



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

DETECCIÓN DE TRAZAS DE SOJA Y DE LECHE EN GALLETITAS, FIDEOS Y SNACKS LIBRES DE GLUTEN: DESARROLLO DE ENZIMOINMUNOENSAYOS COMPETITIVOS UTILIZANDO SDS Y SULFITO DE SODIO.

Cellerino Karina¹, Binaghi Julieta¹, Ambrosi Vanina¹, Docena Guillermo², López Laura Beatriz¹.

¹*Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Bromatología.*

²*LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
e-mail: kcellerino@ffyb.uba.ar*

Resumen

Una de las metodologías utilizadas internacionalmente para la detección de alérgenos en alimentos es el método de ELISA. En trabajos previos se ha observado que los kits comerciales no cuantifican adecuadamente, especialmente cuando se aplican a alimentos tratados térmicamente. Se han desarrollado enzimoinmunoensayos (EIE) competitivos que utilizan una solución de extracción con Tris-HCL 0,0625 M con 3% de SDS y con 2% de 2- mercaptoetanol (2-ME). Investigaciones recientes desaconsejan el empleo de 2-ME debido a su toxicidad, por lo tanto este fue sustituido por sulfito de sodio (SS). Con el método SDS-PAGE se corroboró que utilizando la mencionada solución de extracción, pero con diferentes agentes reductores se observaban las mismas bandas proteicas de leche o de soja, con igual intensidad. Para mejorar la performance del enzimoinmunoensayo se obtuvieron anticuerpos específicos de proteínas de soja (PS) y proteínas de leche (PL) inmunizando a conejos con los extractos de dichas proteínas tratadas con esta solución con SDS y SS. El objetivo de este trabajo fue comparar los resultados de los EIE que utilizan 2-ME con los resultados de los EIE que utilizan SS como parte de la solución extractiva. Se evaluaron los parámetros de validación: límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), recuperación y precisión en el día y entre días. Los LD y los LC para los EIE para detectar soja y leche utilizando la solución con SS resultaron menores comparados con la solución con 2-ME, de manera que mejoró la sensibilidad del enzimoinmunoensayo (con la solución con SS: soja LD: 4,4 ppm PS, LC: 10,0 ppm PS y leche LD: 11,0 ppm de PL, LC: 27,0 ppm PL; con la solución con 2-ME soja LD: 35,0 ppm PS, LC: 60,0 ppm PS y leche LD: 25,0 ppm de PL, LC: 51,0 ppm PL). La recuperación y la precisión resultaron adecuadas en ambos EIE (recuperación: con la solución con SS: soja 107% y leche 108%; con la solución con 2-ME: soja 109% y leche 112%). Se adoptó como criterio de aceptación que los CV de la precisión intradía e interdías no superaran el 15%, en todos los EIE resultó menor a 15%. Además, se analizaron 9 muestras comerciales de productos libres de gluten con los EIE que utilizaban dichas soluciones extractivas (Tris-HCl/SDS y Tris-HCl/SS) y con kits comerciales de R-Biopharm para soja, y de Neogen para leche. Se observó que ambos EIE y los kits comerciales se comportaron de manera similar en cuanto a la detección de los alérgenos en

estudio. Dado el bajo costo de los EIE competitivos se podría utilizar como método de screening el nuevo EIE desarrollado con SS. UBACYT20020160100060BA
Palabras clave: leche, soja, productos libres de gluten, ELISA, sulfito de sodio.

1. Introducción

La detección de trazas de alérgenos en alimentos es una tarea muy difícil. Las causas de esta dificultad son dos: los bajos niveles en que pueden estar presentes en los alimentos y la posible interferencia de la matriz en su detección [1] [2]. Existe una necesidad de contar con metodologías accesibles económicamente que permitan la detección de proteínas alergénicas en alimentos. La metodología más utilizada para el análisis de estas proteínas es el método de ELISA [3].

Se ha estudiado que las proteínas alergénicas en alimentos procesados, sometidos a elevadas temperaturas, no son detectadas correctamente con los métodos de ELISA, debido a su alteración estructural incluyendo desnaturalización y la formación de complejos insolubles, que dificultan el correcto reconocimiento por parte de los anticuerpos utilizados en los ensayos. Se considera que la extracción de las proteínas alergénicas en el método de ELISA es un paso fundamental para poder cuantificar adecuadamente las mismas. Se han desarrollado enzimoimmunoensayos (EIE) competitivos que utilizan una solución de extracción con Tris-HCL 0,0625 M con 3% de SDS y con 2% de 2- mercaptoetanol (2-ME). Investigaciones recientes desaconsejan el empleo de 2-ME debido a su toxicidad, por lo tanto este fue sustituido por sulfito de sodio (SS) [4]. Con el método SDS-PAGE se corroboró que utilizando la mencionada solución de extracción, pero con diferentes agentes reductores (2-ME o SS) se observaban las mismas bandas proteicas de leche o de soja, con igual intensidad (resultados no publicados). Además, para mejorar la performance del EIE se obtuvieron anticuerpos específicos de proteínas de soja o proteínas de leche inmunizando a conejos con los extractos de dichas proteínas tratadas con esta solución con SDS/SS.

El objetivo de este trabajo fue comparar los resultados de los EIE que utilizan 2-ME con los resultados de los EIE que utilizan SS como parte de la solución extractiva.

2. Materiales y métodos

Sistemas modelo de harina de arroz con agregado de producto de soja y de leche en polvo

Se elaboraron sistemas modelo de harina de arroz con agregado de producto de soja (63% proteínas) o de leche en polvo (34% proteínas). Se analizaron dos sistemas modelo con 150 ppm y 50 ppm de proteína de producto de soja o de leche en polvo.

Muestras comerciales

Se estudiaron 9 productos libres de gluten. La descripción de cada muestra y la lista de ingredientes de cada una de ellas se encuentran detalladas en la Tabla 1. Se analizaron con los EIE que utilizaban la solución extractiva con SS y con kits comerciales de R-Biopharm para soja, y de Neogen para leche. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Obtención de extractos proteicos a partir de producto de soja, leche en polvo y de productos libres de gluten

Para la extracción de proteínas se siguió el protocolo descrito en Cellerino et al, 2018[5], pesando inicialmente 30 mg en el caso del producto de soja, 60 mg de leche en polvo y 200 mg de los productos libres de gluten, utilizando las diferentes soluciones extractivas, en un EIE solución extractiva con SDS/ME y en otro EIE con SDS/SS.

Puesta a punto de los enzimoimmunoensayos competitivos

Se determinó la concentración óptima de antígeno (extracto de soja o de leche) a inmovilizar en la placa y la dilución óptima de anticuerpo primario (antisueros policlonales de conejo específicos de proteínas de soja o de leche) a utilizar en la

competencia. En el caso del EIE en el que se utilizó como solución extractiva SDS/MEse siguió el protocolo descrito en Cellerino et al, 2018[5]. Para el EIE que utilizó solución extractiva con SDS/SSse siguió el mismo protocolo de puesta a punto, pero utilizando diferentes anticuerpos específicos de proteínas de soja y de proteínas de leche. Los mismos se obtuvieron inmunizando a conejos con los extractos de dichas proteínas tratadas con la solución de Tris-HCL 0,0625M con 3% de SDS y 2% de SS 0,1 M; siguiendo el protocolo según Rozenfeld P et al., 2002 [6]. Dado que para la selección de la concentración de anticuerpo primario a utilizar en la competencia se deben sembrar varias diluciones de los mismos, las diluciones utilizadas fueron: entre 1/156 y 1/10000 en el EIE para la detección de soja y entre 1/12500 y 1/1600000 para la detección de leche.

Sensibilización de la placa

La sensibilización se refiere al pegado del antígeno (extracto de soja o leche) en la placa. Se siguió el protocolo de sensibilización de la placa según Cellerino et al, 2017[7].

Validación de los enzimoimmunoensayos competitivos para la detección/ cuantificación de soja y de leche en harina de arroz

Para la determinación de la linealidad de los métodos se utilizaron concentraciones crecientes de un extracto de producto de soja o de leche extraído con buffer Tris-HCL 0,0625 M con 3% de SDS 2% de 2-MEo con 3% de SDS y 2% de SS. Se trabajó con cinco puntos 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de soja o de leche/mL buffer carbonato/bicarbonato, pH: 9,6.

Dado que en este ensayo se utiliza un buffer de extracción que contiene agentes reductores y desnaturalizantes (2-ME o sulfito de sodio y SDS) que interfieren en la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó la dilución de la solución extractiva que no

afectara la unión antígeno-anticuerpo. De esta manera los componentes de la solución extractiva fueron diluidos para el EIE que utilizaba SDS/ME 1: 164 para leche y 1:175 para soja y para el EIE que utilizaba SDS/SS: 1: 204 en leche y 1:181 en soja, en todos los puntos de la curva. Las diluciones se realizaron en buffer carbonato/bicarbonato, pH: 9,6. Una vez preparadas las diluciones de la curva se prepararon los preincubados en tubos eppendorf y se siguió el protocolo como se describe en Cellerino et al, 2017[7].

Para determinar los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de los métodos se utilizó una muestra de harina de arroz sin analito (soja o leche). La misma se extrajo por quintuplicado y cada extracto se analizó por duplicado, como se describió anteriormente, realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones de cada uno ya descritas. La concentración del analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo (A). Se calculó el valor medio del analito para la muestra de harina de arroz sin analito y el desvío estándar correspondiente. El límite de detección se calculó según Cellerino et al, 2017 [7].

Por interpolación en la curva de calibración se obtuvieron los μg de proteína de soja o de leche/mL. Esto corresponde al contenido de soja o de leche en el extracto diluido analizado. La cantidad de proteína de soja o de leche en $\mu\text{g}/1000$ mg de harina de arroz se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de proteína de soja o de leche en harina de arroz } \mu\text{g}/1000 \text{ mg} = \frac{\text{cantidad de prot. de soja o de leche (curva)}-\mu\text{g}_{(1)} \cdot \text{V-mL}_{(2)} \cdot \text{x}1000\text{-mg}_{(3)}}{5,7 \text{ o } 6,1(\text{SDS/ME}); 5,5 \text{ ó } 4,9\text{-}\mu\text{L}(\text{SDS/SS})_{(4)} \cdot \text{P-mg}_{(5)}} \quad (A)$$

(1) μg de proteína de soja o de leche interpolados en la curva de calibración.

(2) Volumen de sobrenadante al realizar la extracción de harina de arroz con solución extractiva de proteínas totales: 1600 μL .

(3) 1000 mg: para expresar el contenido en 1000 mg de harina de arroz.

(4) Volumen de extracto que se toma de los 1600 μL de sobrenadante y se diluyen 1:175 (soja) y 1:164 (leche)=5,7 o 6,1 (SDS/ME); 1:181(soja) y 1:204 (leche)=5,5 ó 4,9- μL (SDS/SS)

(5) Peso de harina de arroz que se extrae con solución extractiva de proteínas totales: 200 mg.

Para evaluar la precisión intradía del método se analizaron tres muestras de harina de arroz que contenían igual cantidad de analito (tres muestras con 50 ppm de proteína de soja y tres muestras con 50 ppm de proteína de leche). Cada muestra se extrajo por simplificado como se describió anteriormente (n=3). Se procedió con el protocolo según Cellerino et al, 2017[7].

Para evaluar la recuperación del método se analizaron dos sistemas modelo de mezclas de harina de arroz con 50 y 150 ppm de proteína de soja y dos sistemas modelo con 50 y 150 ppm de proteína de leche. Se procedió con el protocolo según Cellerino et al, 2017[7].

ELISA comerciales

Las proteínas de leche y de soja fueron detectadas y cuantificadas con diferentes kits comerciales: R-Biopharm y Neogen. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado siguiendo los protocolos de cada kit [8][9].

3. Resultados y discusión

Validación de los enzimoimmunoensayos competitivos para la detección/ cuantificación de soja y de leche en harina de arroz

Para establecer la linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de soja o de leche/mL. A los valores de absorbancias corregidas obtenidos para cada nivel de concentración se aplicó un Test de Homogeneidad de Varianzas y no se encontró diferencia significativa entre la varianzas de los distintos niveles analizados. Se realizó el test de linealidad sobre los valores de absorbancia corregida en función del ln de la concentración de soja o de leche (μg proteína de soja o de leche/mL) utilizando el programa Infostat profesional versión 2004d.1 desarrollado por la Universidad Nacional de Córdoba. Se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de soja/ o de leche mL se comportó en forma lineal en todos los EIE.

Los Límites de detección y de cuantificación obtenidos fueron:

-Con la solución con 2-ME: soja LD: 35,0 ppm PS, LC: 60,0 ppm PS y leche LD: 25,0 ppm de PL, LC: 51,0 ppm PL.

-Con la solución con SS: soja LD: 4,4 ppm PS, LC: 10,0 ppm PS y leche LD: 11,0 ppm de PL, LC: 27,0 ppm PL.

Los LD y los LC para los EIE para detectar soja y leche utilizando la solución con SS resultaron menores comparados con la solución con 2-ME, de manera que mejoró la sensibilidad del enzimoimmunoensayo.

Las precisiones del método en el día y entre días, expresada como coeficiente de variación (CV) fueron para soja con ME; 12,0 (n=3) y 7,5 (n=9), respectivamente. Con SS: 7,0 (n=3) y 3,4 (n=9), respectivamente. Para leche con ME: 14,0 (n=3) y 10,0 (n=9), respectivamente. Con SS: 10,0 (n=3) y 12,0 (n=9), respectivamente.

Se calcularon las recuperaciones de los métodos, siendo las mismas: para el EIE utilizando 2-ME: en soja: 109%, en leche: 112% y para el EIE utilizando SS: en soja: 107%, en leche: 108%.

Todos los parámetros de validación obtenidos de los dos EIE desarrollados resultaron adecuados de acuerdo con los criterios de aceptación considerados en Cellerino et al, 2017[7].

ELISA comerciales

En la Tabla N°1 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja y de leche en productos libres de gluten utilizando los EIE desarrollados con SS y kits de ELISA comerciales.

En las muestras 1, 5, 6, 7 y 8 que no declaraban soja en su lista de ingredientes no se detectó soja con ninguno de los dos ensayos, en la muestra 3 que tampoco declaraba soja si se detectó soja con ambos ensayos. Probablemente en este caso se

trate de un contacto cruzado. En la muestra 2 que no declara soja en su lista de ingredientes el EIE no detectó soja y sí se detectó soja con el kit de R-Biopharm. Esto se debe a que la sensibilidad del EIE es menor que la del kit comercial. En las muestras 4 y 9 que declaraban soja en su lista de ingredientes, ninguno de los dos ensayos detectó soja. Posiblemente los rótulos de estas muestras se encuentren desactualizados, es probable que se hayan cambiado los ingredientes de las mismas pero no la información contenida en los rótulos. En las muestras 1, 2, 3, 5, 7 que no declaraban leche en su lista de ingredientes no se detectó leche con ninguno de los dos ensayos. La muestra 9 no declaraba leche en su lista de ingredientes pero si se detectó leche con ambos ensayos. Es probable que exista un posible contacto cruzado. En las muestras 4, 6 y 8 que declaraban leche en su lista de ingredientes con ambos ensayos se detectó leche.

Analizando los resultados obtenidos en muestras comerciales, se observa que si una muestra presenta un resultado positivo con los enzimoimmunoensayos desarrollados se puede confirmar la presencia de soja o de leche en dicha muestra, sin necesidad de recurrir a un kit de ELISA comercial. Cuando esta metodología resulte negativa se debería confirmar con un método más sensible (kit de ELISA comercial) para asegurar la ausencia de dichas proteínas alergénicas.

Se considera que estos EIE competitivos desarrollados tienen dos ventajas fundamentales: resultan adecuados para cuantificar las proteínas alergénicas, además poseen un costo menor al de los kits comerciales de ELISA. De acuerdo con estudios previos existen numerosos alimentos que tienen elevado riesgo de contener alérgenos no declarados y pueden llevar a un riesgo potencial para la salud de los consumidores alérgicos. Muchos estudios demostraron elevada prevalencia de

alérgenos no declarados en alimentos con o sin frases de advertencia. La presencia de proteínas no declaradas es un riesgo para los consumidores alérgicos [10, 11].

Las industrias deben ser responsables en cuanto a la correcta declaración de los alérgenos en el rótulo de los alimentos envasados.

4. Conclusiones

En conclusión, observando los resultados obtenidos en este trabajo, dado el bajo costo de los EIE desarrollados se podrían utilizar como métodos de screening. Dado la mayor sensibilidad de los EIE que utilizan SDS/SS, estos resultarían los de elección.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 20020160100060BA).

6. Referencias

- [1] Alves RC, Barroso MF, González-García MB, Oliveira B & Delerue-Matos C. New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016; 56 (14): 2304-2319.
- [2] Koeberl M, Clarke D, Allen KJ, Fleming F, Katzer L, Lee N A, Lopata A L, Said M, Scheelings P, Shepherd N, Sherlock R, Roberts J. Food Allergens Management in Australia. *J. AOAC Int.* 2018; 101(1):60-69(10).
- [3] López MC. Food Allergen Labeling: A Latin American Approach. *J. AOAC Int.* 2018; 101(1):14-16(3).
- [4] Ito K, Yamamoto T, Oyama Y, Masahiro O. Food allergen analysis for processed food using a novel extraction method to eliminate harmful reagents for both ELISA and lateral-flow tests. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(22).
- [5] Cellerino K, Cagnasso C, Greco C, Docena G, Polenta G, Ferreyra V, López L. B. Protein Ingredients Control in Gluten Free Products Using SDS-PAGE, Developed Competitive Enzyme Immunoassays and Commercial ELISA Kits. *WJFST.* 2018; 2 (1): 12-18.
- [6] Rozenfeld P, Docena G, Añón M, Fossati C. Detection and identification of a SP component that cross reacts with caseins from cow milk. *Clin Exp Immunol.* 2002;130 (1): 49-58.
- [7] Cellerino Karina, Rodríguez Viviana Gladys, Docena Guillermo, López Laura Beatriz. Development of a Competitive Enzyme Immunoassay Technique for the Detection of Soy Traces in Meat Products. *Journal of Food and Nutrition Sciences.* 2017; 5 (2): 57-62.
- [8] Neogen Veratox® for Total milk allergen. 2016. Disponible en: http://foodsafety.neogen.com/pdf/procedures/8470_pro.pdf.
- [9] R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Soya. 2018. Disponible en: <https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2016/10/R7102-FAST-Soya-16-07-18.pdf>.
- [10] Do A. B, Khuda S. E, Sharma M. G. Undeclared food allergens and gluten in commercial food products analyzed by ELISA. *J. AOAC Int.* 2018; 101(1):23-35(13).
- [11] Cellerino K. Metodología de control en el análisis de alérgenos de leche, soja y huevo en productos cárnicos y farináceos. [Tesis UBA]. Argentina; 2016.

Tabla N° 1: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja y de leche en productos libres de gluten utilizando los EIE desarrollados con SS y kits de ELISA comerciales.

Muestra	Denominación de venta	Ingredientes	Declaración de alérgenos	Frase de advertencia	ELISA SOJA R-Biopharm(RB) ppm proteína de soja EIE ppm proteína de soja	ELISA LECHE NEOGEN(N) ppm leche en polvo EIE ppm proteína leche
1	Fideos secos de harina de arroz	Harina de arroz, huevo deshidratado en polvo, almidón de maíz.	--	--	<2,5(RB) <10	<2,5(N) <27
2	Fideos secos al huevo / Libre de gluten	Harina de maíz, harina de arroz, huevos frescos, agua, fécula de mandioca y fécula de maíz.	Contiene huevo.	--	4,3(RB) <10	<2,5(N) <27
3	Pasta seca de harina de garbanzo libre de gluten - Sin T.A.C.C	Harina de garbanzo y goma xántica (INS 415 / espesante)	--	--	>20(RB) 36	<2,5(N) <27
4	Galletitas dulces sabor a coco. Libre de gluten.	Harina de arroz, margarina, almidón de maíz, azúcar, agua, leche en polvo, miel, sal, aromatizante, esencia de coco y de vainilla, espesante: goma xántica (INS 415), emulsionante: Lecitina de soja (INS 322).	Contiene leche y lecitina de soja.	--	<2,5(RB) <10	>25(N) >490
5	Snack crocante de arroz integral sabor Fina Hierbas	Arroz integral, aroma artificial (sabor a finas hierbas), Sal y aceite vegetal.	--	--	<2,5(RB) <10	<2,5(N) <27
6	Tostadas de arroz - Sin sal agregada libre de gluten - Sin TACC.	Harina de arroz, leche en polvo entera, azúcar, estabilizante: carbonato de calcio.	Contiene leche.	Elaborado en una línea donde se procesan alimentos que contienen sésamo	<2,5(RB) <10	>25(N) >490
7	Papas fritas sabor Mostaza y Miel libres de gluten sin TACC	Papa, aceite vegetal, sal, aromatizante natural sabor mostaza y miel.	--	--	<2,5(RB) <10	<2,5(N) <27
8	Tostadas de arroz libre de gluten	Arroz molido, leche en polvo descremada, azúcar y sal.	Contiene leche	--	<2,5(RB) <10	>25(N) >490
9	Alimento a base de harina de arroz y maíz con relleno sabor a chocolate.	Harina de arroz, relleno sabor a chocolate (azúcar, aceite vegetal, cacao en polvo, emuls. Lecitina de soja, saborizante, etilvainillina), harina de maíz desgerminada, azúcar, almidón de maíz modificado, cacao en polvo, sal, agreg. Bicarbonato de sodio.	--	--	<2,5(RB) <10	15,2(N) >490

