

Salazones y chacinados embutidos secos: detección por electroforesis de especies cárnicas y de proteínas extrínsecas agregadas

Dry-cured meat products: Electrophoresis detection of meat species and extrinsic proteins added

López Laura Beatriz¹, Binaghi María Julieta², Greco Carola Beatriz², Mambrín María Cecilia³, Cellerino Karina⁴, Valencia Mirta Eva⁵

¹ Doctora de la Universidad de Buenos Aires (UBA), área Bromatología. Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

² Bioquímica UBA. Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

³ Técnica. Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

⁴ Licenciada en Gestión de Agroalimentos UBA. Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

⁵ Doctora en Bioquímica UBA. Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Correspondencia: laulop@ffyb.uba.ar || Recibido: 14 de abril de 2010. Aceptado en su versión corregida: 28 de mayo de 2010.

Resumen

En la elaboración de salazones y chacinados embutidos secos se pueden utilizar diferentes especies cárnicas y en algunos de ellos también se pueden agregar proteínas extrínsecas. En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos: analizar salazones y chacinados embutidos secos elaborados con especies cárnicas de diferente origen (vacuna, porcina, de ciervo, de jabalí y de cordero) para establecer la utilidad de SDS-PAGE en la identificación de las mismas; comparar esta metodología con un método inmunoquímico (ELISA para especie porcina y ELISA para especie vacuna) en muestras que declaraban carne porcina y/o vacuna; detectar la posible presencia de proteínas extrínsecas declaradas o no en los respectivos rótulos de estos productos. Se analizaron 5 salazones y 7 chacinados embutidos secos. En todas las muestras se detectaron por electroforesis la o las especies cárnicas declaradas, sólo en una muestra que declaraba carnes vacuna y porcina se detectó sólo carne vacuna. La metodología inmunoquímica confirmó la detección de las carnes vacuna y/o porcina en las muestras que las declaraban. Con res-

pecto a las proteínas extrínsecas se detectaron por electroforesis proteínas de soja en tres muestras, dos de ellas no las declaraban. Se detectaron proteínas lácteas en muy baja concentración en tres muestras que las declaraban y se detectaron proteínas de trigo en dos muestras que no las declaraban. Las tres proteínas detectadas en estas muestras constituyen alérgenos alimentarios. Si bien el método ELISA resulta de elección para la detección de alérgenos alimentarios, ya que tiene una sensibilidad mucho mayor al SDS-PAGE, estas proteínas alérgicas fueron detectadas con facilidad por electroforesis, lo cual indica que estaban agregadas en concentraciones importantes. Resulta entonces imprescindible que los elaboradores de este tipo de productos declaren la totalidad de los ingredientes proteicos utilizados para evitar reacciones alérgicas en los consumidores.

Palabra clave: salazones; chacinados secos; especies cárnicas; proteínas extrínsecas; SDS-PAGE.

Diaeta (B.Aires) 2010;28 (131):7-13. ISSN 0328-1310

Abstract

Different meat species can be used in dry-cured meat products, and extrinsic proteins can also be added in some of them. The objectives of this work are to analyze dry-cured meat products elaborated with different meat species (cow, swine, deer, boar and lamb) in order to evaluate the usefulness of the SDS-PAGE method in the identification of the species used; to compare this methodology with an immunochemical method (ELISA for porcine and bovine species respectively) in samples that declare porcine and/or bovine meat in their label; and to detect the possible presence of extrinsic proteins declared or not in these products' labels. Twelve dry-cured meat products were analyzed. In all samples, the meat species declared in the labels were found by electrophoresis, except in one case where only bovine meat was detected while the label declared both bovine and porcine meats. The immunochemical method confirmed the detection of bovine and/or porcine meat in the samples that declared

them in their labels. As regards extrinsic proteins, soy proteins were detected by electrophoresis in three samples, while two of them did not declare these proteins. Dairy proteins were detected in very low levels in three samples that declared them and wheat proteins were detected in two samples that did not declare them. The three proteins detected in these samples are food allergens. Although the method of choice for the detection of allergens in food is ELISA because it is more sensible than SDS-PAGE, these allergenic proteins were easily detected by electrophoresis; this indicates they were added in relevant concentrations. It is then critical that manufacturers declare all protein ingredients used in this kind of products to prevent allergic reactions in consumers.

Keywords: Dry-cured meat products; meat species; extrinsic proteins; SDS-PAGE.

El Código Alimentario Argentino, establece que, como información obligatoria, debe figurar en la rotulación de alimentos envasados la lista de ingredientes. Los mismos deberán enumerarse en orden decreciente de peso inicial. Los aditivos alimentarios están incluidos dentro del concepto de ingredientes (1). El incumplimiento de lo declarado en el rótulo de un alimento constituye un fraude al consumidor. En algunos casos ese fraude puede ser económico, por ejemplo, cuando materias primas de elevado costo son reemplazadas por materias primas más económicas. Éste es el caso de proteínas de origen animal que son reemplazadas por proteínas vegetales o bien subproductos de origen animal. También pueden perjudicar al consumidor desde el punto de vista de su salud, por ejemplo cuando el alimento contiene materias primas que pueden inducir reacciones alérgicas en individuos sensibles (2,3).

En productos cárnicos es necesario verificar los ingredientes proteicos que corresponden tanto a las especies cárnicas como a las posibles proteínas extrínsecas utilizadas en la elaboración de los mismos. La metodología electroforética SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) resulta útil para la detección de diferentes especies cárnicas (vacuna, porcina, pollo y pavo) en productos crudos y cocidos (4-6) y también para detectar y cuantificar proteínas extrínsecas (soja, suero lácteo, plasma, caseínas y proteínas de trigo) agregadas a productos cárnicos crudos y cocidos (5,7).

En la elaboración de salazones crudas y en chacinados embutidos secos se pueden utilizar diferentes especies cárnicas y en algunos de ellos también se pueden agregar las proteínas extrínsecas antes mencionadas (1).

En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos: analizar salazones crudas y chacinados embutidos secos elaborados con especies cárnicas de diferente origen, para establecer la utilidad de SDS-PAGE en la identificación de las mismas; comparar esta metodología con un método inmunoquímico (ELISA para especie porcina y ELISA para especie vacuna) en muestras que declaraban carne porcina y/o vacuna; detectar la posible presencia de proteínas extrínsecas declaradas o no en los respectivos rótulos de estos productos.

Material y métodos

Muestras

Se analizaron 5 muestras comerciales correspondientes a 1 jamón crudo español, JC1 (salazón porcina); 1 carne salada, curada y ahumada de ciervo (salazón de ciervo); 1 carne salada, curada y ahumada de cordero (salazón de cordero); 1 salame de jabalí (chacinado embutido seco de jabalí) y 1 tasajo (salazón vacuna) a los fines de establecer por SDS-PAGE semejanzas y diferencias de las diferentes especies cárnicas. Se analizaron además carne vacuna, carne porcina y carne de cordero, crudas.

Además se analizaron 1 jamón crudo, JC2; 5 salames, S1, S2, S3, S4 y S5 y 1 cantimpalo (C1), para comparar la metodología SDS-PAGE con los métodos de ELISA para especies vacuna y porcina.

Por último, se analizaron los 5 salames, S1, S2, S3, S4 y S5 y el cantimpalo (C1), para identificar la posible presencia de proteínas extrínsecas. Se utilizaron como controles harina de trigo, aislado de soja y caseína.

La denominación de cada muestra comercial analizada así como las especies cárnicas y las proteínas extrínsecas declaradas en cada rótulo se presentan en las tablas 1 y 2.

Determinaciones analíticas

A. Análisis electroforético:

Desgrasado/deshidratado de las muestras: Se realizó con acetona (relación muestra/acetona 1/10) por agitación en VirTis (7).

Extracción de proteínas totales: Se utilizó buffer Tris-ClH 0,0625M (pH: 6,8) con 3 % de SDS y 2 % de 2-ME (solución extractiva de proteínas totales). Se pesaron 30 mg de producto cárnico o de materia prima proteica control desgrasado/deshidratado con acetona y se extrajeron con 2 mL de solución extractiva. Este solvente de extracción permite detectar las proteínas de las diferentes especies cárnicas y además proteínas de soja, plasma y suero lácteo (7).

Extracción selectiva de proteínas: Se realizó con isopropanol 55^o + 2% de 2-mercaptoetanol (ISO 55^o + 2-ME) por agitación en VirTis. De cada producto cárnico se pesaron 350 mg de muestra desgrasada/deshidratada con acetona, 50 mg de caseinato control y 200 mg de harina de trigo control. En todos los casos

Tabla 1. Resultados obtenidos por electroforesis y con los kits ELISA porcino y vacuno de salazones secas y chacinados embutidos secos comerciales.

Muestra	Denominación del producto	Especies cárnicas declaradas	Especies cárnicas detectadas por electroforesis	ELISA PORCINO*	ELISA VACUNO*
JC2	Jamón crudo	Carne de cerdo	Carne de cerdo	Positivo Abs 1,025 Punto de corte 0,634	
S1	Salame fino español	Carne de cerdo	Carne de cerdo	Positivo Abs 0,903 Punto de corte 0,634	Negativo Abs 0,237 Punto de corte 0,698
S2	Salame	Carne vacuna y carne de cerdo	Carne vacuna y de cerdo	Positivo Abs 0,715 Punto de corte 0,634	Positivo Abs 0,847 Punto de corte 0,698
S3	Salame picado entrefino	Carne de cerdo y carne vacuna.	Carne vacuna y de cerdo	Positivo Abs 0,728 Punto de corte 0,634	Positivo Abs 1,038 Punto de corte 0,698
S4	Salame tipo Milán	Carne vacuna y carne de cerdo	Carne vacuna.	Positivo débil Abs 0,640 Punto de corte 0,634	Positivo Abs 0,990 Punto de corte 0,698
S5	Salame tipo Milán	Carne de cerdo y carne vacuna	Carne vacuna. Carne de cerdo en baja proporción.	Positivo débil Abs 0,607 Punto de corte 0,634	Positivo Abs 1,016 Punto de corte 0,698
C1	Cantimpalo	Carne vacuna y carne de cerdo	Carne vacuna. Carne de cerdo en baja proporción.	Positivo débil Abs 0,578 Punto de corte 0,634	Positivo Abs 0,943 Punto de corte 0,698

* Cuando el valor de absorbancia (Abs) es superior al punto de corte la muestra contiene la especie cárnica en estudio y el resultado del ELISA se considera positivo. Cuando el valor de absorbancia es inferior al punto de corte y cercano al de los controles negativos, la muestra no contiene esa especie cárnica y el resultado del ELISA se considera negativo. Cuando el valor de absorbancia es intermedio entre el punto de corte y el de los controles negativos la muestra contiene esa especie cárnica pero en baja proporción y el resultado del ELISA se considera positivo débil.

Tabla 2. Detección de proteínas extrínsecas por SDS-PAGE en chacinados embutidos secos comerciales.

Muestra	Denominación del producto	Especies y proteínas extrínsecas declaradas	Proteínas extrínsecas detectadas con solución extractiva de proteínas totales	Proteínas extrínsecas detectadas con ISO 55° + 2-ME
S1	Salame tipo milán	Carne de cerdo, caseinato, proteína de soja.	Soja	Caseínas (en muy baja concentración)
S2	Salame tipo milán	Carnes vacuna y de cerdo, leche. EMU: caseinato de sodio.	n.d.	Caseínas (en muy baja concentración)
S3	Salame tipo milán	Carnes vacuna y de cerdo, leche en polvo.	n.d.	Caseínas (en muy baja concentración)
S4	Salame tipo Milán	Carne vacuna y carne de cerdo	Soja	Trigo
S5	Salame tipo Milán	Carne de cerdo y carne vacuna	n.d.	n.d.
C1	Cantimpalo	Carne vacuna y carne de cerdo	Soja	Trigo

n.d.: no se detectaron proteínas extrínsecas.

la extracción se efectuó con 2 mL de ISO 55⁰ + 2-ME. Este solvente de extracción permite detectar caseínas y proteínas de trigo (7).

Electroforesis: Se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli. La concentración de poliacrilamida utilizada fue 10 % (7,8).

B. Método inmunoquímico:

Extracción de proteínas para el ELISA: Se preparó una solución salina, 9 g de cloruro de sodio/L en agua pura. Se pesaron 25 gramos de carne control o de muestras para analizar, picadas en procesadora, y se agregaron 100 mL de solución salina. Los productos cocidos se agitaron 15 minutos a temperatura ambiente en un baño con agitación y luego se dejaron 15 minutos en reposo. Los productos crudos y los secos se calentaron 15 minutos en un baño de agua a 95 - 100°C, con agitación. Se dejaron en reposo 10-15 minutos a temperatura ambiente y luego se procedió como en los productos cocidos. Se trasvasaron aproximadamente 15 mL a tubos Falcon y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Se trasvasaron los sobrenadantes a tubos eppendorf y se conservaron a 2-8°C hasta su análisis, dentro de las 36 horas.

ELISA: Se utilizaron dos kits comerciales para la determinación cualitativa de especies en productos cocidos: Biokits (cooked) species identification Test Kit pork and beef de Gen-Probe.

El procedimiento para realizar el ensayo se realizó siguiendo las instrucciones de los kits comerciales (9). Las absorbancias de todos los micropozos se obtuvieron en un lector de ELISA Rayto modelo RT-2100 C a 450 nm. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Se utilizaron en el ensayo un control positivo y dos controles negativos. En la determinación de especie porcina se utilizó el control positivo porcino y los controles negativos: vacuno y pollo. En la determinación de especie vacuna se utilizó el control positivo vacuno y los controles negativos: porcino y pollo.

De acuerdo con las especificaciones del kit (9) se calculó un valor como punto de corte teniendo en cuenta la absorbancia (Abs) promedio de los dos controles negativos (CN1 y CN2) y el factor 2,5 proporcionado por el kit.

$$\text{Punto de Corte} = \frac{(\text{Abs CN1} + \text{Abs CN2})}{2} \times 2,5$$

La absorbancia promedio de cada muestra debe ser comparada con el valor del punto de corte obtenido a los fines de establecer si el resultado es positivo o negativo.

Resultados

Se analizaron tres muestras correspondientes a salazones: jamón crudo español; JC1 (especie porcina); tasajo (especie vacuna) y carne curada, salada y ahumada de cordero junto con los controles de carne porcina, carne vacuna y carne de cordero crudas. Los densitogramas correspondientes a estas seis muestras se presentan en la figura 1. En la misma se observa que los perfiles electroforéticos de las muestras crudas y de las salazones difieren principalmente en la intensidad de ciertos picos. En general, las muestras crudas presentan picos de mayor intensidad. Además, algunos picos sólo se observan en las muestras crudas y están ausentes en las salazones. Debido a estas diferencias no es conveniente utilizar como control para identificar el origen de la especie cárnica, carne de la misma especie cruda, sino un producto genuino sometido al mismo tratamiento que el producto a analizar.

En la figura 2 se presentan los densitogramas correspondientes a cinco productos (salazones y chacinados embutidos secos) de diferentes especies cárnicas: jamón crudo, JC1 (salazón porcina); tasajo (salazón vacuna); carne salada, curada y ahumada de cordero (salazón de cordero); carne salada, curada y ahumada de ciervo (salazón de ciervo) y salame de jabalí (chacinado embutido seco de jabalí). Cada una de estas muestras presenta un perfil que le es característico principalmente en la zona de peso molecular (PM) mayor a 45000 D (A: pico característico de actina). Si bien hay picos en común entre las distintas especies cárnicas todas se pueden distinguir entre ellas sin inconvenientes. En la zona de PM menor a 45000 D la que presenta mayor diferencia es la muestra de jabalí que presenta un pico de 38000 D (X) de mucha intensidad, mayor al pico de la actina de 45000 D. Esto no se observa en las otras especies cárnicas.

Por lo tanto, la metodología SDS-PAGE permite identificar la especie cárnica en salazones y chacinados embutidos secos utilizando como controles patrones sometidos a igual tratamiento.

Como aplicación de estos resultados se analizaron siete productos comerciales correspondientes a

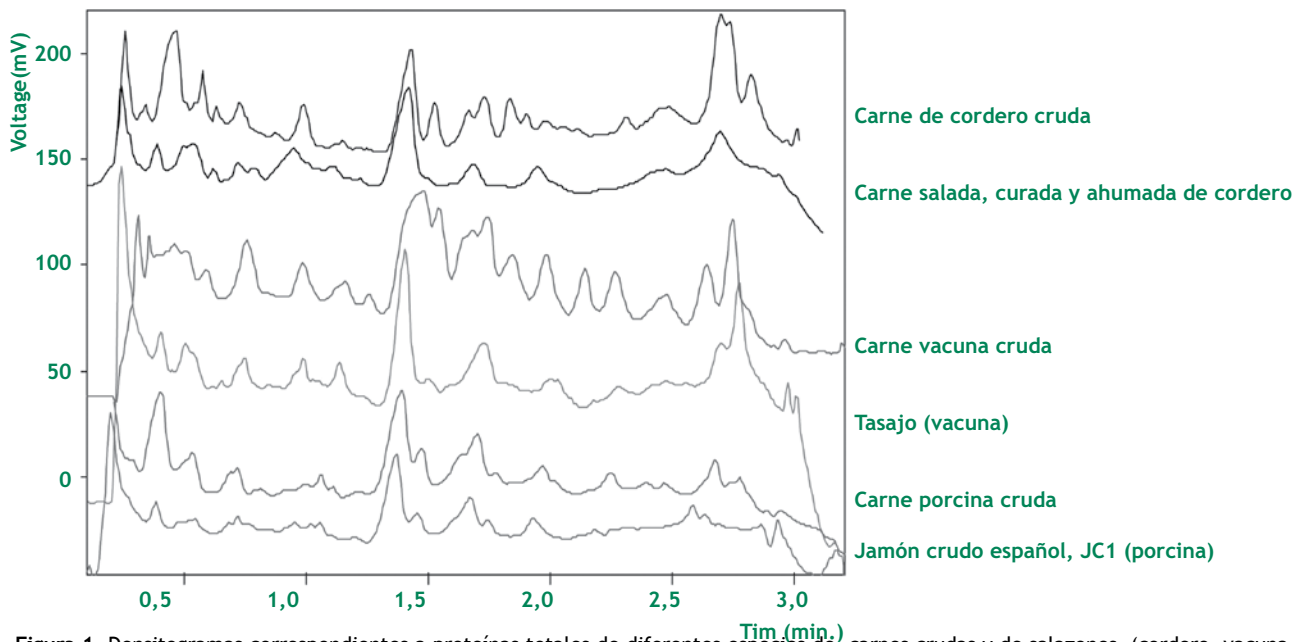


Figura 1. Densitogramas correspondientes a proteínas totales de diferentes especies de carnes crudas y de salazones (cordero, vacuna y porcina), separadas por SDS-PAGE.

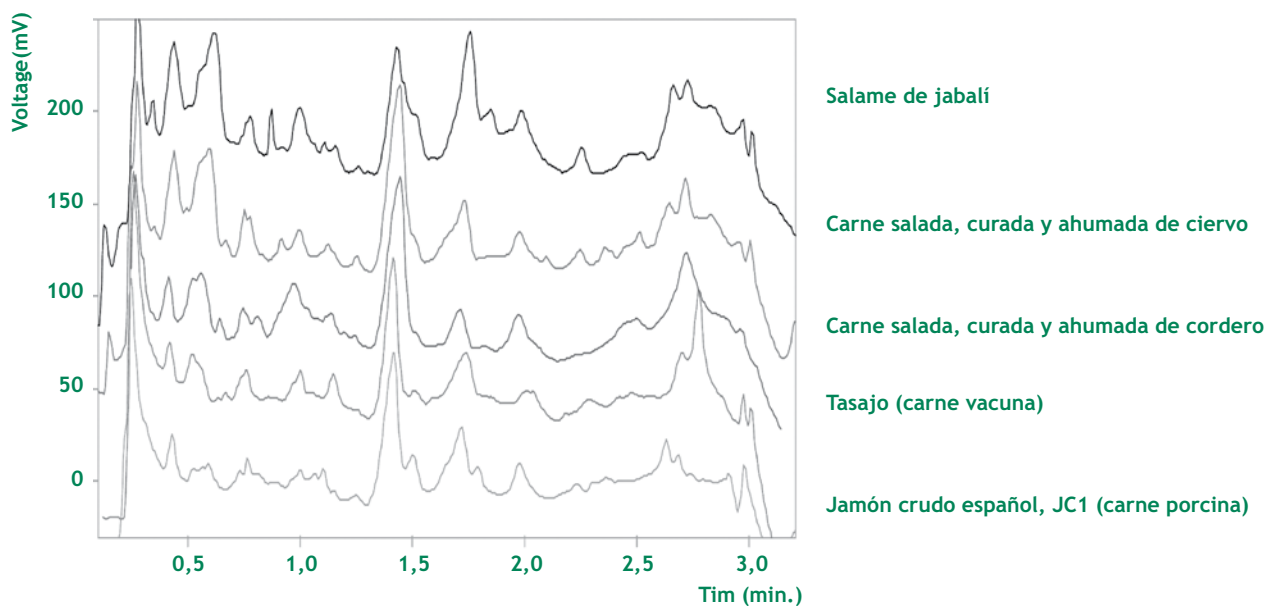


Figura 2. Densitogramas correspondientes a proteínas totales de diferentes especies de salazones y chacinados embutidos secos, separadas por SDS-PAGE. A: pico de 45000 D, Actina. X: pico de 38000 D.

salazones (1 jamón crudo, JC2) y chacinados secos (5 salames, S1 a 5 y 1 cantimpalo, C1) que declaraban carnes vacuna y/o porcina en su lista de ingredientes. En estos productos se compararon los análisis realizados con SDS-PAGE con los kits comerciales de ELISA para especie porcina y especie vacuna. Los resultados obtenidos por ambas metodologías se presentan en la

tabla 1. El método electroforético permitió confirmar la presencia de proteínas de carne de cerdo en las dos muestras que sólo declaraban esta especie cárnica (JC2 y S1). En los productos que declaraban carne de cerdo y carne vacuna (S2, 3, 4, 5 y C1) se detectaron ambas especies cárnicas en todas las muestras con excepción de la muestra S4 en la que no se observaron

proteínas de cerdo. En las muestras S5 y C1 se detectó la presencia de carne porcina en baja proporción. Con los kits de ELISA vacuno y de cerdo se detectaron proteínas vacunas y de cerdo, respectivamente, en todas las muestras que declaraban estas especies cárnicas. Sin embargo en las muestras S4, S5 y C1 los valores de absorbancia en el ELISA porcino fueron muy cercanos (S4) o inferiores (S5 y C1) al punto de corte, lo cual indica la presencia de esta especie cárnica en baja proporción, resultados que concuerdan con los observados por electroforesis.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de proteínas extrínsecas de seis de los productos cárnicos por SDS-PAGE. En la misma tabla se puede observar que se detectaron proteínas de soja en tres muestras, S1, S4 y C1; dos de ellas no las declaraban (S4 y C1). Se detectaron proteínas lácteas en muy baja concentración en tres muestras que las declaraban, S1, S2 y S3. Por último, se detectaron proteínas de trigo en dos muestras que no las declaraban (S4 y C1).

Discusión y conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos para la identificación de especies cárnicas en salazones y chacinados embutidos secos sería conveniente contar como controles con patrones sometidos a igual tratamiento.

En el análisis de las muestras comerciales la metodología electroforética permitió la detección de proteínas de carne vacuna y/o porcina, en la mayoría de las muestras analizadas.

La metodología electroforética tiene como ventaja que permite en una sola corrida detectar la presencia de proteínas de diferentes especies cárnicas, mientras que con la metodología ELISA es necesario analizar una misma muestra con los diferentes kits de especies cárnicas para confirmar la presencia de las especies utilizadas. Además, la metodología electroforética permite la detección de diferentes proteínas extrínsecas (soja, leche, caseinato, trigo, plasma, suero lácteo) en la misma corrida electroforética (5,7).

Las tres proteínas detectadas en algunas muestras, proteínas de soja, de trigo y lácteas, constituyen alérgenos alimentarios. Si bien la metodología de elección para la detección de alérgenos alimentarios es ELISA ya que tiene una sensibilidad mucho mayor al SDS-PAGE, se debe destacar que la metodología electroforética utilizada en el presente trabajo permitió detectar claramente estas proteínas alérgicas. El hecho de haber sido detectadas por SDS-PAGE implica que dichas proteínas estaban presentes en estos alimentos en concentraciones mayores a 0,1% de aislado de soja, de harina de trigo o de caseinato (10), es decir estas proteínas constituyen ingredientes proteicos y algunas de ellas no estaban declarados en la lista de ingredientes de los respectivos rótulos. Resulta entonces imprescindible que los elaboradores de este tipo de productos declaren la totalidad de los ingredientes proteicos utilizados para evitar reacciones alérgicas en los consumidores.

La metodología electroforética SDS-PAGE resulta una herramienta útil para la detección de las especies cárnicas utilizadas en salazones y chacinados embutidos secos. En la mayoría de las muestras comerciales analizadas permitió la detección de las especies cárnicas declaradas en los respectivos rótulos. Además, permitió la detección de proteínas extrínsecas como soja, proteínas lácteas y proteínas de trigo, algunas declaradas en los rótulos y otras no declaradas. Si bien, según el Código Alimentario Argentino, es obligatorio declarar en el rótulo la totalidad de los ingredientes empleados, en algunos productos, utilizando la metodología SDS-PAGE, se pueden detectar ingredientes proteicos no declarados. Cuando tales ingredientes proteicos constituyen alérgenos alimentarios, ello puede constituir un riesgo para personas alérgicas. Por lo tanto, se debería asegurar la declaración de todos los alérgenos presentes en un alimento.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por UBACyT B418.

Referencias bibliográficas :::::::::::::::::::::

- (1) Código Alimentario Argentino, 2010. [citado marzo 2010]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/codigoa/Capitulo_VI_Carneos_actualiz_2007-08.pdf
- (2) Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*. 2004; 21 (1): 1-31.
- (3) Koppelman SJ, Hefle SL. *Detecting allergens in foods*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge England, 2006.
- (4) López LB, Binaghi MJ, Greco CB, Mambrín MC, Valencia ME. Comparación entre un método electroforético y un método inmunoquímico para la detección de especies porcina y/o vacuna en productos cárnicos crudos o cocidos comerciales. Trabajo completo. XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. AATA. (publicado en CD). 2009.
- (5) López LB, Greco CB, Binaghi MJ, Mambrín MC, Valencia ME. Análisis de fiambres comerciales: detección de especies cárnicas y de proteínas agregadas utilizando SDS-PAGE. En: *Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Análisis Físicos, Químicos y Sensoriales* (Wunderlin D. y Borneo R. eds) Ministerio de Ciencia y Tecnología. Córdoba, Argentina. 2009. 198-206. Disponible en : http://www.secyt.unc.edu.ar/ISIDSA/documentos/IIICongreso_4.pdf
- (6) López LB, Greco CB, Binaghi MJ, Mambrín MC, Valencia ME. Identificación y cuantificación de especies vacuna y/o porcina en productos cárnicos frescos por SDS-PAGE. *La Industria Cárnica Latinoamericana*. 2010:163.
- (7) López LB, Greco CB, Ronayne de Ferrer PA, Valencia ME. Identificación de proteínas extrínsecas en jamones cocidos por SDS-PAGE: nivel de detección en sistemas modelo. *Arch Latinoam Nutr*. 2006; 56(3):282-7.
- (8) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage t4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.
- (9) Gen Probe. BioKits (Cooked) Species Identification Kits Qualitative tests for the detection of species content in foods/feeds. [citado marzo 2010]. Disponible en: http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/Page_902011Q-012N-013L-022K-023H_1209.pdf
- (10) López LB. Separación, identificación y cuantificación de proteínas en alimentos procesados. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 2000.

