4 Desarrollo de un sistema ELISA para la detección de GMPc utilizando anticuerpos policlonales anti-GMPb.

Se desarrolló un sistema ELISA tipo sándwich utilizando el sistema de amplificación biotina-extravidina donde esta misma se encuentra conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). En esta técnica los anticuerpos anti-GMPb se fijaron a fase sólida y estos actúan como anticuerpos de captura del antígeno problema (GMP). El antígeno es reconocido por los mismos anticuerpos anti-GMP pero conjugados con la biotina y el complejo formado se detecta con un conjugado comercial de Extravidina peroxidasa[®] (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

2.4.1 Conjugación de los anticuerpos anti-GMP con la biotina.

Para poder desarrollar el sistema ELISA sándwich se necesitaba primeramente conjugar los anticuerpos anti-GMP con la biotina.

a) Conjugación de los anticuerpos anti-GMP con la biotina.

Los anticuerpos purificados anti-GMP se conjugaron con un éster de la biotina utilizando el compuesto denominado sulfo-N-hidroxi-succinimida biotinamido caproato (BAC-Sulfo-NHS). Para esto se utilizó un estuche comercial: ImmunoprobeTM Biotinylation (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Posteriormente se separaron los anticuerpos biotinilados de los que no reaccionaron con la biotina por un proceso de filtración rápida en el que se utilizó una columna de filtración en gel empaquetada con Sephadex (figura 1). La metodología se describe a continuación:

- De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se preparó una solución del éster de la biotina en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 1 mg/ml.
- Los anticuerpos purificados se disolvieron en solución salina fosfato (PBS), pH 7.2, a una concentración de 1.94 mg/ml.
- Se añadió 38 µl de solución de biotina a la del anticuerpo.
- La mezcla se incubó durante 30 min y 2 h a temperatura ambiente.

b) Separación de los anticuerpos marcados con biotina.

- Se equilibró la columna de filtración con 30 ml de PBS 0.1 M pH 7.2 (6 veces con 5 ml) antes de pasar los anticuerpos marcados.
- Se aplicó la solución de anticuerpos marcados a la columna.
- Se eluyeron los anticuerpos marcados con 9 ml de PBS (9 veces con 1 ml). Se recolectaron fracciones de 1 ml a los que se les determinó presencia de proteína por medición de absorbancia a 280 nm.
- Los anticuerpos marcados quedaron en las fracciones 3, 4 y 5.
- Se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (1976).
- Los anticuerpos conjugados purificados se conservaron a -20° C en alícuotas de 10µl hasta el momento de su utilización.



Figura 1 . Columna de Sephadex. Aquí se muestra la columna que se utiliza para lograr unir los anticuerpos policlonales anti-GMPb con la biotina.

c) Verificación de la biotilación de los anticuerpos anti-GMPb

Esta se realizó mediante inmunoblot de 20 μg de GMPb en el cual la inmunotinción se desarrolló con Extravidina Peroxidasa[®] utilizando como sustrato la 3,3-Diaminobencidina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

2.4.2 Estandarización de un sistema ELISA tipo sándwich.

Soluciones utilizadas.

1. Solución de 50 mM carbonato/ bicarbonato pH 9.6
0.1 M Na_2CO_3 , 0.035 M NaHCO_3 pH 9.6
2. Solución de citratos pH 9.6
ácido cítrico 0.05 M, 0.1 M Na_2HPO_4 pH 5.2
3. PBS pH 7.4
7.5 mM Na Cl, 0.5 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM NaH_2PO_4
4. PBS-Tween (PBST): PBS - 0.05%(v/v) Tween 20
5. Solución de bloqueo (PBST-BSA) : PBST-1% BSA
6. Sustrato (OPD)

solución citratos	1.2 ml
H_2O	4.8 ml
o-fenildiamina (OPD)	1 pastilla de 2 mg (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
H_2O_2 al 30%	6 μl

2.4.2.1 Procedimiento del sistema ELISA sándwich.

- El procedimiento general que se siguió fue:
- Se sensibilizaron las placas ELISA de 96 pocillos (COSTAR[®] Cat No 3590, Cambridge, Ma, EUA) con 50 μ l por pocillo de anticuerpos policlonales de conejo anti-GMPb en solución de carbonato/bicarbonato con un pH de 9.6. Las placas se almacenaron a 4° C toda la noche.
- Se realizaron 3 lavados de 1 min. a cada uno a los pocillos de la placa con 150 μ l de PBST.
- Se tomaron 50 μ l de antígeno o de la muestra que se analizó (GMPc obtenido de suero de quesería) disuelto en una solución de 20 μ g de GMPc.
- Se lavaron nuevamente las placas 3 veces por 1 min con PBST. y posteriormente se añadió 50 μ l por pocillo de anticuerpos anti-GMP biotinilados. Las placas se incubaron por 1 hora a 37° C en agitación.
- Se conjugaron los anticuerpos biotinilados con Extravidina peroxidasa[®] HRP (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), se añadió para esto 50 μ l por pozo de la enzima diluida 1:1,000 en PBS y se incubaron durante 1 h a 37° C con agitación.
- Se lavó nuevamente la placa, se agregó a cada pozo 50 μ l de sustrato (OPD) y se protegió de la luz (revelado).
- Se detuvo la reacción con 50 μ l por pocillo de H₂SO₄ 4 N.
- Se leen las absorbancias a 490 nm en un lector de placas de ELISA Bio-Rad Modelo iMARK[™] (figura 2).



Figura 2. Lector de ELISA iMARK™. Lector de ELISA mide la absorbancia de los 96 pocillos a una longitud de onda de 490nm.

2.4.2.2 Título de reactantes.

Las concentraciones óptimas (títulos) se refieren a la mínima concentración (mayor dilución) de reactante que resulta eficaz en un ensayo. Los reactantes deben titularse antes de utilizarlos en un inmunoensayo por que usar una concentración muy grande es un desperdicio, puede dar señales inespecíficas y puede ser poco sensible; una concentración demasiado baja obviamente produce una pérdida de sensibilidad (ICH, 2000),

Para obtener los títulos de los reactantes del sistema ELISA desarrollado, se realizaron diversos ensayos. Para el título del anticuerpo se realizaron análisis de GMPc mediante ELISA variando la concentración del anticuerpo anti-GMPb y la concentración del antígeno (GMPc). La concentración del anticuerpo marcado con biotina permaneció constante. Se revisaron las absorbancias obtenidas y se seleccionó la concentración de anticuerpo que dio una mayor absorbancia o respuesta.

Para el título del antígeno se analizaron muestras de GMPc utilizando la concentración del anticuerpo anti-GMPb que dio mejor respuesta en el ensayo anterior. Se varió la concentración del antígeno y del anticuerpo marcado. Se seleccionó la concentración de antígeno que produjo mayor respuesta.

Para el título del anticuerpo marcado con biotina se desarrolló un ELISA usando las concentraciones del anticuerpo y antígeno de los ensayos anteriores y se varía las concentraciones del anticuerpo marcado con biotina. Se seleccionó la concentración del

anticuerpo marcado que dio mejor respuesta. Las variaciones de los reactantes son las siguientes:

- a) Concentración de anticuerpo sin conjugar (Diluciones: 1:38,400 (0.0006 $\mu\text{g/ml}$ de Ab) hasta 1:50 (0.45 $\mu\text{g/ml}$ de Ab).
- b) Se probaron concentraciones de antígeno desde 0.09 $\mu\text{g/ml}$ hasta 2.5 $\mu\text{g/ml}$.
- c) Se hicieron ensayos con diferentes diluciones del anticuerpo marcado con biotina, desde 1:76,800 (0.00023 $\mu\text{g/ml}$ de Ab*) hasta 1:50 (0.352 $\mu\text{g/ml}$ del Ab*)

2.4.2.3 Optimización de los tiempos de incubación.

Se realizaron ELISAs donde se probaron diferentes tiempos de incubación. Es importante aclarar que los tiempos que se indican en el procedimiento son resultado de diferentes ensayos donde se probaron las siguientes variables:

- a) Tiempo de incubación de antígeno (1 h a 37° C y toda la noche a 4° C).
- b) Tiempo de incubación de anticuerpo conjugado (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h a 37°C).
- c) Tiempo de revelado (30 y 60 min. a temperatura ambiente).

Se hicieron tres réplicas con 16 repeticiones de cada tiempo de incubación a probar. Se manejaron los títulos anteriormente obtenidos de los reactantes, para lo cual el procedimiento que se realizó fue igual al que se indicó en el apartado 2.4.2.1 con cambios en los tiempos de incubación, donde se varió uno de los tiempos de los reactantes y los demás permanecían constantes.

A las absorbancias se les realizó análisis de varianza con el paquete estadístico Prisma 3.0.

2.4.2.4 Determinación de la sensibilidad del sistema ELISA sándwich para detección de suero de quesería caprino.

Se realizaron tres pruebas de validación del método las cuales fueron las siguientes:

- a) *Curva estándar del ELISA sándwich para detectar suero caprino.*

La curva estándar se construyó analizando leche de cabra cruda que contenían concentraciones conocidas de suero de quesería caprino (0%, 0.001%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15% y 20% v/v), el sistema ELISA se realizó como en el apartado 2.4.2.1. Cada concentración de suero caprino de quesería fue puesta a prueba en tres

ocasiones con 16 repeticiones. Las absorbancias obtenidas fueron graficadas contra el porcentaje de adulteración de suero caprino de quesería y se le aplicó una regresión lineal ajustada con el paquete estadístico MINITAB 15.

b) Limite de detección (LD) y de cuantificación (LC).

El limite de detección y cuantificación fueron calculados mediante las absorbancias de 24 muestras blanco (leche sin suero caprino de quesería), se les aplicó formula del ICH (2000) en el apartado RQ2, donde SD es la desviación estándar de las absorbancias de los blancos y S es la pendiente de la curva estándar del sistema ELISA para detección de suero caprino de quesería

$$LD = \frac{3.3 SD}{S}$$

$$LC = \frac{10 SD}{S}$$

2.4.3 Viabilidad del anticuerpo policlonal anti-GMPb

Se realizaron ELISAs en donde se sensibilizó la placa con el anticuerpo de captura. Estas placas se almacenaron a -20°C y se revelaron tras diferentes días (1, 15, 30, 45 y 60) de almacenamiento. Esto se realizó con el objetivo de tener un sistema rápido de detección ya que solo se guardarían las placas y al momento que lleguen las muestras se descongelarían y revelarían. El revelado se llevó a acabo de la misma manera que en el punto 2.4.2.1.

A las absorbancias obtenidas de cada uno de los días de almacenamiento de las placas se les realizó un análisis de varianza y una prueba TUKEY con el programa PRISMA 3.0.

III. RESULTADOS.

3.2 Reactividad de los anticuerpos policlonales frente al GMPc.

Mediante el inmunoblot se probó la reactividad de los anticuerpos anti-GMPb frente al GMPc, analizando muestras de GMP caprino purificados de sueros de quesería y GMPb comercial (como control positivo). Se detectaron dos fracciones proteínicas para cada uno de los GMPs cuyos pesos moleculares fueron de 11.26 kDa y 9.12 kDa para el caprino y de 13.92 kDa y 9.78 kDa para el bovino, tal y como se indican en la figura 3.

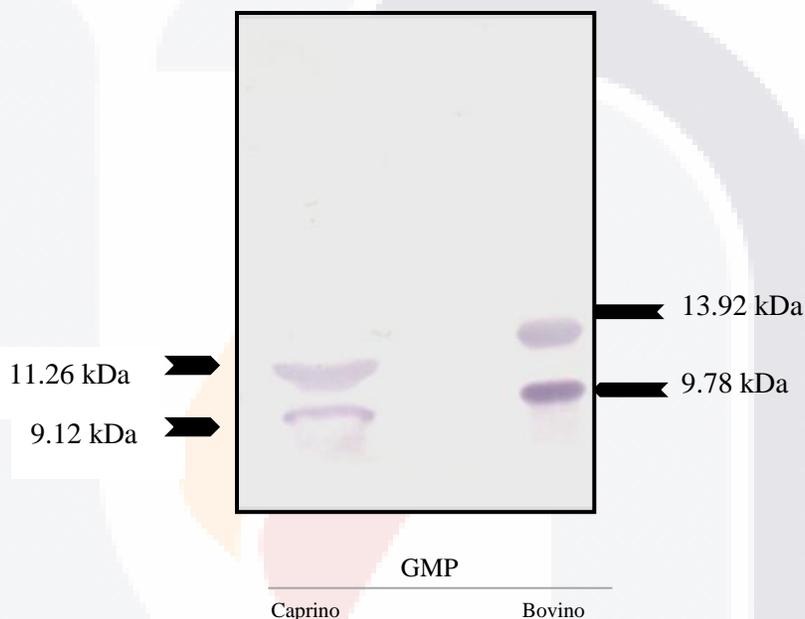


Figura 3. Inmunoblot para probar la reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente al GMPc. Se desarrolló inmunoblot de 4.9 μ g GMPc y 20 μ g de GMPb. Los anticuerpos policlonales anti-GMPb se usaron a una dilución 1:500. Para la inmunotinción se utilizó fosfatasa alcalina.

3.2.1 Especificidad de los anticuerpos policlonales frente al GMPc.

Mediante inmunoblot se comprobó la especificidad de los anticuerpos anti-GMPb frente al GMPc, mediante el análisis de muestras de leches de cabra sin adulterar, con y sin tratamiento con TCA y muestras de suero de quesería de leche de cabra. Como control se analizó una muestra de GMPb comercial. Los anticuerpos anti-GMPb detectaron en la muestra de leche de cabra sin adulterar las fracciones proteicas correspondientes a la κ -caseína en diferentes grados de glicosilación, con pesos moleculares de 13 y 8 kDa. Cuando la leche cruda se trató con TCA para eliminar la κ -caseína, el anticuerpo no mostró ninguna reactividad, demostrando la especificidad de los anticuerpos frente al GMPc y su no

reactividad frente a otro componente de la leche de cabra. Al igual que en la figura 3, en la muestra de suero caprino se obtuvieron dos fracciones proteicas de peso molecular de 11.26 kDa (3) y 9.12 kDa (4). El GMPb comercial también mostró dos fracciones proteicas pero de 13.92 kDa (1) y 9.78 kDa (2). Las dos fracciones observadas mediante el inmunoblot del GMPc comparados con el GMPb tienen pesos moleculares diferentes, tal y como se observa en las figuras 3 y 4, pero mientras que para la fracción de mayor peso la diferencia fue más notable, en la de menor peso fue mínima (figura 4).

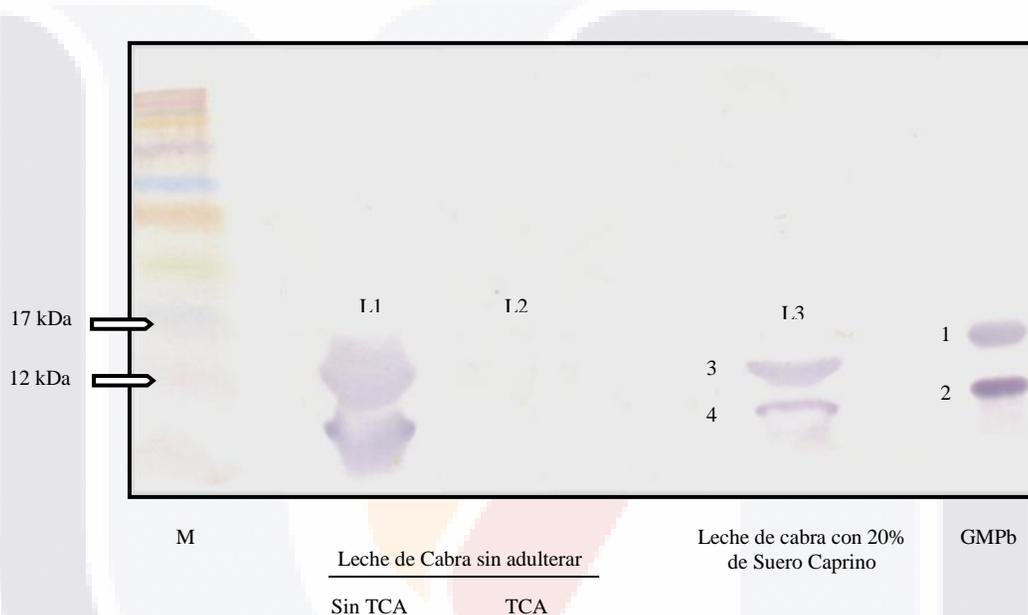


Figura 4. Inmunoblot para probar la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente al GMPc. Se desarrolló inmunoblot de L1: 20µl de leche de cabra sin suero de quesería sin tratamiento con TCA; L2: 20µl de leche de cabra sin suero de quesería con tratamiento de TCA; L3: 4.9µg de GMP obtenido de leche de cabra adicionada con 20% de suero caprino de quesería; GMPb: 20µg de GMP bovino comercial; M: marcador de peso molecular. El revelado se realizó con fosfatasa alcalina y el anticuerpo anti-GMPb se utilizó en una dilución 1:500

3.3 Desarrollo de un método mediante inmunoblot para cuantificar suero caprino de quesería.

a) Inmunotinción.

Para seleccionar el método óptimo de la inmunotinción se probaron dos sistemas de inmunoblot: anti-GMPb y anti-IgG de conejo marcado con la fosfatasa alcalina (a) y anti-GMPb biotilado y Extravidina peroxidasa® (b). Para ello se analizaron las mismas muestras de GMPc y GMPb. Se observó mayor respuesta con fosfatasa alcalina, utilizando el anti-GMPb a dilución 1:500 (2.254 µg/ml), ya que las bandas proteicas detectadas tenían

mayor intensidad (figura 5a), empleándose 8h en el desarrollo de la técnica. El revelado con Extravidina peroxidasa[®] fue más rápido (7h), no obstante los anticuerpos anti-GMPb biotinilados se tuvieron que utilizar a mayor concentración (35.2 µg/ml).

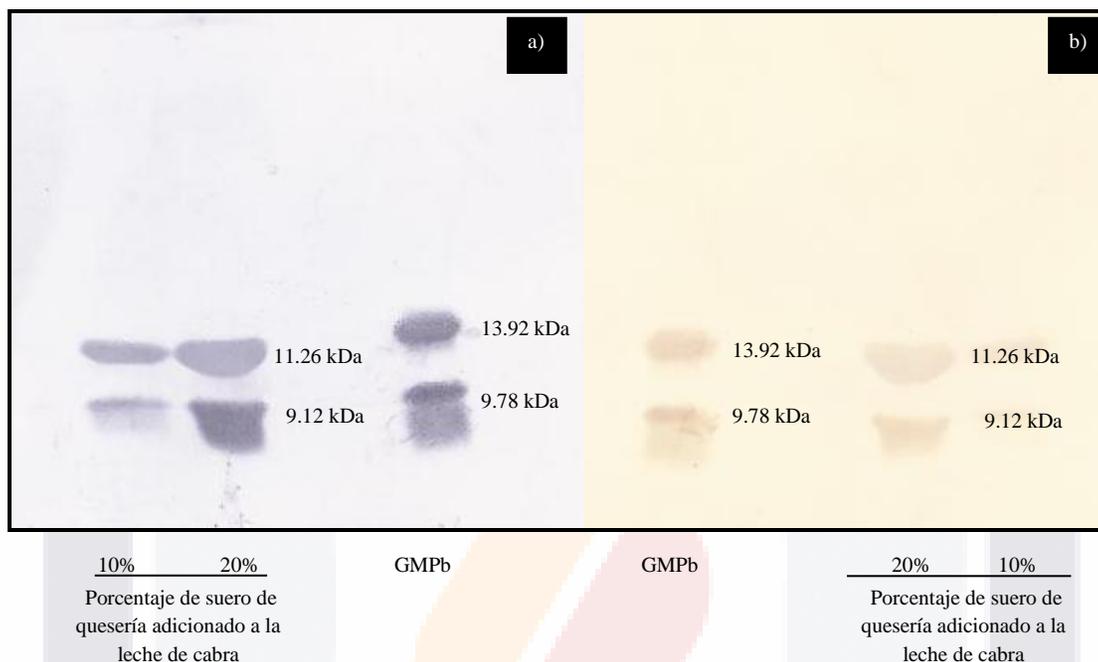


Figura 5 Inmunoblot para determinar el sistema óptimo de inmunotinción. Se desarrolló inmunoblot de 15.52 µg de GMPc obtenido de leche de cabra adicionada con 20 y 10% de suero caprino de quesería; GMPb: 20µg de GMP bovino comercial. El inmunoblot se realizó con a) dilución del anticuerpo anti-GMPb de 1:500, revelado con fosfatasa alcalina y en b) anticuerpo biotinilado (ab*) en una dilución 1:25 y la enzima Extravidina peroxidasa[®] en una dilución 1:100.

3.3.1 Determinación del límite de detección de suero de quesería.

En la figura 6 se muestra el inmublot realizado para definir el límite de detección del inmunoensayo, en el cual se analizaron muestras de leche de cabra adulteradas con volúmenes decrecientes de suero de cabra. En donde se pudo detectar hasta una concentración de 0.5% v/v de suero de quesería caprino. En todas las concentraciones de suero analizadas la banda de mayor peso fue más intensa que la de menor peso.

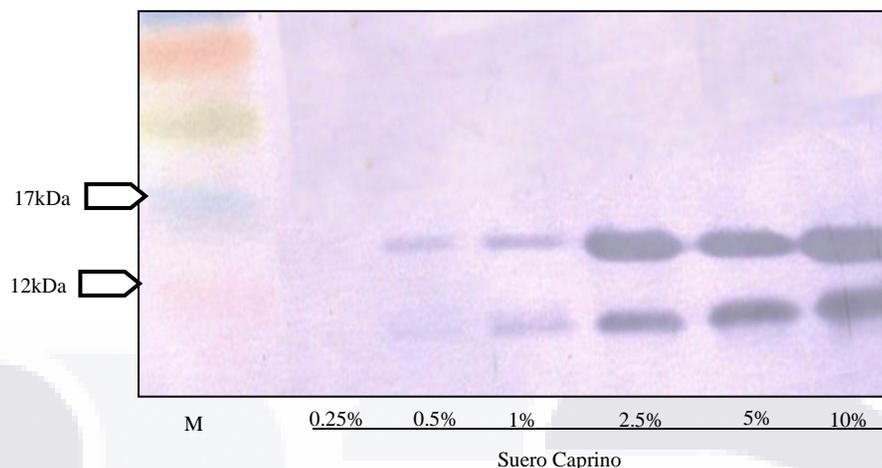


Figura 6. Inmunoblot para determinar el límite de detección del inmunoblot para detectar suero caprino de quesería. Limite de detección de suero de quesería mediante análisis de inmunoblot usando anticuerpos policlonales anti-GMPb (dilución 1:500). Se analizaron muestras de leche de cabra adulterada con concentraciones decrecientes de suero caprino de quesería; M. Marcado de peso molecular.

a) Curva estándar del inmunoblot para detección de suero de quesería.

En la figura 7 se muestra las medias de la intensidad de las bandas proteicas por milímetro cuadrado (mm^2) de las fracciones más pesadas de las muestras de leche que se les adicionó suero caprino de quesería (0%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5% y 10%). Se eligieron las bandas proteicas de mayor peso molecular ya que al analizar las muestras con concentraciones bajas de suero, las bandas de menor peso fueron visualmente difíciles de detectar. La ecuación obtenida de regresión lineal de las densidad óptica mostró una pendiente de la recta de 173.61 (m), su intersección con la eje de las Y de 1371 (b) y un coeficiente de regresión de 0.98 (R^2). Esto indica que la recta describe el fenómeno de adulteración en un 98.52%.

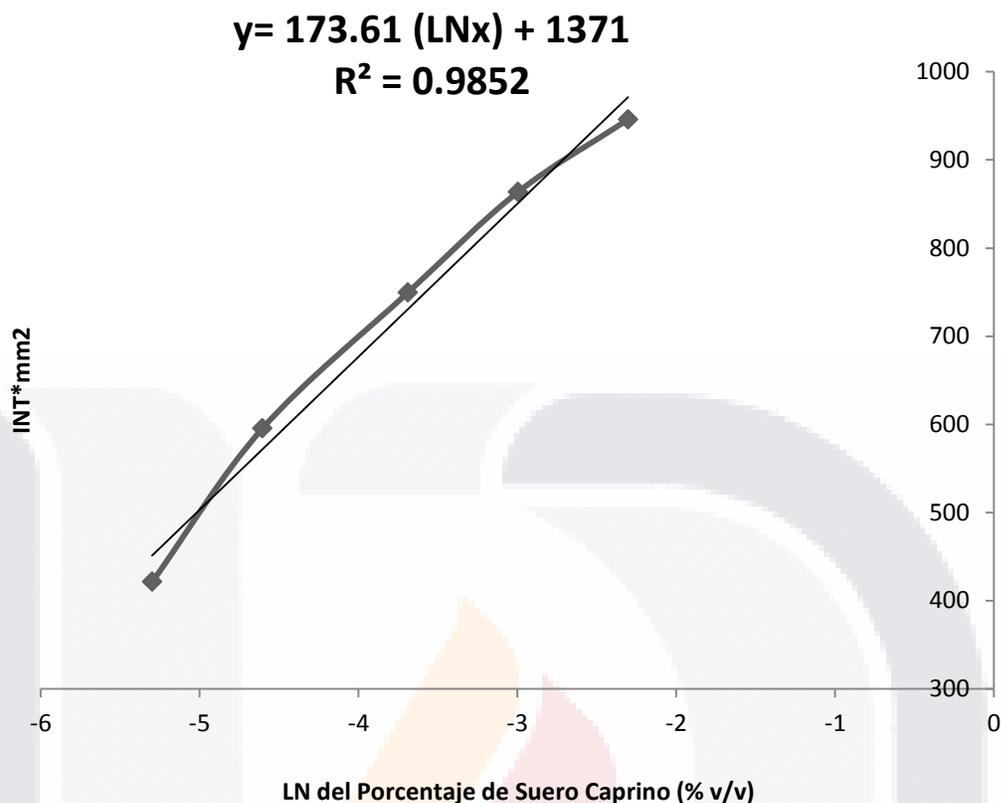


Figura 7. Curva estándar del inmunoblot para detección de suero caprino de quesería. Se muestra la ecuación de la recta además de la línea de regresión lineal en donde R^2 es el coeficiente de regresión de la recta.

3.4 Estandarización del ensayo de la prueba de ELISA.

3.4.1 Verificación de la biotilación de los anticuerpos anti-GMPb

Mediante inmunoblot se demostró que los anticuerpos anti-GMPb purificados estaban conjugados con la biotina. Para ello se analizó una muestra de GMPb comercial y se utilizaron los anticuerpos anti-GMPb biotilados para su detección. Tal y como se observa en la figura 8 se obtuvieron dos bandas proteicas de 13.92 y 9.78 kDa de peso molecular, coincidentes con las reportadas para el GMPb.



Figura 8. Inmunoblot para verificar la biotilación de los anticuerpos anti-GMPb frente. Se desarrolló inmunoblots de 20 μ g GMPb. Con anticuerpos policlonales anti-GMPb marcados con biotina a una dilución 1:25. Para el revelado se utilizó Extravidina[®] unida a la enzima peroxidasa.

3.4.2 Título de los reactantes

a) Título del anticuerpo de captura (Anti-GMPb).

Para obtener el título del anticuerpo de captura anti-GMPb se realizaron análisis de GMPc mediante ELISA variando la concentración del anticuerpo de captura y la concentración del GMPc (antígeno). La concentración del anticuerpo marcado anti-GMPb* permaneció constante y se seleccionó aquella dilución del anticuerpo de captura que dio mayor absorbancia ó respuesta. La figura 9 muestra la influencia de la concentración del anticuerpo de captura en la absorbancia del inmunoensayo. A los resultados se les realizó un ANOVA de 2 vías con el fin de determinar cuál de las dos variables (anticuerpo de captura y antígeno) tuvo mayor influencia en la respuesta. Se observó que las concentraciones del anticuerpo de captura (0.0006 μ g/ml hasta 0.45 μ g/ml) tienen una influencia sobre el modelo de 95.51%, las concentraciones de GMPc (0.09 μ g/ml hasta 2.5 μ g/ml) tuvieron una influencia de 0.36% y la interacción entre estas variantes es de 0.18%. Por este motivo se realizó una ANOVA de una vía en donde se aplica la prueba de TUKEY para observar diferencias entre las concentraciones del anticuerpo de captura, donde se obtuvo que las primeras tres diluciones son las que presentan mayor respuesta (1:50, 1:100 y 1:200), no presentando diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p > 0.05$), pero sí con las demás diluciones probadas. Se eligió la dilución 1:100 (0.2254 μ g/ml) ya que presenta la mejor respuesta con la menor concentración de anticuerpo.

Título del anticuerpo anti-GMPb

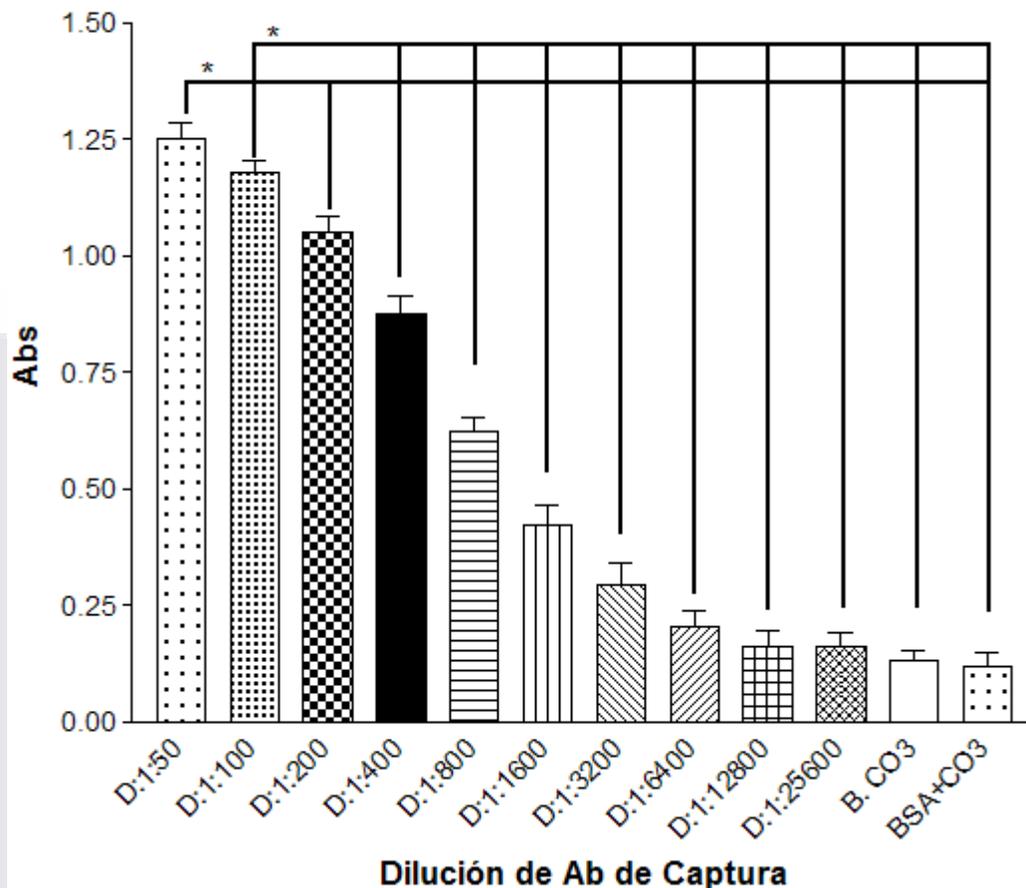


Figura 9. ELISA para determinar el título del anticuerpo de captura. Se muestran las medias \pm S.D. de las absorbancias obtenidas con las diferentes diluciones del anticuerpo de captura (Ab Anti-GMPb), donde las absorbancias que se grafican son la media de 3 repeticiones (n) con 8 replicas. $P < 0.001$ (*). Las diluciones corresponden a las siguientes concentraciones (x) de anticuerpo de captura, D:1:50 ($x=0.45 \mu\text{g/ml}$); D:1:100 ($x=0.2254 \mu\text{g/ml}$); D:1:200 ($x=0.1127 \mu\text{g/ml}$); D:1:400 ($x=0.056 \mu\text{g/ml}$); D:1:800 ($x=0.028 \mu\text{g/ml}$); D:1:1600 ($x=0.0141 \mu\text{g/ml}$); D:1:3200 ($x=0.0071 \mu\text{g/ml}$); D:1:6400 ($x=0.0035 \mu\text{g/ml}$); D:1:12800 ($x=0.0018 \mu\text{g/ml}$); D:1:25600 ($x=0.0009 \mu\text{g/ml}$); B. CO₃ es blanco solución carbonatos y BSA+BCO₃ es blanco solución carbonatos con BSA.

b) Título del antígeno (GMPc)

Para definir el título del antígeno se analizaron muestras de GMPc utilizando los anticuerpos de captura anti-GMPb a la dilución que dio mejor respuesta en el ensayo anterior ($0.2254 \mu\text{g/ml}$), y variando la concentración del antígeno y la del anticuerpo policlonal anti-GMPb conjugado con la biotina. En la figura 10 se muestran los resultados

obtenidos. Las concentraciones de 37.5 y 75 ng dieron las absorbancias mas altas, en ambos casos de 1.32. Se eligió el valor que produjo mayor absorbancia con menor concentración de antígeno, es decir 37.5 ng., los cuales se diluyeron en 50µl quedando a una concentración de 0.75 µg/ml. Ya que se tiene dos variables en el modelo, a las absorbancias se les realizó un ANOVA de 2 vías con el fin de determinar cual de las dos variables (anticuerpo biotinilado y antígeno) tiene mayor influencia en la absorbancia. El análisis arrojó que no existieron diferencias significativas con el antígeno. Además se observó que las concentraciones de GMPc (0.09 µg /ml hasta 2.5 µg/ml) tuvieron una influencia de 0.05%, mientras que la mayor influencia sobre el modelo la tuvieron las concentraciones del anticuerpo anti-GMPb*(0.00023 µg/ml hasta 352 µg/ml) con un 91.09 % del total de la interacción entre ambas variantes es de 0.34% de influencia para el modelo. Ya que el antígeno no mostró diferencias significativas entre sus medias y que no es significativo para el modelo se realizó una ANOVA de una vía para obtener las diferencias estadísticas con la prueba de TUKEY donde arrojó que no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las concentraciones del antígeno probadas. Por ello la elección se realizó tomando en cuenta la interacción con el anticuerpo biotinilado en donde la mayor respuesta se observó con la interacción con la dilución 1:2400 del anticuerpo biotinilado (0.0073 µg/ml), tal y como se muestra en la figura 11.

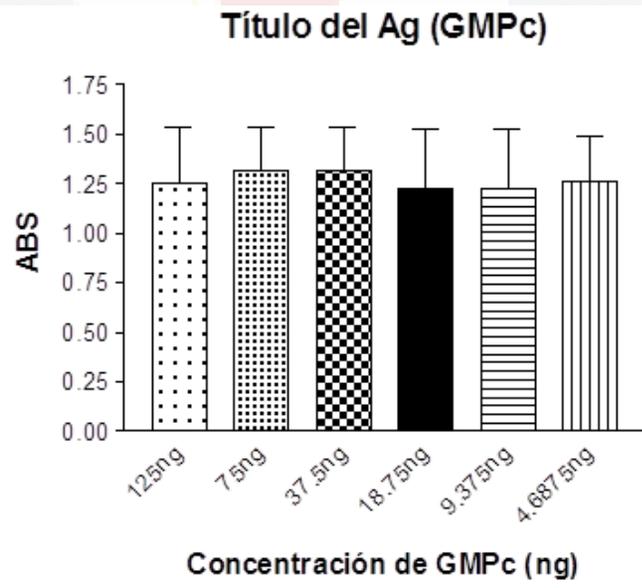


Figura 10. ELISA para determinar el título del suero caprino de quesería. Se muestran las medias ± S.D de las absorbancias obtenidas a las diferentes las concentraciones (ng) del GMPc analizadas. Se realizaron 3

repeticiones (n) con 8 replicas cada una; las medias (x) obtenidas fueron las siguientes: 125 ng (x=1.252); 75 ng (x=1.320); 37.5 ng (x=1.320); 18 ng. (x=1.229); 9.375 ng (x=1.221); 4.68 ng (x=1.263).

Título del Ab Anti-GMPb* interacción con Antígeno

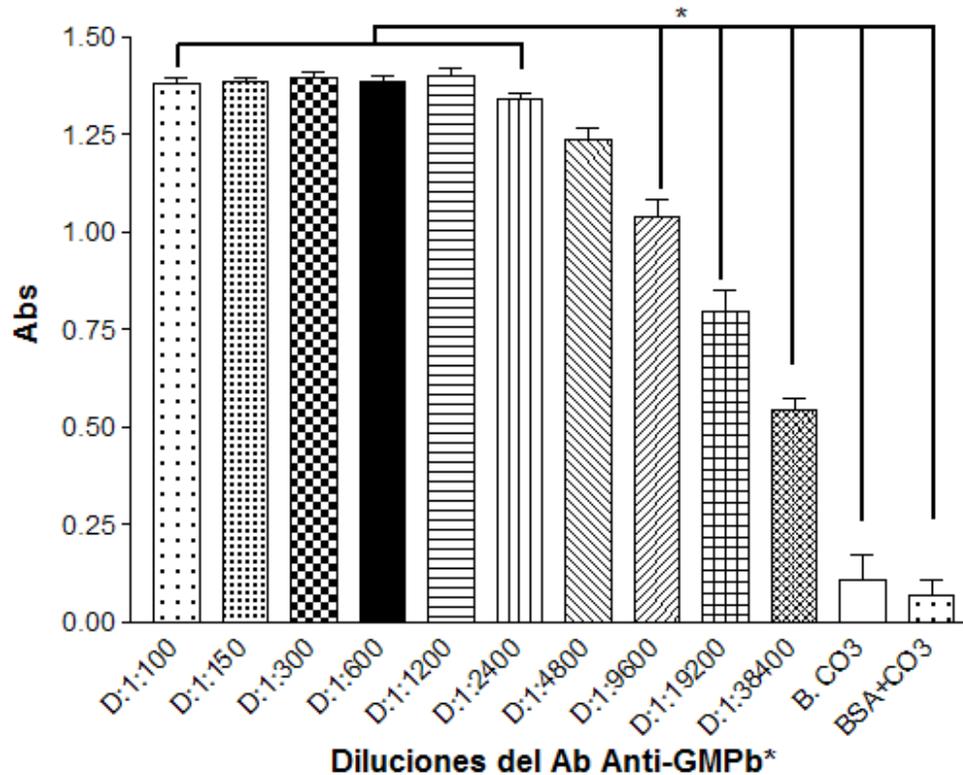


Figura 11. ELISA para determinar el título del antígeno mediante el anticuerpo conjugado. Se muestran las medias \pm S.D de las absorbancias de las diluciones del anticuerpo biotinilado (Ab anti-GMPb*), de 3 muestras (n) con 8 repeticiones donde, $P < 0.001$ (*); las diluciones corresponden a las siguientes concentraciones (x) de anticuerpo biotinilado, D:1:100 (x=0.176 $\mu\text{g/ml}$); D:1:150 (x=0.117 $\mu\text{g/ml}$); D:1:300 (x=0.058 $\mu\text{g/ml}$); D:1:600 (x=0.029 $\mu\text{g/ml}$); D:1:1200 (x=0.0014 $\mu\text{g/ml}$); D:1:2400 (x=0.0073 $\mu\text{g/ml}$); D:1:4800 (x=0.0037 $\mu\text{g/ml}$); D:1:9600 (x=0.0018 $\mu\text{g/ml}$); D:1:19200 (x=0.0009 $\mu\text{g/ml}$); D:1:38400 (x=0.00045 $\mu\text{g/ml}$); B. CO3 es Blanco Buffer Carbonatos y BSA+CO3 es Blanco Buffer Carbonatos con BSA.

c) Título del anticuerpo biotinilado (Anti-GMPb*).

Del análisis mediante ELISAs de muestras de GMPc variando la concentración del anticuerpo biotinilado anti-GMPb* y dejando constante las concentraciones de los títulos del anticuerpo de captura (anti-GMPb) y del antígeno se obtuvieron absorbancias las cuales se muestran en la figura 12. A estas absorbancias se les realizó un ANOVA de una vía con el fin de determinar diferencias entre las concentraciones del anticuerpo marcado. Se obtuvo un modelo que es altamente significativo ($P > 0.001$) y las absorbancias obtenidas

tienen una certeza del 95% y se puede diferenciar entre cada una de las variables. Teniendo esto se la aplicó la prueba de TUKEY donde se observó que la dilución 1:150 no muestra diferencias significativas ($P > 0.05$) con las diluciones 1:300 hasta 1:4800, pero todas ellas presentan diferencias significativas ($P < 0.001$) con las siguientes diluciones del Ab Anti-GMPb*. Se eligió la dilución 1:2400 (0.0073 $\mu\text{g/ml}$) ya que se tiene una menor concentración de anticuerpo con la mayor absorbancia.

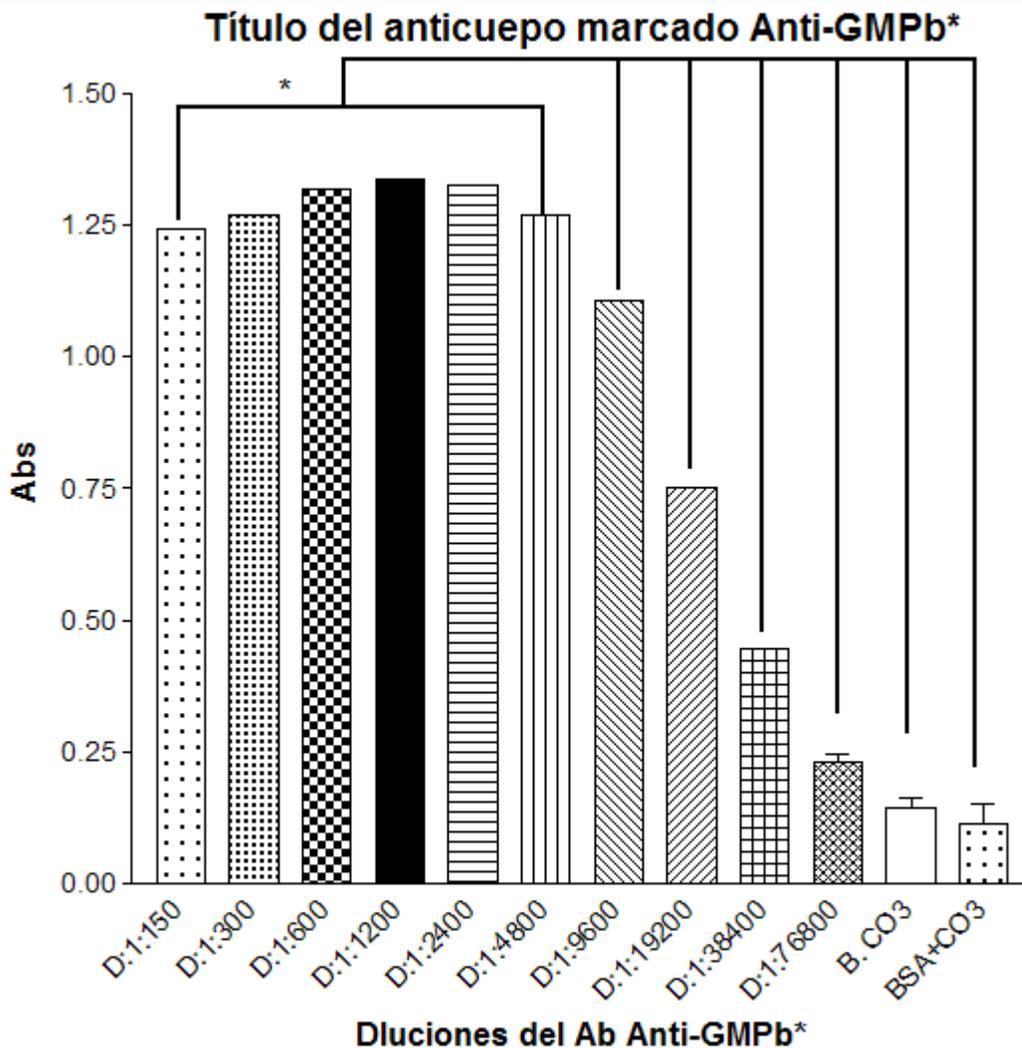


Figura 12. ELISA para determinar el título del anticuerpo biotinilado. Se muestran las medias \pm S.D de las absorbancias de las diluciones del anticuerpo biotinilado (Ab Anti-GMPb) de tres muestras (n) con 8 replicas donde: $P < 0.001$ (*). Las diluciones corresponden a las siguientes concentraciones (x) de anticuerpo biotinilado; D:1:150 ($x=0.117 \mu\text{g/ml}$); D:1:300 ($x=0.058 \mu\text{g/ml}$); D:1:600 ($x=0.029 \mu\text{g/ml}$); D:1:1200 ($x=0.014 \mu\text{g/ml}$); D:1:2400 ($x=0.0073 \mu\text{g/ml}$); D:1:4800 ($x=0.0037 \mu\text{g/ml}$); D:1:9600 ($x=0.0018 \mu\text{g/ml}$); D:1:19200 ($x=0.0009 \mu\text{g/ml}$); D:1:38400 ($x=0.00045 \mu\text{g/ml}$); D:1:76800 ($x=0.00023$); B. CO3 es Blanco Buffer Carbonatos y BSA + B. CO3 es Blanco Buffer Carbonatos con BSA.

3.4.3 Optimización de los tiempos de incubación

a) *Optimización de los tiempos de incubación del anticuerpo de captura anti-GMPb y antígeno (GMPc).*

En lo referente a los tiempos de incubación probados para el anticuerpo de captura fueron 1 h y 24 h y para el anticuerpo biotinilado 1 h, 1.5h, 2 h y 3h, variando una de las incubaciones de los reactantes y los demás reactantes manteniéndose con tiempos de incubación constante, esto para obtener una prueba rápida de detección de suero caprino de quesería. Las respuestas se analizaron con una ANOVA de una vía y una prueba TUKEY. Se observó que no existieron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tiempos de incubación del antígeno y el modelo es altamente significativo ($P<0.001$), por lo tanto se eligió 1h como tiempo máximo de incubación (figura 13) ya que se busca una sistema rápido. En donde existieron diferencias significativas fue en los tiempos de incubación del anti-GMPb biotinilado y debido a que se requiere reducir el tiempo del sistema ELISA nos enfocamos en las incubaciones de tiempo mas bajas y de mayor respuesta (1 h, 1.5 y 2h). Debido a que se requiere reducir tiempos del ensayo, se eligió la incubación de 1 h del anticuerpo anti-GMPb marcado, aunque la incubación de 1.5h presentó una absorbancia significativamente mayor ($P<0.05$)

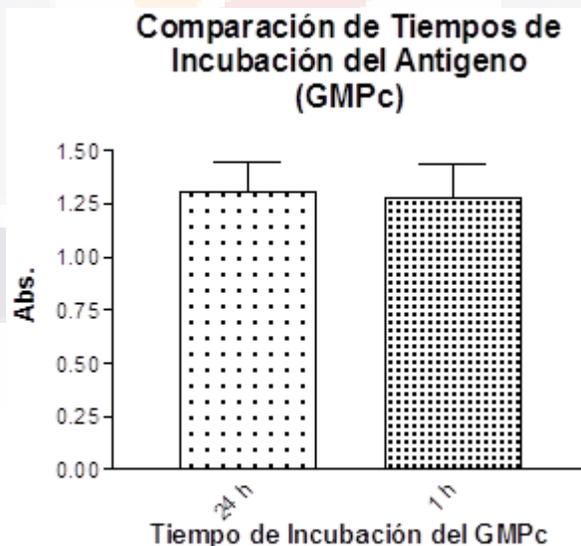


Figura 13. ELISA para obtener el tiempo de incubación del suero de quesería caprino. Se muestran las medias \pm S.D de las absorbancias correspondientes a los diferentes tiempos de incubación probados de tres muestras (n) con 8 replicas, donde: 24h; es 24 horas de incubación la cual tiene un media de absorbancia 1.305, 1 h; es 1 hora de incubación teniendo una media de su absorbancia de 1.281.

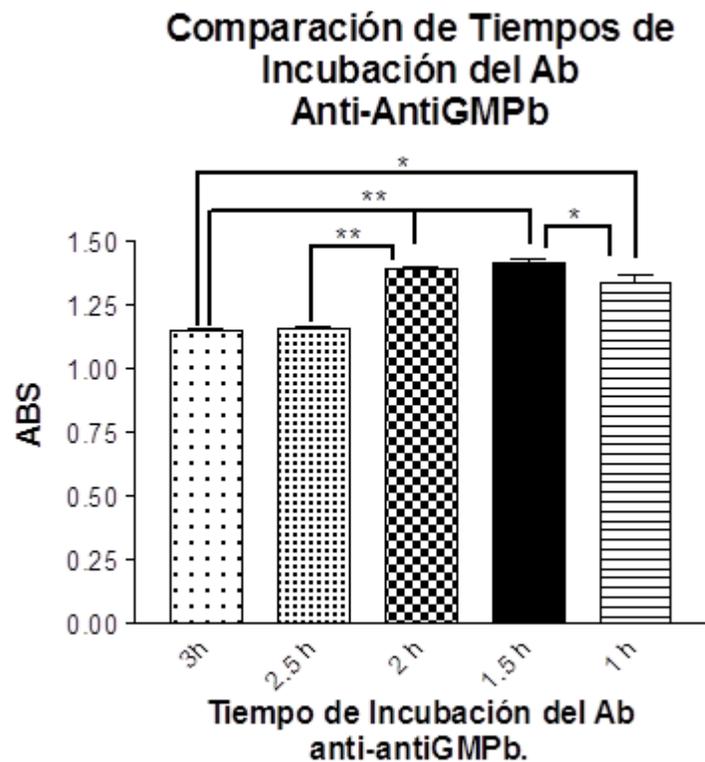


Figura 14. Variación de los tiempos de incubación del anticuerpo biotilado (anti-GMPb*) para reducción de tiempo de realización del sistema ELISA para detectar suero caprino de quesería. Se muestran las medias \pm S.D de las absorbancias obtenidas a los diferentes tiempos de incubación del ab anti-GMPb* de tres muestras (n) con 8 replicas donde: $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); 3h; es 3 horas de incubación la cual tiene un media de 1.154, 2.5 h; es 2 horas y media de incubación teniendo una media de 1.161, 2h; es 2 horas de incubación con una media de 1.391, 1.5 h; es 1 hora y media de incubación con una media de 1.417 y 1 h; es 1 hora de incubación cuya media es 1.34.

b) Optimización de los tiempos de incubación de la enzima (*Estreptoavidina peroxidasa*[®]) y sustrato (OPD).

En lo referente a los tiempos de incubación probados para el sustrato (0.5 h y 1h) y para la enzima Extravadina peroxidasa[®] (0.5h y 1.h) se dejaron constantes los tiempos óptimos anteriores de los reactantes y se variaron el de la enzima y el sustrato, esto para reducir el tiempo de realización el ensayo. Las respuestas se analizaron con una ANOVA de una vía y una prueba TUKEY para observar diferencias entre los tiempos de incubación. Para los tiempos de incubación de las combinaciones entre la enzima y el sustrato no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) y la elección de los tiempos fue de una hora para el sustrato y 1 hora para la enzima (figura 15), ya que está combinación mostró la

mayor absorbancia con la menor desviación estándar, condiciones óptimas para los sistemas ELISAs.

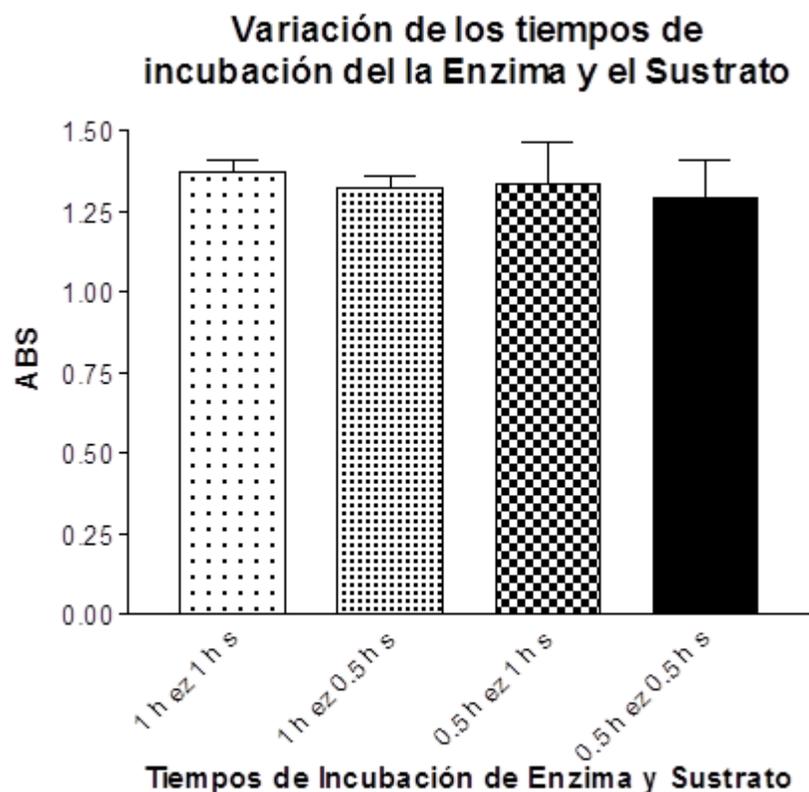


Figura 15. Variación de tiempos de incubación del sustrato y enzima del sistema ELISA para reducción de tiempo de realización del sistema ELISA para detectar suero caprino de quesería. Se muestran las medias \pm S.D de las absorbancias de los tiempos de incubación de la enzima (Extravidina peroxidasa[®]) y el sustrato OPD, donde se analizaron 3 muestras ($n=3$) de cada tiempo de ensayo, con 8 réplicas: 1 hora de enzima y 1h de sustrato (1h ez. 1h s.) teniendo un media de 1.374, 1 hora de enzima y media hora de sustrato (1h ez. 0.5 h s.) su media es de 1.323, media hora de la enzima y una hora sustrato (0.5h ez. y 1h s.) se obtuvo una media de 1.334 y media hora de la enzima y media hora del sustrato (0.5ez. y 0.5h s.) la media correspondiente es de 1.295.

3.4.4 Determinación de la sensibilidad del sistema ELISA sándwich para detección de suero caprino.

a) Curva estándar.

Con los títulos y los tiempos de incubación de los reactantes se realizaron ELISAs analizando muestras de leche cruda de cabra adicionadas con suero de quesería desde 0% a 5% v/v como estándares, esto para tener una referencia para detectar porcentajes de suero de quesería de muestras problema. Las medias (\bar{x}) de las absorbancias de los 6 puntos de la curva se muestran en la tabla 7. Mediante regresión lineal ajustada se obtuvo la ecuación de

la recta de la curva estándar la cual tiene una pendiente de 13.211(m), su intersección con el eje de las “Y” (b) fue 0.6825 y mostró un coeficiente de regresión de 1 (R^2), tal y como se observa en la figura 16. Esto indica que la recta describe al fenómeno de adulteración con suero de quesería caprino en un 100%.

Tabla 7. Absorbancias de la curva estándar del sistema ELISA para detectar adulteración con suero caprino de quesería. Se muestra en la primera columna los porcentajes de adulteración con suero caprino, en la segunda columna están las medias de cada porcentaje y la última los valores ajustados de las medias de los porcentajes de adulteración, n=3, con 8 réplicas de cada muestra

% Suero Caprino	Media de ABS	Valor Ajustado
0%	0.4903	0.6825
0.001%	0.6095	0.6826
0.10%	0.6469	0.6957
0.50%	0.786	0.7485
1%	1.085	0.8146
2.50%	1.139	1.0127
5%	1.223	1.3430

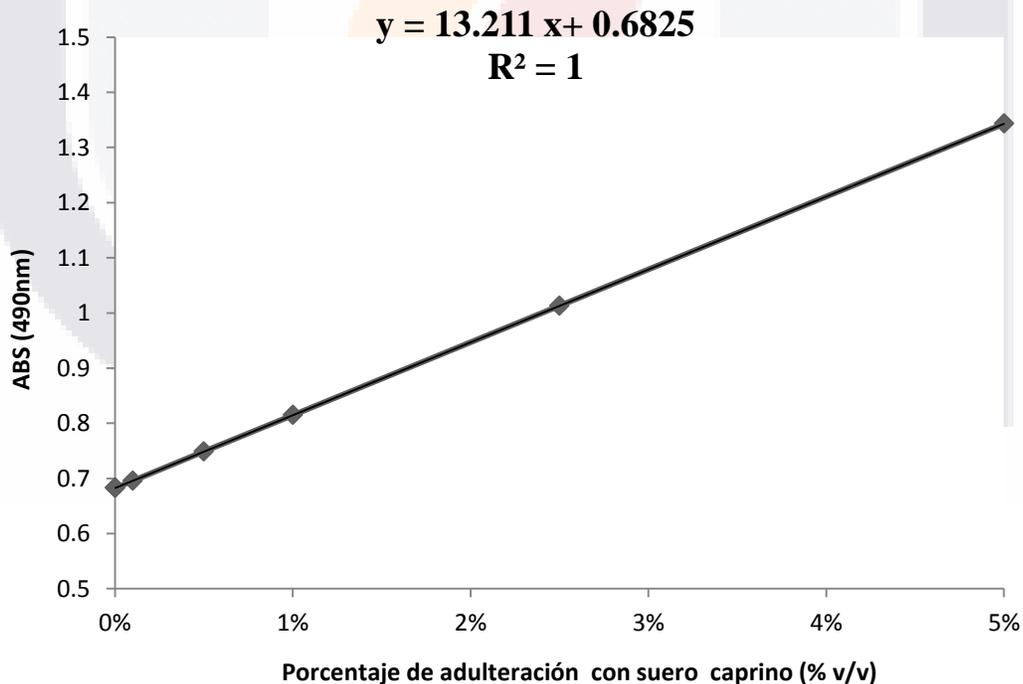


Figura 16. Curva estándar del sistema ELISA para detección de suero caprino. Se muestra la ecuación de la recta además de la línea de regresión lineal ajustada de tres muestras (n) con 8 réplicas, en donde y es la absorbancia; x: Porcentaje de adulteración con suero de quesería caprino; R^2 es el coeficiente de regresión de la recta.

b) Limite de detección (LD) y de cuantificación (LC).

Con los datos obtenidos de la curva estándar y aplicándoles las formulas del ICH se obtuvo el limite de detección que fue 0.019% (v/v) y el limite de cuantificación fue de 0.057% (v/v). Para ambos límites se analizaron 24 blancos de tres inmunoensayos diferentes. Estos resultados indican que el ensayo tiene una alta sensibilidad.

3.5 Viabilidad de anticuerpo anti-GMPb adherido a las placas de ELISA.

Para demostrar que las placas de ELISA presensibilizadas con el anticuerpo de captura anti-GMPb pueden ser guardados por largos periodos de tiempo para que estén listas para usarse como kits, se analizaron muestras de GMPc con las placas presensibilizadas que fueron guardadas a -20°C durante 1, 15, 30, 45 y 60 días. Las respuestas de cada placa a las cuales se les realizó un análisis de varianza con una prueba TUKEY se muestran en el figura 17. El modelo fue significativo con una certeza estadística del 95% y no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento ($p > 0.05$). Se demostró que las placas de ELISA presensibilizadas pueden ser almacenadas hasta 2 meses sin mostrar variaciones en la absorbancias.

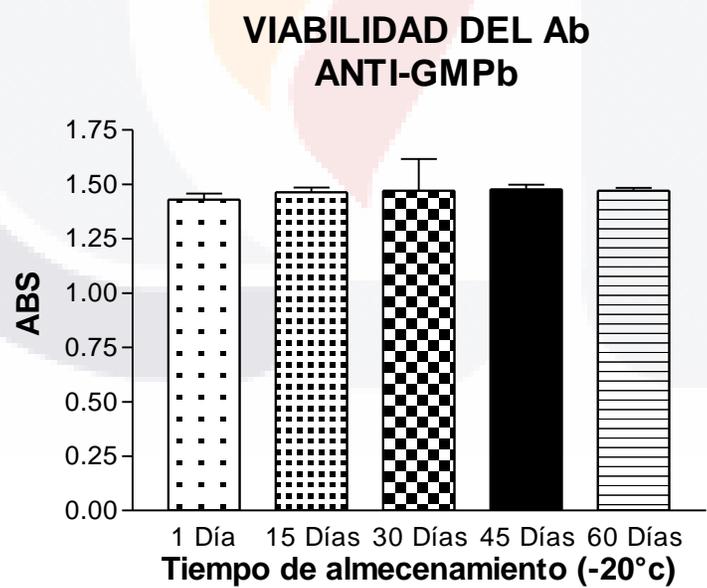


Figura 17. Efecto del almacenamiento a -20°C del anticuerpo anti-GMPb. Se muestran las medias \pm S.D de las absorbancias de ELISAS para detectar las muestras de GMPc analizadas con las placas de ELISA almacenadas durante diferentes tiempos a -20°C. Con una muestra (n) con 16 repeticiones; 1 Día: es 1 día de almacenamiento teniendo un media de 1.43; 15 Días: es 15 días de almacenamiento su media es de 1.463; 30 Días: 30 días de almacenamiento y se obtuvo una media de 1.47; 45 Días: es 45 días de almacenamiento y la media correspondiente es de 1.476 ; 60 Días: es 60 días de almacenamiento y su media es de 1.47.

IV. DISCUSIÓN.

Reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente al GMPc.

En el presente trabajo se desarrolló un inmunoblot, método sencillo y específico, para detectar GMPc como indicativo de adulteración de leche con suero de quesería caprino. El GMPc de las muestras de leche adulterada, se obtuvo mediante 2 precipitaciones proteicas sucesivas con TCA. Este inmunoensayo se desarrolló con anticuerpos policlonales anti-GMPb, los cuales se demostró que fueron reactivos frente al GMPc. Esta reactividad se debe a que el GMPc presenta una gran homología en su composición química con el GMPb, presentando solo algunos sitios de diferencia en la composición y secuencia de aminoácidos, estas diferencias se da en el número de aminoácidos; en donde el GMPc está formado por 171 aminoácidos (residuos 105-171), el GMP bovino por 169 aminoácidos (residuos 105-169), otras diferencias están en las 19 sustituciones que en su secuencia tiene diferentes el GMPc y dos inserciones lo que lo hace que tenga un total de 171 aminoácidos. (valina 132, histidina 133) en la secuencia caprina comparada con la secuencia bovina (López-Fadiño y col, 1993; Silva-Hernández y col, 2004). Esta diferencia no causa problema en la detección con uso de anticuerpos policlonales, ya que estos reconocen diferentes epítopes.

Mediante el inmunoblot los anticuerpos policlonales anti-GMPb reconocieron en las muestras de suero caprino, dos fracciones proteicas correspondientes al GMPc con pesos moleculares de 11.26 y 9.12 kDa. Al compararlas con el GMPb, con pesos moleculares de 13.92 y 9.78 kDa, se observa que hay diferencia más notable entre los peso de las fracciones proteicas mayores (diferencia de 2.66 kDa). La obtención de dos fracciones proteicas al analizar GMP coincide con las investigaciones de Silva-Hernández (2002) y Chávez Vela y colaboradores (2009). Además, estos últimos autores, usando anticuerpos policlonales anti-GMPb obtienen tres bandas correspondientes a GMPb en muestras de suero de quesería líquido, mismo resultado que reportan Galindo y colaboradores (2008). La causa de que el GMP presente varias fracciones proteicas se debe a que se puede encontrar en diferentes estados de agregación, formando monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros, esto al ser estudiado por inmunoblot (Galindo y col, 2006).

La formación de estos polímeros se debe a la interacción de tipo terciario entre moléculas de GMP y mediante la formación de puentes de hidrógeno entre sus grupos glicosídicos. Las diferencias encontradas entre los pesos moleculares del GMPc y GMPb en el inmunoblot, se pueden utilizar como un indicador para diferenciar el tipo de suero que fue utilizado para adulterar la leche. En México una de las prácticas de adulteración de leche de vaca es adulterarla con suero caprino de quesería (SQc) debido a que este tiene mayor concentración de sólidos y como consecuencia al adicionarse a la leche, ésta aumenta su contenido de sólidos que es el indicador que rige finalmente el precio de la leche. Otra ventaja del uso de anticuerpos policlonales, tal y como mencionan Holden y colaboradores (2005), es que al reconocer diferentes epítopes de las proteínas son adecuados para el análisis de alimentos ya que estos pasan por diferentes técnicas de procesamiento lo cual cambia o destruye algunos epítopes, asegurando así la detección de las mismas.

Por inmunoblot se demostró la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente a GMPc, ya que los anticuerpos no reaccionaron con ninguna otra proteína presente en las muestras de leche de cabra, a excepción de la κ -caseína, demostrando así que no hay reacción cruzada con los demás componentes proteicos de la leche de cabra. También se demostró, que el tratamiento con TCA al que se someten las muestras de leche antes de analizarlas remueve eficientemente la κ -caseína (de la cual deriva el GMP), ya que en el inmunoblot de muestras de leche (sin GMP o sin SQ) con tratamiento con TCA no se observó ninguna banda proteica, mientras que en las mismas muestras no tratadas con TCA si se observó reacción de los anticuerpos policlonales anti-GMPb apareciendo dos bandas proteicas de aproximadamente 13 y 8 kDa que corresponden al peso molecular reportado para la κ -caseína. Se sabe que la κ -caseína da origen a un desarrollo electroforético formado por varias bandas que presentan la misma composición en aminoácidos, pero con distinto grado de glicosilación, lo que les hace presentar distinta movilidad electroforética (Soulie y col, 1975).

En el inmunoblot del GMPc se probaron dos inmunotinciones, una con Extravidina peroxidasa[®] y otra con fosfatasa alcalina con el fin de obtener un inmunoensayo rápido y que detectara las proteínas con mayor intensidad. Al comparar los resultados, la inmunotinción con Extravidina peroxidasa[®] fue más rápida que la que se hizo con fosfatasa alcalina, sin embargo la primera requirió una mayor concentración de anticuerpos

policlonales anti-GMPb conjugados, además de detectar las bandas proteicas con menor intensidad. Estos resultados nos indican que la inmunotinción con fosfatasa alcalina es la más adecuada.

Sensibilidad del inmunoblot para detección de suero de quesería caprino.

En lo referente a la sensibilidad del método inmunoblot para detectar SQc en leche de cabra, no existen reportes en la literatura sobre concentraciones mínimas que se pueden detectar de SQc. Comparando con otros inmunoblots para detección de suero bovino de quesería Chávez y colaboradores (2009), detectaron 0.01% v/v de SQb, mientras que en nuestro inmunoblot para detección de SQc se obtuvo un límite de 0.5% v/v. Esto puede ser debido a que los anticuerpos anti-GMP utilizados en ambos inmunoblots se generaron utilizando el GMPb como inmunógeno y por lo tanto reconoce mayor número de epítopes en el GMPb que en el GMPc, lo que le confiere al ensayo de Chávez y col. (2009) una mayor sensibilidad.

Mediante el inmunoblot desarrollado se puede cuantificar el porcentaje de SQc con el que se adulteró una leche, esto a partir de una curva estándar que se realizó y que relaciona la intensidad obtenida de las fracciones proteicas (del blot) contra el porcentaje de SQc. Esto es importante porque además de ser reactivo y específico al GMP se puede tener una referencia de cuanto sería la adulteración de leche, y considerando que no es costoso adulterar con concentraciones pequeñas de suero, la sensibilidad obtenida es adecuada para la detección de suero caprino de quesería.

Estandarización y sensibilidad del sistema ELISA sándwich para detección de suero de quesería caprino.

Uno de los objetivos de esta investigación fue desarrollar un sistema ELISA tipo sándwich con el fin de detectar la adulteración de leche con suero de quesería caprino. Esto debido a que como lo menciona la FAO (2010) en los últimos años se ha detectado un aumento en el consumo de leche caprina y en la producción de sus derivados, surgiendo la problemática de la adulteración de la leche con suero de quesería con el fin de obtener un mayor rendimiento económico (Galindo, 2006 y Bozard, 1996). El sistema ELISA que se desarrolló para esta investigación fue el tipo sándwich debido a que esta es una de las

técnicas con mayor aplicación en el análisis de los alimentos por su gran sensibilidad (Harlow y Lane; 1988; Anguita, 1996; Crowther, 2001). La especificidad de esta técnica se atribuye a la utilización de anticuerpos específicos (anticuerpos de captura), que se adsorben a los pocillos de las placas capturando los antígenos de la muestra frente a los que se obtuvieron (Gosling, 1990). Por otro lado, la conjugación de la biotina con los anticuerpos de detección y su revelado con avidina o estreptoavidina unida a peroxidasa amplifica la respuesta inmunológica, aumentando la sensibilidad. Esto se debe a que al encontrarse las inmunoglobulinas unidas a muchas moléculas de biotina, el conjugado de estreptoavidina-peroxidasa encuentra más lugares de anclaje a los anticuerpos que cuando se utilizan los anticuerpos de detección unidos directamente a la peroxidasa (Harlow y Lane; 1988; Anguita, 1996; Crowther, 2001). Además, debido a la elevada afinidad de la avidina por la biotina su unión es más eficaz, más rápida y más estable, lo que disminuye la variabilidad interna de los ensayos. Como la estreptoavidina presenta uniones inespecíficas atribuidas a la basicidad de su moléculas, se eligió utilizar la enzima Extravidina peroxidasa[®] que es un enzima modificada que presenta una gran afinidad por la biotina y una menor inespecificidad que la estreptoavidina (<http://www.sigmaldrich.com/sigma/datasheet/e2886dat.pdf>).

Para desarrollar el sistema ELISA, fue necesario determinar el título de los anticuerpos de captura y anticuerpos conjugados con la biotina por lo cual se realizaron diversos análisis de muestras de SQc con diferentes concentraciones de anticuerpo. Las concentraciones óptimas de cada uno de los anticuerpos para el sistema fueron 0.225 µg/ml para el anticuerpo de captura y 0.0073µg/ml para el anticuerpo de detección. Una de las características de la pruebas de ELISA y que buscábamos para nuestro ensayo fue la rapidez, razón por la que se probaron diferentes tiempos de incubación con cada uno de los reactantes (anticuerpo de captura, antígeno, anticuerpo marcado, enzima y sustrato). El tiempo de realización final del ensayo fue de 4.5 horas, mostrando una ligera diferencia con lo reportado por Chávez y colaboradores (2011) en donde el tiempo de realización fue de 3 horas y media. La principal diferencia es que en nuestro sistema se necesita un mayor tiempo de contacto con el sustrato (OPD) para que se desarrolle la intensidad adecuada. Aunque no se han reportado métodos para la detección de GMPc en suero caprino de quesería, si hay reportes de métodos para detectar GMPb en suero bovino de quesería. Las

ventajas del ELISA con respecto a las otras metodologías, además de la rapidez y la sencillez, es el mayor número de muestras que se pueden procesar en un solo ensayo. La técnica de HPLC para detección de SQ o GMP (López-Fadiño y col, 1993) lleva mayor tiempo, requiere de personas especializadas, se procesa una muestra a la vez y se requiere muestras de alta pureza, es decir muestras con baja concentración de sólidos (Haasnoot y col., 2006). Con técnicas electroforéticas se detecta el GMP por la presencia de bandas proteicas con pesos moleculares coincidentes a los reportados para dicho GMP, sin embargo se sabe que en la congelación de muestras con contenido proteico se puede producir proteólisis y generación de péptidos de pesos moleculares semejantes al GMP que pudieran dar falsos positivos (Galindo-Amaya y col, 2006).

El LD es la menor cantidad de suero líquido caprino que puede detectarse en una muestra con el sistema ELISA desarrollado. Para obtenerlo se analizaron 24 blancos (leche sin SQc) de tres curvas estándar de detección de suero caprino de quesería. El LD del SQc mediante el sistema ELISA utilizando anticuerpos policlonales anti-GMPb fue de 0.019% v/v, mejor que el que se obtuvo mediante el inmunoblot que se desarrolló en este trabajo, para el que fue de 0.5% v/v. Esto indica que la técnica de ELISA es más sensible que la del inmunoblot, pero la sensibilidad de ambos métodos es adecuada para detectar adulteración de leche con suero. Demostrando que se podría usar la primera como una prueba preliminar y la segunda para saber con mayor eficacia la cantidad de suero caprino adulterante. Comparado con Galindo-Amaya y col. (2008) en el cual se utilizó HPLC y detectaron 1% (v/v) de suero de quesería y el de Bremer y col. (2008), mediante un sistema ELISA por inhibición y utilizando anticuerpos monoclonales anti-κ-caseína, tuvieron un LD de 0.1% (p/p) de suero en polvo en leche deshidratada. El sistema ELISA diseñado en este trabajo para detección de SQc tiene una mayor sensibilidad. La principal ventaja del ELISA frente al HPLC es que no genera falsos positivos, mientras que en el HPLC procesos de proteólisis desarrollados durante la congelación de la muestra libera péptidos con tiempos de retención semejantes al GMP. Además las muestras que se analicen por HPLC, deben de tener una baja concentración de sólidos. Si comparamos con lo realizado por Chávez y colaboradores (2011) donde el LD fue de 0.047 % v/v, obtenemos un mejor LD en este trabajo (0.019% v/v). Esto podría deberse a que en el presente trabajo se utilizaron tanto los anticuerpos de captura como los biotinilados a concentraciones menores que en el

sistema ELISA de Chávez y col. (2011), por lo que se evitaron posibles impedimentos estéricos entre las moléculas de anticuerpo mejorando la posibilidad de contacto con los epítopes del GMPc. En cuanto al LQ es la mínima concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud, bajo las condiciones experimentales establecidas. Este es un término cuantitativo (menor cantidad medible), mientras que el LD es cualitativo (menor cantidad detectable). El LQ para el sistema ELISA desarrollado fue de 0.057%(v/v) de suero de quesería, lo que significa que a partir de esta concentración se puede discernir con seguridad si una muestra tiene o no, suero de quesería (Ochoa, 2004). El LC de nuestro ensayo resultó más bajo que en del ELISA realizado por Chávez (2011), que es de 0.14 % (v/v), esto también se puede explicar por la concentración del anticuerpo utilizadas.

Además el kit de ELISA tiene una viabilidad de 60 días. Lo antes mencionado tiene una confianza estadística del 95%. Esto nos indica que en nuestro inmunoensayo, los valores o respuestas obtenidas tras el análisis de una muestra de leche problema son confiables utilizando placas pre-sensibilizadas con los anticuerpos de captura 60 días antes de realizar el análisis y almacenadas en congelación. Por todo lo mencionado, los análisis estadísticos y pruebas de comparación de medias, se consiguió establecer el inmunoensayo como un kit de detección en el que la reproducibilidad del inmunoensayo no tiene variación de los datos. Los sistemas de inmunoensayo desarrollados en este trabajo tienen ventajas sobre otras metodologías sensibles como el HPLC (López-Fadiño y col 1993 y Galindo y col 2006) o el ELISA con anticuerpo monoclonales (Bremer, 2006). Respecto al primer método la ventaja es la ausencia de reactividad cruzada, ya que el HPLC puede dar falsos positivos porque existen sustancias como el plomo que tienen el mismo tiempo de retención que las agregaciones de GMP. En relación al segundo es que el uso de anticuerpos policlonales abre el rango de detección del GMP al poder reconocer diferentes epítopes; debido a que los alimentos y en especial los derivados de la leche sufren diferentes procedimientos, tales como el calentamiento o enfriamiento, que pueden modificar sus epítopes, lo que hace que un anticuerpo monoclonal pierda su capacidad de detección.

CONCLUSIÓN.

En la presente investigación se desarrollaron dos métodos mediante inmunoensayos para detectar adulteración de leche de cabra con suero de quesería caprino.

1. El método inmunoblot detecta dos bandas proteicas para el GMPc de 11.26 y 9.12 kDa diferentes a las del GMPb. Además presenta una sensibilidad de 0.5 % v/v y un tiempo de desarrollo de 8 horas.
2. El método ELISA sándwich desarrollado frente a GMPc, se estableció como un kit de detección sensible con un LD de 0.019% (v/v) y un LQ de 0.057% (v/v). El tiempo de realización del ELISA fue de 4.5 horas y el método fue reproducible utilizando placas sensibilizadas 2 meses antes
3. Los inmunoensayos desarrollados en el presente trabajo son una buena alternativa para aplicarse en el análisis de leche en que se rigen por normas y/o en las industrias lácteas para control de calidad de sus productos.

GLOSARIO.

Cuajo

(Del lat. coagulum). Fermento de la mucosa del estómago de los mamíferos en el período de lactancia, que coagula la caseína de la leche (Real academia española).

Conjugación de reactantes

El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno. Dicha unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima ha de producirse durante un determinado periodo de tiempo en aras de producir una solución coloreada y que pueda ser valorada visualmente o cuantificada por medio de un espectrofotómetro (normalmente a una longitud de onda de 414 nm). Si no transcurre el tiempo adecuado para que se de la reacción, no se evidenciará ningún color, interpretándose este resultado como un falso negativo, disminuyendo la sensibilidad de la técnica (Crowther, 2001).

BIBLIOGRAFÍA.

- Alcázar M. C., Rosas J., Jaramillo A. C. y Peña S. Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. *Veterinaria México*. 2000; 37(3): 217-222.
- Alférez M. J. M., Barrionuevo M., López-Aliaga I., Sanz-Sampelayo M. R., Lisbona F., Robles J. C. y Campos M. S. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *Journal of Dairy Research*. 2001; 68: 451-461.
- Anguita A. Tesis doctoral: Detección de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos madurados de oveja y cabra, utilizando anticuerpos monoclonales, policlonales y técnicas inmunoenzimática (ELISA). Madrid España. 1996; 13-53.
- Arbiza A. S. La leche de cabra. Sus propiedades nutritivas y farmacológicas. *Correo del Maestro*: 1996; 3: 1-5.
- Aréchiga C.F., Aguilera C.A., Rincón J.I., Méndez de Lara R.M., Bañuelos S. y Meza-Herrera V.R. Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2008; 9 (1): 1-14.
- Bremer M., A. Kemmers-Voncken E. Boers R. Frankhuizen y W. Haasnoot. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. *International Dairy Journal*. 2008; 18: 294-302.
- Beer M., Krause I., Stapf M. , Schwarzer C. y Klostermeyer H. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of native and heatdenatured bovine b-lactoglobulin in ewes' and goats' milk cheese. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1996; 203: 21-26.
- Bitri L., Rolland M. P. y Besançon P. Immunological detection of bovine caseinomacropéptide in ovine and caprine dairy products. *Milchwissenschaft*. 1993; 48: 367-370.
- Boza J. y Sanz-Sampelayo M. R. Antecedentes históricos de la cabra en Andalucía. *Jábega*,. 1984; 4569-75.

- CantúR. E., Colín N. M., Contreras M., García J. Estudios sobre la estacionalidad reproductiva de los machos caprinos de las razas Saanen y Alpina. En: Memorias de la V Reunión Nacional sobre Caprino cultura. Zacatecas, México. 1989:67.
- Chandan R., Attaie R y Sahani K. M. Nutritional aspects of goat milk and its producis Proa V Int Conference on Goat. Nueva Delhi. 1992: 869-1890.
- CherkaouiS., Doumenc N., Tachon P., Neeser J. R. y Veuthey J. L. Development of a capillary zone electrophoresis method for caseinoglycomacropptide determination. Journal of Chromatography. 1997; A790: 195–205.
- Chávez-Vela N. A., Salinas-Miralles E., J. Jauregui, L. A. Palomares. y F. Bon-Rosas. Desarrollo de un método inmuno blot para detectar glucomacropéptido (GMP) como índice de adulteración de leche de vaca con suero de quesería Investigación y Ciencia U.A.A. México. enero-abril, 2009;43: 16-20.
- Chávez-Vela N. A., Salinas-Miralles E., Palomares L. A., Macías K. E y Jiménez M. Highly sensitive sandwich ELISA for the determination of glycomacropptide to detect liquid whey in raw milk. Dairy Science & Technology. 2011; 92: 121-132.
- Crowther J. R. ELISA, theory and practice. In Methods in Molecular Biology. New Jersey: Humana Press Inc. 2001; 42: 35-50.
- De Koning P. J., Eisses J. y De Vries H. A method for the detection of small percentages of whey powder in milk powder. Netherlands Milk and Dairy Journal. 1966; 20: 204–212.
- De Noni I. y Resmini P. Identification of rennet-whey solids in “traditional butter” by means of HPLC/ESI-MS of non-glycosilated caseinomacropptide A. Food Chemistry. 2005; 93: 65–72.
- Duran L., Sánchez C., Palmero J., García T. y Sánchez E. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. Zootecnia Trop. Venezuela. 2010; 28(4): 467-475.
- ElgarD. F., NorrisC. S., Ayers, J. S., Pritchard, M. , Otter D. E. y Palmano, K. P. Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. Journal of Chromatography. 2000; A 878: 183–196.

- F.A.O. Yearbook production Roma. 1995; 48: 218-219.
- FAO. Production Yearbook 1999. Food & Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Series: Rome, Italy. 2001; 53 (156):251.
- F.A.O. Statistical data base. <http://apps.fao.org>. 2004.
- F.A.O. Statistical data base. <http://apps.fao.org>. 2010.
- Fukada S. P., Roig S. M. y Prata L. F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *Lait*, 2004; 84: 501–512.
- Galindo-Amaya L. M., Valbuena-Colmenares E. y Rojas-Villaruel E. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por page-sds como índice de adulteración de leche. *FCV-LUZ*. 2006; 16(3): 308–314.
- Ganong W. F. 1994. *Fisiología Médica*. 14ta. Manual Moderno. México. 507pp.
- García T., Martín R., Rodríguez E., Morales P., Hernández P. y Sanz B. Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Dairy Science*. 1990; 73: 1489-1493.
- García T., Martín R., Morales P., González I., Sanz B. y Hernández P. Sandwich ELISA for detection of caprine milk in ovine milk. *Milchwissenschaft*. 1993; 48: 563–566.
- Gosling J. P. A decade of development in immunoassay methodology. *Clinical Chemistry*. 1990; 36(8):1408-1427.
- Haasnoot W. Detection of adulterants in milk products. *Biacore Journal*. 2005; 5: 12–15.
- Haasnoot W., Marchesini G. R. y Koopal K. Spreeta based biosensor immunoassays to detect fraudulent adulteration in milk and milk powder. *Journal of the AOAC International*. 2006; 89: 849–855.
- Haenlein G. F. W. Role of goat meat and milk in human nutrition. En: *Proc. V Int. Conf. on Goats*. Nueva Delhi. 1992: 575-580.
- Haenlein G. F. W. y Caccese R. Goat milk versus cow milk. En: *Extensión Goat Handbook Faet Sheet E-I Extensión Service, USDA Washington*. 1984.
- Haenlein G. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*: 2004; 51: 155–163.

- Harlow E. y Lane D. *Antibodies a laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. EUA. 1988; 726.
- Hazard T. Variación de la composición de la leche. In: *Curso taller Calidad de Leche e Interpretación de Resultados de Laboratorio*. Serie Carillanca. Temuco, Chile. 1997; 62:33- 44.
- Holden L., Fæste C., Egaas E. Quantitative Sandwich ELISA for determination of Lupine (*Lupinus spp.*) in foods. *J Agric Food Chem*. 2005; 53:5866-5871.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2. *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)*. <http://www.tga.gov.au/docs/pdf/tgmp0201g.pdf>. 2000.
- INEGI. www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas. 2010.
- Jandal J. M. Comparative aspects of goat and sheep milk *Small Rumin Res*. 1996; 22: 177-185.
- Juárez M., Ramos M. y Martín Hernández C. *Quesos españoles de leche de cabra FESLAC*, Madrid. 1991.
- Kawakami H., Kawasaki Y., Dosako S., Tanimoto M. y Nakajima I. Determination of k-casein glycomacropptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic acid pretreatment. *Milchwissenschaft*. 1992; 47: 688–693.
- Kim Ha J. y Linsay R. C. Contributions of cow, sheep and goat milk to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses. *J Dairy sci*. 1991; 74: 3267-3274.
- Le Jaouen. *Milking and the Technology of Milk and Milk Products*. In *Goat Production*. Gall C. Academic Press, London, 1981: 345-376.
- López-Fadiño R., Acedo M. I. y Ramos M. Comparative study by HPLC of caseinomacropptides from cows, ewes and goats milk. *Journal of Dairy Jiesearch Gran Bretaña* .1993; 60: 117-121.
- Moatsu G., Anifantakis E. Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *Dairy technology*. 2003; 56(3): 133-138.
- Mollé D. y Leónil J. Quantitative determination of bovine k-casein macropptide in dairy products by liquid chromatography/ electrospray coupled to mass

spectrometry (LC-ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). *International Dairy Journal*. 2005; 15: 419–428.

- Merciek J. C., Chobbrt J.M. y Addeo F. Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropptides from several species. *FEBS Letters* 1976b; 72: 208-214.
- Ochoa R. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Finlay Ediciones. La Habana Cuba. 2004:55-78.
- Olieman C. y van den Bedem J. W. A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 1983; 37: 27–36.
- Olieman C. y van Riel J. A. M. Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 1989; 43: 171–184.
- Ohiokpehai O. Processed Food Products and Nutrient Composition of Goat Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*: 2003; 2 (2): 68-71.
- Picard C., Plard, I., Rongdaux-Gaida D. y Collin, J. C. Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. *Journal of Dairy Research*. 1994; 61: 395–404.
- Renner E., Schaafsma, G. y Scott K. J. Micronutrients in milk. In: *Micronutrients in Milk and Milk-Based Products* E. Renner. Elsevier Appl. Science Nueva York. 1989: 1-70.
- Reen D. J. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In *Basic Protein and Peptide Protocols*, Walker J M, New Jersey: Humana Press Inc. 1994: 461–466.
- Recio I., García-Risco M. R., López-Fandiño R., Olano, A. y Ramos, M. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*. 2000; 10: 333–338.
- Recio I., López-Fandiño R., Olano A., Olieman C. y Ramos M. Study of the formation of caseinomacropptides in stored ultra-high-temperature-treated milk by

capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996; 44: 3845–3848.

- Rodríguez E., Martín R., García T., Hernández P. E. y Sanz B. Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Dairy Research*. 1990; 57: 197-205.
- Rodríguez E., Martín R., García T., Azcona J. I., Sanz B. y Hernández P. Indirect ELISA for detection of goats' milk in ewes' milk and cheese. *International Journal of Food Science and Technology*. 1991; 26: 457-465.
- Rodríguez E., Martín R., García T., González I., Morales P., Sanz B. y Hernández P. E. Detection of cows' milk in ewes' milk cheese by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1993; 61: 175–180.
- Rodríguez E., Martín R., García T., Morales P., González I., Sanz B. y Hernández P. E. Sandwich ELISA for detection of goats' milk in ewes' milk and cheese. *Food and Agricultural Immunology*. 1994; 6: 105–111.
- Rojas E., Valbuena E., Torres G., Gracia A., y Galindo-Amaya L. M. FCV-LUZ. 2009; 19(3):295-309.
- Rolland M. P., Bitri L. y Besançon P. Monospecificity of the antibodies to bovine as1-casein fragment 140-149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products. *Journal of Dairy Research*. 1995; 62: 83-88.
- SAGARPA. www.SAGARPA.gob.mx/ganaderito/cuantleca.htm 2004.
- SAGARPA. www.oeidrusportal.gob.mx/repoAvance_siap/pecResumen.jsp. 2010.
- Saini A .L. y Gill R.S. Goat milk: An attractive alternate. *Indian Dairyman*, 1991;42: 562-564.
- Silva- Hernández E. R., T. Nanakano , y Ozimer L. Isolation and Analysis of K-Casein Glycomacropetide from Goat Sweet Whey. *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50: 2034-2038.
- Soulier S., Ribadeau-Dumas B y Denamur R. Purification des caséines χ de brebis. *European Journal of Biochemistry*. 1975; 50 (2):442-445.

- Van Riel J. y Olieman C. Determination of caseinomacropéptido with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis*. 1995; 16: 529–533.
- Vega-León S., Gutiérrez T. R., Díaz G. G., González L. Ma. M., Ramírez A. A., Salas M. J. H., Coronado H. M. y González C. C. México. CARNILAC. Propiedades de leche de cabra. Alfa editores. 2005. <http://www.alfaitores.com/carnilac/Octubre%20Noviembre%2005/TECNOLOGIA%20Leche%20de%20cabra.htm>.
- Vega-León S., Gutiérrez-Tolentino R., Díaz-González G., González López M. M., Ramírez-Ayala A., Salas-Morales J. H., Coronado-Herrera M. y González Cabrera C. 2010. Leche de cabra: producción, composición y aptitud industrial. <http://www.alfaeditores.com/carnilac/Octubre%20Noviembre%2005/TECNOLOGIA%20Leche%20de%20cabra.htm>.