



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Cellerino, Karina; Binaghi, María Julieta; Ambrosi, Vanina; López, Laura Beatriz

**Detección de trazas de soja y de leche en productos libres de
gluten: desarrollo de dos enzoinmunoensayos competitivos**

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 54, núm. 4, 2020, Octubre-, pp. 395-406

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53564616003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEH
redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Detección de trazas de soja y de leche en productos libres de gluten: desarrollo de dos enzimoimmunoensayos competitivos

► Karina Cellerino^{1a*}, María Julieta Binaghi^{2a}, Vanina Ambrosi^{3a},
Laura Beatriz López^{2a}

¹ Licenciada en Gestión de Agroalimentos, Dra. de la Universidad de Buenos Aires, área Bromatología.

² Bioquímica, Dra. de la Universidad de Buenos Aires, área Bromatología.

³ Licenciada en Biotecnología, Ingeniera en Alimentos, Dra. de la Universidad de Buenos Aires, área Bromatología.

^a Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología. Cátedra de Bromatología. Junín 956. C.P. 1113. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de dos enzimoimmunoensayos competitivos (EIC) para la detección de trazas de soja y de leche en productos libres de gluten. Como anticuerpos primarios se utilizaron antisueros policlonales de conejo específicos contra proteínas de soja o de leche. Se determinaron las concentraciones óptimas de antígenos a inmovilizar en la placa y las concentraciones de anticuerpos primarios a utilizar en la competencia. Las curvas de calibración se ajustaron utilizando concentraciones crecientes de un extracto de producto de soja y de un extracto de leche descremada en polvo. El producto de soja y la leche descremada se extrajeron con *buffer* Tris-HCl 0,0625 M con dodecilsulfato de sodio al 3% y sulfito de sodio 0,1 M al 2%. Se evaluaron los parámetros de validación: linealidad, límites de detección y de cuantificación, recuperación y precisión en el día y entre días, los cuales resultaron adecuados. Se analizaron 9 productos libres de gluten con los EIC desarrollados y con *kits* de ELISA comerciales. Ambos EIC se comportaron de manera similar con respecto a los *kits* comerciales. Los EIC permitieron confirmar la presencia de leche en las muestras que la declaraban. En algunas muestras que no declaraban ni leche ni soja, ambos EIC detectaron su presencia (resultados confirmados con los *kits* comerciales). Los EIC desarrollados poseen menor costo que los *kits* y, por lo tanto, éstos podrían utilizarse como métodos de *screening*. Cuando esta metodología resulte negativa, debe confirmarse con un método más sensible (comercial) para garantizar la ausencia de proteínas de soja o de leche.

Palabras clave: Alérgenos; Leche; Soja; Dieta sin gluten; Ensayo de inmunoadsorción enzimática

Detection of traces of soy and milk in gluten-free products: development of two competitive enzyme immunoassays

Abstract

The aim of this study was to develop two competitive enzyme immunoassays (CEI) to detect the presence of traces of soy and milk in gluten-free products. Specific rabbit polyclonal antisera against soy protein and other against

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

milk protein were used as primary antibodies. Optimal antigen concentrations to be immobilized on the plate and primary antibody concentrations to be used in competition were determined. The calibration curves were fitted using increasing concentrations of an extract of soy product and of defatted milk powder. The soy product and the defatted milk were extracted with Tris-HCl buffer 0,0625 M with 3% sodium dodecyl sulfate and 2% sodium sulfite 0.1 M. The validation parameters were evaluated: linearity, limit of detection and quantification, recovery and precision on the day and in between days. They were appropriate. Nine commercial samples of gluten-free products were analyzed with these developed CEI and commercial ELISA kits. It was observed that both CEI behaved similarly with respect to the commercial kits. The enzyme immunoassays confirmed the presence of milk in samples that declared it. In some samples that did not declare the presence of milk or soy, both enzyme immunoassays detected their presence –these results were confirmed using commercial kits. The developed CEI have a lower cost than the commercial kits, so these could be used as screening methods. When this methodology is negative, it should be confirmed with a more sensitive (commercial) method to ensure the absence of soy or milk protein.

Keywords: Allergens; Milk; Soy; Gluten-free diet; Enzyme immunoassay

Detecção de vestígios de soja e leite em produtos livres de glúten: desenvolvimento de dois enzimoimunoensaios competitivos

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de dois enzimoimunoensaios competitivos (EIC), para a detecção de vestígios de soja e leite em produtos livres de glúten. Anticorpos policlonais de coelho específicos contra proteínas de soja ou de leite foram utilizados como anticorpos primários. Foram determinadas as concentrações ótimas de antígenos a serem imobilizados na placa e as concentrações de anticorpos primários a serem utilizadas na competição. As curvas de calibração foram ajustadas usando concentrações crescentes de um extrato de produto de soja e de um extrato de leite em pó desnatado. O produto de soja e o leite desnatado foram extraídos com tampão Tris-HCl 0,0625 M com dodecil sulfato de sódio a 3% e sulfito de sódio 0,1 M a 2%. Os parâmetros de validação foram avaliados: linearidade, limite de detecção e quantificação, recuperação e precisão no dia e entre os dias, os quais resultaram adequados. Nove produtos livres de glúten foram analisados com os EIC desenvolvidos e com kits de ELISA comerciais. Os dois EIC se comportaram de maneira semelhante em relação aos kits comerciais. Os EIC permitiram confirmar a presença de leite nas amostras que o declararam. Em algumas amostras que declaravam nem leite nem soja, ambos os EIC detectaram sua presença (resultados confirmados usando kits comerciais). Os EIC desenvolvidos têm um custo menor que os kits, portanto, eles poderiam ser utilizados como métodos de triagem. Quando esta metodologia é negativa, deve ser confirmada com um método mais sensível (comercial) para garantir a ausência de proteínas da soja ou do leite.

Palavras-chave: Alérgenos; Leite; Soja; Dieta livre de glúten; Ensaio de imunoabsorção enzimática

Introducción

Existen 8 grupos de alimentos que son responsables del 90% de las alergias alimentarias. Estos alimentos son: leche, huevo, soja, trigo, maní, frutos secos, pescado y crustáceos (1). Los alérgenos alimentarios son una amenaza real para las personas alérgicas, principalmente si éstos no se encuentran declarados en la etiqueta de los alimentos. El rotulado correcto de alimentos es indispensable para proporcionar información a los consumidores y, en especial, a aquellos que presentan alergias a los alimentos, dado que la exposición a proteínas alergénicas puede resultar de la pre-

sencia de alérgenos no declarados, por adulteración, fraude o contacto cruzado no controlado. La detección de trazas de alérgenos en alimentos es una tarea muy difícil. Las causas de esta dificultad son principalmente dos: los bajos niveles en que pueden estar presentes y la posible interferencia de la matriz en su detección (2).

Existe la necesidad de contar con metodologías accesibles económicamente que permitan la detección de proteínas alergénicas en alimentos. El método más utilizado es el ELISA (3).

Recientemente se ha estudiado que las proteínas alergénicas en alimentos procesados sometidos a ele-

vadas temperaturas, altas presiones, pH extremos, son apenas detectadas con los métodos de ELISA, debido a su alteración estructural, que incluyen la desnaturalización y la formación de complejos insolubles. Se han estudiado diferentes soluciones extractivas, entre ellas soluciones que contienen agentes desnaturalizantes y reductores, dodecilsulfato de sodio (SDS) y sulfito de sodio, que se consideran adecuadas para la correcta extracción de proteínas alergénicas, sobre todo en alimentos procesados (4).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar dos enzimoimmunoensayos competitivos (EIC) utilizando una solución extractiva con SDS y sulfito de sodio, para detectar la presencia de trazas de soja y de leche en productos libres de gluten.

Materiales y Métodos

Materias primas proteicas

Se trabajó con un producto de soja con 63% de proteínas y con leche descremada en polvo de origen comercial con 34% de proteínas.

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

Se elaboraron sistemas modelo de harina de arroz con el agregado de productos de soja o de leche en polvo. Se analizaron dos sistemas modelo con 150 y 50 ppm de proteínas de productos de soja y dos sistemas modelo con 150 y 50 ppm de proteínas 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 I. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

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

Para la extracción de proteínas se pesaron 30 mg de productos de soja y 60 mg de leche en polvo. Para la extracción de proteínas de productos libres de gluten se pesaron 200 mg de cada uno. Se agregaron 2 mL de la solución extractiva de proteínas totales. Dicha solución contenía Tris-HCL 0,0625 M con 3% de SDS y 2% de sulfito de sodio 0,1 M. Luego se agitó con varilla. Se calentaron los tubos en baño de agua a 100 °C durante 5 min. Transcurridos 2 min

en el baño se volvió a agitar con varilla. El contenido de los tubos de extracción fue trasvasado a tubos de plástico. Los extractos del producto de soja y de la leche en polvo se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 min; en el caso de productos farináceos la centrifugación se realizó a 11000 r.p.m. durante 15 min. Los sobrenadantes se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Para la cuantificación de proteínas de soja y leche de cada extracto y el cálculo de la recuperación obtenida se utilizó el método de Lowry (5).

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 los anticuerpos primarios (antisueros policlonales de conejo específicos de proteínas de soja o de leche) a utilizar en la competencia. Se obtuvieron anticuerpos específicos de proteínas de soja y de proteínas de leche inmunizando a conejos con los extractos de dichas proteínas tratadas con la solución de Tris-HCL 0,0625 M con 3% de SDS y 2% de sulfito de sodio 0,1 M siguiendo el protocolo de Rozenfeld *et al.* (6).

Sensibilización de la placa

La sensibilización se refiere al pegado del antígeno (extracto de soja o leche) en la placa. Se emplearon placas para microELISA (Maxisorp®, NUNC, Dina-marca).

Se sembraron en la placa 100 µL por pocillo de dos concentraciones diferentes de antígeno: una concentración de 1 µg y otra de 10 µg de antígeno/100 µL de *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6 (*buffer* carbonato de sodio 0,015 M, bicarbonato de sodio 0,035 M). Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4 °C durante 24 h. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado (NaCl al 0,9% p/v y Tween 20 al 0,0125% v/v en agua). Se sembraron 200 µL de solución de bloqueo (gelatina bovina al 1% p/v y Tween 20 al 0,1% v/v en TBS) en cada pocillo. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37 °C, con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Posteriormente se sembraron 100 µL de diferentes diluciones del anticuerpo primario diluido con *buffer* TBS con Tween 20 al 0,1% v/v y 3% de polietilenglicol. Se ensayaron diluciones de anticuerpos primarios entre 1/156 y 1/10000 en el enzimoimmunoensayo para la detección de soja y entre 1/12500 y 1/1600000 para la detección de leche. En los pocillos correspondientes al blanco (blanco 1 y blanco 10) se sembró solamente el *buffer* utilizado para la dilución de anticuerpos primarios. Se incubó una hora en cá-

mara húmeda, en oscuridad a 37 °C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 100 µL de anticuerpos secundarios, anti-IgG conjugados con fosfatasa alcalina de *Bio-Rad* (el mismo fue obtenido en cabras inmunizadas con IgG de conejo purificada) diluidos 1:3000 con *buffer* TBS con 0,1% v/v de Tween 20 y 3% de polietilenglicol. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37 °C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 100 µL de solución de revelado (paranitrofenilfosfato 1 mg/mL en un *buffer* que contenía 10% v/v de dietanolamina y 0,01% de cloruro de magnesio, pH 9,8). Se incubó 20 minutos en cámara húmeda, en oscuridad a 37 °C con agitación. Se midió la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 405 nm. Los valores de absorbancia fueron corregidos con la absorbancia promedio correspondiente al blanco. Se graficaron las curvas de absorbancia corregida *versus* ln 1/dilución de anticuerpos primarios utilizando una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010.

Validación del EIC para la detección y cuantificación de soja y de leche en harina de arroz

Linealidad

Para la determinación de la linealidad del método 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 y 2% de sulfito de sodio. Se trabajó con cinco puntos 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 µg de proteína de soja o de leche/mL de *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6.

Dado que en este ensayo se utilizó un *buffer* de extracción que contenía agentes reductores y desnaturizantes (sulfito de sodio y SDS) que interfieren en la reacción antígeno-anticuerpo, se evaluó la dilución de la solución extractiva que no afectara la unión antígeno-anticuerpo. De esta manera los componentes de la solución extractiva fueron diluidos 1:181 en el caso del EIC para detección de soja y 1:204 para el EIC para detección de leche, en todos los puntos de la curva. Las diluciones se realizaron en *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6.

Una vez realizadas las diluciones de la curva se prepararon los preincubados en tubos Eppendorf que contenían 75 µL de la dilución de anticuerpos primarios seleccionada en la puesta a punto del ensayo y 75 µL de cada una de las diluciones de los puntos de la curva previamente realizados. Además, se preparó un control inespecífico (I) que contenía 200 µL del *buffer* utilizado para diluir los anticuerpos primarios y un control de "unión máxima" (M) que contenía 100 µL del *buffer* utilizado para diluir los anticuerpos primarios y 100 µL de la di-

lución de los anticuerpos primarios seleccionada en la puesta a punto del ensayo. Se incubaron los preincubados a 4 °C en cámara húmeda y en oscuridad durante 24 h. Paralelamente se sensibilizó una placa de ELISA sembrando en la misma la concentración de antígenos (proteínas de soja o de leche) previamente seleccionada en la puesta a punto del ensayo. Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4 °C durante 24 h. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 200 µL de solución de bloqueo en cada pocillo. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37 °C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Posteriormente se sembraron 100 µL de los preincubados en los pocillos. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37 °C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se continuó con el protocolo como se describió previamente en el ítem sensibilización de la placa. Los valores de absorbancia fueron corregidos con la absorbancia promedio correspondiente al control inespecífico I.

A continuación, se construyó una curva de calibración de absorbancia corregida *versus* ln concentración de soja o leche (µg de proteínas de soja o de leche/mL).

Los *tests* utilizados para el análisis estadístico de los resultados fueron: método de Bartlett, para homogeneidad de varianzas y análisis de regresión lineal (7).

Límite de detección y límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección y de cuantificación del método 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 1:181 (soja) y 1:204 (leche) con *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6 de cada uno de los extractos. La concentración de analitos en cada muestra analizada se determinó según el 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 como el valor medio más tres veces el desvío estándar. El límite de cuantificación se calculó como el valor medio más diez veces el desvío estándar.

A) Cálculo de la concentración de proteína de soja/leche en harina de arroz

Por interpolación en la curva de calibración se obtienen 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 µg/1000 mg de harina de arroz se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de proteína de soja o de leche en harina de arroz} - \mu\text{g}/1000 \text{ mg} = \frac{\text{Cantidad de prot. de soja o de leche (curva)} - \mu\text{g}(1) \times \text{V-mL}(2) \times 1000\text{-mg}(3)}{5,5 \text{ o } 4,9 - \mu\text{L}(4) \times \text{P-mg}(5)} \quad (\text{A})$$

- 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 tomó de los 1600 μL de sobrenadante y se diluyeron 1:181 (soja) y 1:204 (leche). Los 5,5 μL (soja) y los 4,9 μL (leche) se llevaron a 1000 μL con *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6.
- 5) Peso de harina de arroz que se extrajo con la solución extractiva de proteínas totales: 200 mg.

De esta manera se calcularon los μg de proteína de soja o de leche en 1000 mg de harina de arroz: ppm de proteína de soja o de leche.

Precisión intradía e interdías

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 proteínas de soja y tres muestras con 50 ppm de proteínas de leche). Cada muestra se extrajo por simplificado como se describió anteriormente ($n=3$). Cada extracto se analizó con el EIC por duplicado, realizando, previo a la preparación de los preincubados, las diluciones 1:181 (soja) y 1:204 (leche). Alícuotas de 5,5 μL (soja) y 4,9 μL (leche) se llevaron a 1000 μL con *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6.

La concentración de analito en cada muestra estudiada se determinó según el cálculo (A).

Para el procesamiento estadístico se promediaron los valores del analito de las tres muestras, se calculó el desvío estándar y el coeficiente de variación (CV). El CV corresponde a la precisión del método en el día. Para evaluar la precisión interdías se realizó el mismo procedimiento que se describió previamente en el ensayo intradía en tres días diferentes ($n=9$). Para el procesamiento estadístico se calculó el promedio, el desvío estándar y el coeficiente de variación (CV) de los nueve valores obtenidos. El CV corresponde a la precisión del método entre días.

Se adoptó como criterio de aceptación que el CV de la precisión intradía y el CV de la precisión interdías no superara el 15% (8).

Recuperación

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

que se extrajeron por triplicado como se describió anteriormente. Se analizaron por duplicado realizando las diluciones 1:181 (soja) y 1:204 (leche) de cada una de las muestras antes de la preparación de los preincubados. La concentración del analito en cada muestra analizada se determinó según el cálculo (A), previamente descrito. Se calculó el valor del analito de cada extracto. Se promediaron los tres valores del analito para cada sistema modelo.

El porcentaje de recuperación se calculó mediante la fórmula que se describe a continuación:

$$\% \text{ de recuperación} = \text{valor obtenido} \times 100 / \text{valor teórico}$$

- Valor obtenido: concentración de proteínas de soja o de leche obtenida al aplicar el EIC para los sistemas modelo de 50 y 150 ppm de proteínas de soja o de leche, respectivamente.
- Valor teórico: 50 y 150 ppm de proteínas de soja o de leche, respectivamente.

Luego se promediaron las recuperaciones de los sistemas modelo. Se consideraron valores adecuados de recuperación entre 70 y 130% (9).

ELISA comerciales

Las proteínas de leche y de soja fueron detectadas y cuantificadas con diferentes *kits* comerciales: *Ridascreen® Fast soy Protein R-Biopharm*, fabricado en Alemania y *Veratox® Allergen Total Milk Neogen*, fabricado en EE.UU. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado siguiendo los protocolos de cada *kit*.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de cada *kit* fueron:

- a) Proteínas de leche: *Veratox® Allergen Total Milk de Neogen* LD=1 ppm de leche descremada en polvo y LC=2,5 ppm de leche descremada en polvo con un rango de cuantificación de 2,5-25 ppm de leche descremada en polvo (10).
- b) Proteínas de soja: *Ridascreen® Fast soy Protein R-Biopharm* LD=0,31 ppm de proteínas de soja y LC=2,5 ppm de proteínas de soja (11).

Resultados

EIC para la detección de trazas de soja en harina de arroz

• Cuantificación de proteínas de soja en el extracto

La concentración de proteínas de soja obtenida en el extracto fue de 9,0 mg de proteínas de soja/mL de

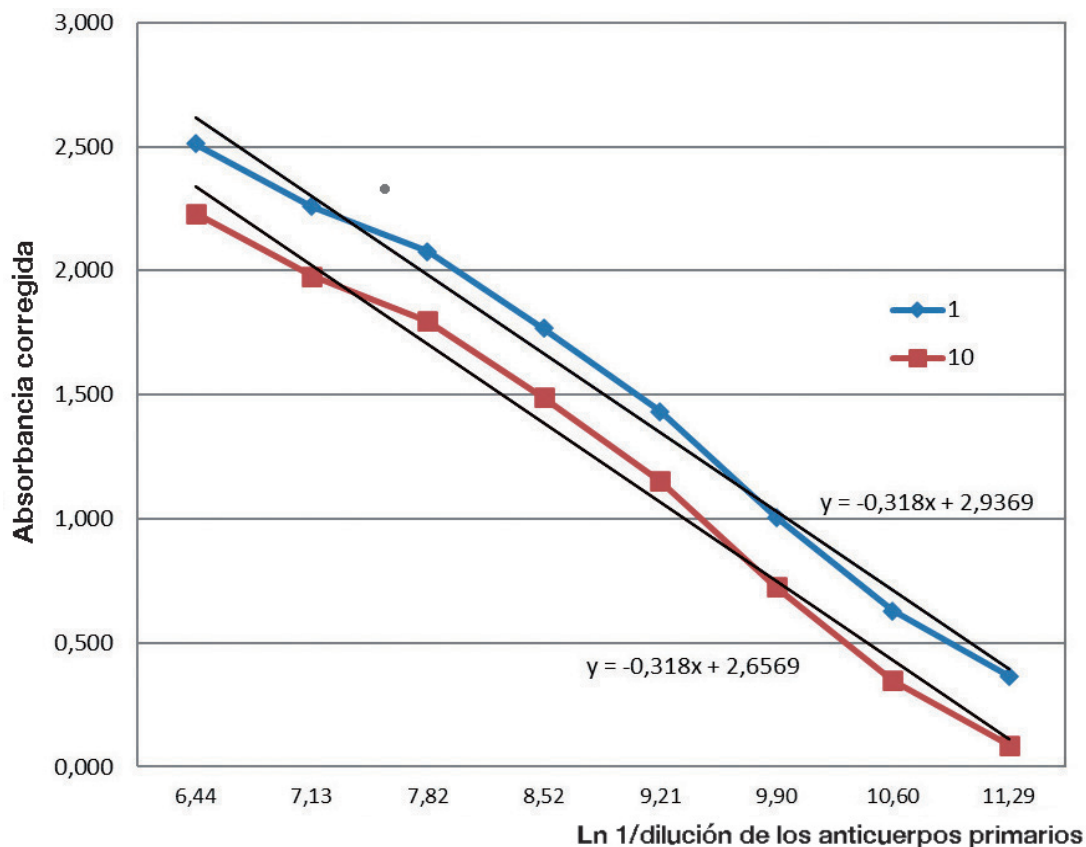


Figura 1. Curvas obtenidas para la determinación de la concentración óptima de antígeno soja y la dilución de los anticuerpos primarios a utilizar en el EIC final.

solución extractiva. La concentración teórica en dicho extracto sería de 9,4 mg de proteína de soja/mL de solución extractiva. De manera que el porcentaje de recuperación fue del 96%, es decir, el 96% de las proteínas de soja resultaron solubles en la solución extractiva de proteínas totales.

• Puesta a punto del EIC

En la Figura 1 se observan las dos curvas obtenidas en la puesta a punto del EIC para la determinación de la concentración óptima de antígeno soja y la dilución de anticuerpos primarios a utilizar en el ensayo final.

Para la selección de la concentración óptima de antígeno a utilizar en el ensayo se elige la curva con mayor pendiente. Dado que en este caso ambas curvas presentaron igual pendiente se eligió la de menor concentración de antígeno (1 µg de proteína de soja/100 µL de *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6). Para la selección de la dilución óptima de anticuerpos primarios a utilizar en la competencia, se seleccionó la zona más sensible a cambios en la curva previamente elegida (la correspondiente a 1 µg de proteína de soja/100 µL de *buffer*) y se obtuvo de esta manera un método con adecuada sensibilidad. La dilución de anticuerpos primarios seleccionada para

utilizar en la competencia fue de 1/5000 (ln 1/dilución anticuerpos primarios: 8,52).

• Validación

Linealidad

Para establecer la linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 µg de proteína de soja/mL (Fig. 2). 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 las 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 (µg proteína de soja/mL) utilizando el programa Infostat profesional versión 2004d.1 desarrollado por la Universidad Nacional de Córdoba. Se obtuvo un valor de $F=2,68$ (CM desvío de la linealidad/CM error puro) y $p=0,1289$ con lo cual se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 µg proteína de soja/mL se comportó en forma lineal. La recta obtenida presentó una pendiente de -0,07 con un límite inferior 95% (LI) de -0,08 y un límite superior 95% (LS) de -0,06, una ordenada al origen de 2,05 con LI=2,03 y LS=2,08 y un coeficiente de correlación de 0,98.

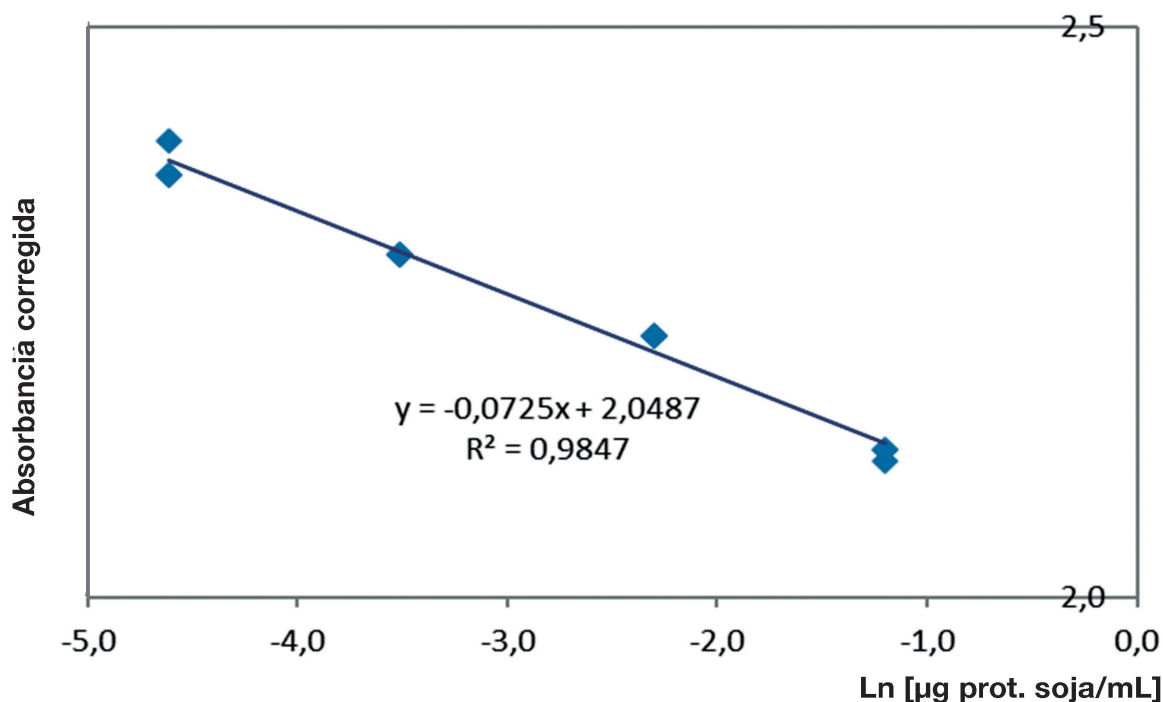


Figura 2. Curva de calibración. Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de soja (μg proteína de soja/mL).

A los valores límites de la curva de calibración ($0,01 \mu\text{g}$ proteína de soja/mL y $0,3 \mu\text{g}$ proteína de soja/mL) se les aplicó el cálculo (A) presentado previamente para calcular el rango de trabajo correspondiente a proteína de soja en harina de arroz. El rango de trabajo obtenido fue 7-220 ppm de proteína de soja en mezcla con harina de arroz.

Límite de detección y límite de cuantificación

Los valores de los límites de detección y de cuantificación fueron 4,0 y 10,0 ppm de proteínas de soja, respectivamente.

Precisión intradía e interdías

Las precisiones del método en el día y entre días, expresadas como coeficiente de variación (CV) fueron 7,0 ($n=3$) y 3,4 ($n=9$), respectivamente.

Recuperación

Se analizaron dos sistemas modelo de harina de arroz con 50 y 150 ppm de proteína de producto de soja. Se calculó la recuperación del método y la misma fue de 107%.

EIC para la detección de trazas de leche en harina de arroz

• Cuantificación de proteínas de leche en el extracto

La concentración de proteína de leche obtenida en el extracto de solución extractiva de proteínas totales fue de 12,0 mg de proteínas de leche/mL de solución extractiva. La concentración teórica en dicho extracto

sería de 12,0 mg. De manera que el porcentaje de recuperación fue del 100%.

• Puesta a punto del EIC

En la Figura 3 se observan las curvas correspondientes a 1 μg y a 10 μg de proteínas de leche/100 μL de *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6 que se obtuvieron en la puesta a punto del ensayo.

La concentración de antígeno seleccionada fue de 1 μg de proteínas de leche /100 μL de *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6. La dilución de anticuerpos primarios seleccionados para utilizar en la competencia fue de 1/50000 (ln 1/dilución de anticuerpos primarios: 10,82).

• Validación

Linealidad

Para establecer la linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg de proteínas de leche/mL (Fig. 4). A los valores de absorbancias corregidas obtenidas para cada nivel de concentración se aplicó un *test* de homogeneidad de varianzas. No se encontraron diferencias significativas entre las 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 leche (μg proteínas de leche/mL) utilizando el programa Infostat. Se obtuvo un valor de $F=1,035$ (CM desvío de la linealidad/CM error puro) y $p=0,3985$ con lo cual también se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg de proteínas

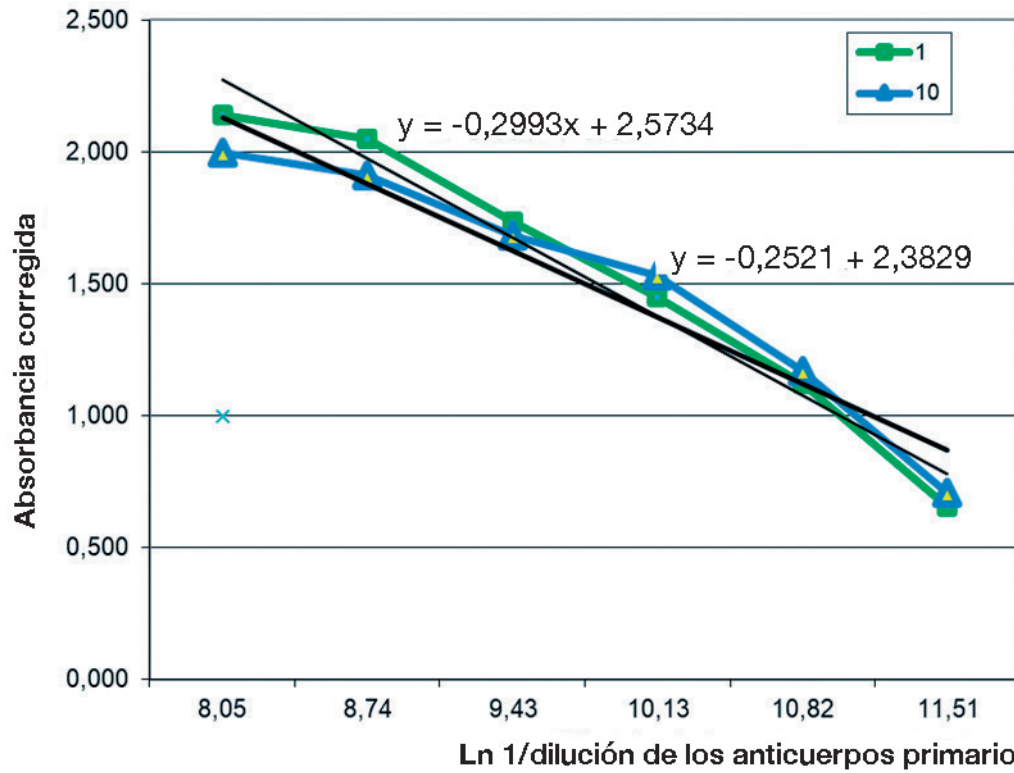


Figura 3. Curvas obtenidas para la determinación de la concentración óptima de antígeno leche y la dilución de los anticuerpos primarios a utilizar en el EIC final.

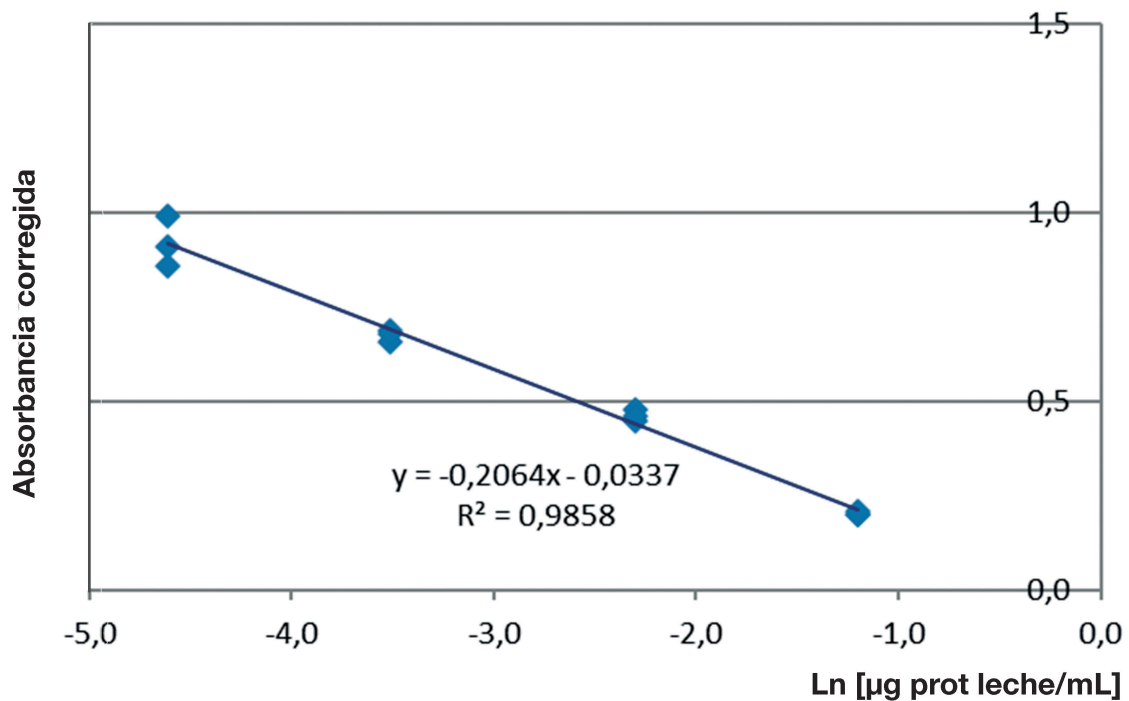


Figura 4. Curva de calibración. Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de leche (µg proteína de leche/mL).

de leche/mL se comportó en forma lineal. La recta obtenida presentó una pendiente de -0,207 con un límite inferior 95% (LI) de -0,225 y un límite superior 95% (LS) de -0,190; ordenada al origen -0,036 con LI= -0,092 y LS=0,019 y un coeficiente de correlación de 0,986.

El rango de trabajo fue de 16-490 ppm de proteínas de leche en mezcla con harina de arroz.

Límite de detección y límite de cuantificación

Los valores de los límites de detección y de cuantificación fueron 11,0 y 27,0 ppm de proteínas de leche, respectivamente.

Precisión intradía e interdías

Las precisiones del método en el día y entre días, expresadas como coeficiente de variación (CV) fueron 10,0 (n=3) y 12,0 (n=9), respectivamente.

• Recuperación

Se analizaron dos sistemas modelo de harina de arroz con 50 y 150 ppm de proteínas de leche en polvo. Se calculó la recuperación del método, que fue del 108%. Esta recuperación resultó apropiada.

Análisis de muestras comerciales con los EIC desarrollados y con kits comerciales

Se analizaron nueve muestras comerciales de productos libres de gluten con los EIC desarrollados, con los kits comerciales *Ridascreen® Fast soy Protein R-Biopharm* y *Veratox® Allergen Total Milk de Neogen*.

En la Tabla I se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja y de leche en productos libres de gluten utilizando los EIC desarrollados y los kits de ELISA comerciales.

Tabla I. Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja y de leche en productos libres de gluten, utilizando dos enzimoimmunoensayos competitivos (EIC) desarrollados y kits de ELISA comerciales: *R-Biopharm (RB)* y *Neogen (N)*

Muestra	Denominación de venta	Lista de ingredientes	Declaración de alérgenos	Frase de advertencia	ELISA SOJA • <i>R-Biopharm (RB)</i> (ppm proteína de soja) • EIC (ppm proteína de soja)	ELISA LECHE • <i>Veratox/NEOGEN (N)</i> (ppm leche en polvo) • EIC (ppm proteína de leche)
1	Fideos secos de harina de arroz	Harina de arroz, huevo deshidratado en polvo, almidón de maíz	----	----	<2,5 (RB) <10 (EIC)	<2,5 (N) <27 (EIC)
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 (EIC)	<2,5 (N) <27 (EIC)
3	Pasta seca de harina de garbanzo libre de gluten - sin TACC	Harina de garbanzo y goma xántica (INS 415/espesante)	----	----	>20 (RB) 36 (EIC)	<2,5 (N) <27 (EIC)
4	Galletitas dulces sabor a coco libres 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 (EIC)	>25 (N) >490 (EIC)
5	Snack crocante de arroz integral sabor "finas hierbas"	Arroz integral, aroma artificial (sabor a finas hierbas), sal y aceite vegetal	----	----	<2,5 (RB) <10 (EIC)	<2,5 (N) <27 (EIC)

Tabla I. Continuación.

Muestra	Denominación de venta	Lista de ingredientes	Declaración de alérgenos	Frase de advertencia	ELISA SOJA • R-Biopharm (RB) (ppm proteína de soja) • EIC (ppm proteína de soja)	ELISA LECHE • Veratox/NEOGEN (N) (ppm leche en polvo) • EIC (ppm proteína de leche)
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 (EIC)	>25 (N) >490 (EIC)
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 (EIC)	<2,5 (N) <27 (EIC)
8	Tostadas de arroz libres de gluten	Arroz molido, leche en polvo descremada, azúcar y sal	Contiene leche	----	<2,5 (RB) <10 (EIC)	>25 (N) >490 (EIC)
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, ac reg: bicarbonato de sodio	----	----	<2,5 (RB) <10 (EIC)	15,2 (N) >490 (EIC)

Discusión y Conclusiones

Los parámetros de validación obtenidos de los dos EIC desarrollados resultaron adecuados. En cuanto a la linealidad se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 µg de proteínas de soja o de leche/mL se comportó en forma lineal. La recuperación y la precisión resultaron adecuadas, teniendo en cuenta los criterios de aceptación previamente mencionados.

En trabajos previos se realizó el desarrollo y la validación de EIC similares pero utilizando mercaptoetanol (ME) como agente reductor en la solución extractiva de proteínas, en lugar del sulfito de sodio utilizado en el presente trabajo. Además, en los anteriores EIC se utilizaron como anticuerpos primarios, sueros de conejos inmunizados con proteínas de soja o de leche que no habían sido tratadas con SDS ni con un agente reductor (12). Se debe destacar la efectividad del ME

y del SDS para la extracción de proteínas. El ME cliva puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteína de las proteínas y el SDS facilita la solubilización de las proteínas alterando las uniones no covalentes de las mismas (13). Sin embargo, dado que es reconocida la elevada toxicidad y el daño ambiental que provoca el ME (4), éste ha sido reemplazado por sulfito de sodio (menos tóxico y con menor impacto ambiental) para el desarrollo de estos EIC. Adicionalmente en los EIC desarrollados en el presente trabajo se utilizaron, como anticuerpos primarios, sueros de conejos inmunizados con extractos de soja o de leche extraídos con una solución extractiva que contenía SDS y sulfito de sodio como agente reductor. De acuerdo con trabajos realizados en Japón este modo de obtención de anticuerpos permite mejorar notablemente la *performance* de los EIC (4).

Si se comparan ambos EIC se observa una mejora en la sensibilidad si se trabaja con la solución extractiva

que contiene sulfito de sodio y con los anticuerpos obtenidos contra extractos proteicos que contienen SDS y sulfito de sodio. Los límites de detección y de cuantificación de los EIC para detectar soja en productos elaborados con harina de arroz, que utilizaban solución extractiva con SDS y ME fueron: LD=35 y LC=60 ppm de proteínas de soja mientras que para los EIC que utilizan solución extractiva con SDS y sulfito de sodio fueron: LD=4 y LC=10 ppm de proteínas de soja. En el caso de los EIC para detectar leche en productos elaborados con harina de arroz, que utilizaban solución extractiva con SDS y ME fueron: LD=25 y LC=50 ppm de proteínas de leche mientras que para los EIC que utilizan solución extractiva con SDS y sulfito de sodio fueron: LD=11 y LC=27 ppm de proteínas de leche (12).

En relación con las muestras, los EIC desarrollados en el presente trabajo resultaron ser métodos adecuados para la detección de la presencia de soja o de leche en todas las muestras que declaraban dichas materias primas y también en muestras que no las declaraban. Utilizando los *kits* comerciales de ELISA se pudieron corroborar dichos resultados. 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 2, que no declaraba soja en su lista de ingredientes, el EIC no detectó soja y sí se detectó soja con el *kit* de R-Biopharm. Esto se debe a que la sensibilidad del EIC desarrollado es menor que la del *kit* comercial. La muestra 3 no declaraba soja en su lista de ingredientes y ambos ensayos detectaron soja. Es posible que este alimento haya sufrido contacto cruzado con soja en su proceso de elaboración o bien que hubiera presencia de soja no declarada en algún ingrediente utilizado. En las muestras 4 y 9, que declaraban lecitina de soja en su lista de ingredientes, ninguno de los dos ensayos detectó soja. Es posible que en ambos casos se hayan utilizado lecitinas de soja bien purificadas sin restos de residuos proteicos.

En las muestras 1, 2, 3, 5 y 7, que no declaraban leche en su lista de ingredientes, ésta no se detectó con ninguno de los dos ensayos. En las muestras 4, 6 y 8, que declaraban leche en su lista de ingredientes, con ambos ensayos se detectó leche. La muestra 9 no declaraba leche en su lista de ingredientes y ambos ensayos la detectaron. La detección de leche en este caso pudo deberse a un contacto cruzado en el proceso de elaboración o bien a la presencia de leche no declarada en algún ingrediente utilizado.

Se considera que estos EIC desarrollados tienen dos ventajas fundamentales: resultan adecuados para cuantificar las proteínas alergénicas y además poseen un costo menor al de los *kits* comerciales de ELISA. Su costo se calculó en marzo de 2020 y fue de 0,50 dólares por pocillo. Por el contrario, en la Argentina, un *kit* comercial tiene un valor aproximado de 12 dólares por pocillo. Por lo tanto, los mismos poseen un valor considerablemente menor que los *kits* comerciales de ELISA.

En conclusión, observando los resultados obtenidos en este trabajo y dado el bajo costo de los EIC desarrollados, éstos se podrían utilizar como métodos de *screening*. Si una muestra presenta un resultado positivo con los EIC 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.

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 (14) (15).

Las industrias deben ser responsables en cuanto a la correcta declaración de los alérgenos en el rótulo de los alimentos envasados. Deben analizar e investigar la posible presencia de trazas de alérgenos en caso de sospechar un posible contacto cruzado en sus alimentos envasados o en las materias primas que utilizan para elaborar los mismos, evitando que las personas alérgicas consuman accidentalmente los alérgenos y puedan poner en riesgo su vida.

El desarrollo de métodos para la detección de alérgenos en alimentos se considera importante tanto para los industriales, como para las autoridades sanitarias que controlan los rótulos y para los consumidores. Si se presenta la necesidad de detectar trazas de proteínas de soja o de leche en alimentos libres de gluten, el uso de los EIC desarrollados en el presente trabajo sería una opción adecuada como método de *screening*.

Fuentes de financiación

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

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. KARINA CELLERINO
Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología.
Cátedra de Bromatología
Junín 956
1113 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina.
Correo electrónico: kcellerino@ffyb.uba.ar

Referencias bibliográficas

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 (Pt 14): 2304-19.
2. Koeberl M, Clarke D, Allen KJ, Fleming F, Katzer L, Lee NA, *et al.* Food allergens management in Australia. *J AOAC Int* 2018; 101 (Pt 1): 60-9.
3. López MC. Food allergen labeling: a Latin American approach. *J AOAC Int* 2018; 101 (Pt 1): 14-6.
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 Sep; 408 (Pt 22): 5973-84.
5. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
6. Rozenfeld P, Docena G, Añón M, Fossati C. Detection and identification of a soy protein component that cross reacts with caseins from cow milk. *Clin Exp Immunol* 2002; 130 (Pt 1): 49-58.
7. Box G, Hunter W, Stuart Hunter J. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. México D.F.: Editorial Reverté S.A.; 1999.
8. Huber L. Validation of analytical methods. Germany. Agilent Technologies, 2010.
9. Gatti M, Ferretti C. Soy allergen detection. En: Popping B, Diaz Amigo C, Hoenicke K, editors. Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists. Capítulo 17. Canadá: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. p. 335-48.
10. Neogen Veratox® for total milk allergen. 2016 (internet). (Fecha de acceso: 1 de marzo de 2020). Disponible en: http://foodsafety.neogen.com/pdf/procedures/8470_pro.pdf.
11. R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Soya. 2018.(internet) (Fecha de acceso: 1 de marzo de 2020). Disponible en: <https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2016/10/R7102-FAST-Soya-16-07-18.pdf>.
12. Cellerino K, Cagnasso C, Greco C, Docena G, Polenta G, Ferreyra V, *et al.* Protein ingredients control in gluten free products using SDS-PAGE, developed competitive enzyme immunoassays and commercial ELISA kits. *WJFST* 2018; 2 (Pt 1): 12-8.
13. Watanabe Y, Aburatani K, Mizumuraz T, Sakai M, Murooka S, Mamegosi S, *et al.* Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and reducing agent. *J Immunol Methods* 2005 May; 300 (1-2): 115-23.
14. Do AB, Khuda SE, Sharma MG. Undeclared food allergens and gluten in commercial food products analyzed by ELISA. *J AOAC Int* 2018; 101 (Pt 1): 23-35.
15. Cellerino K. Metodología de control en el análisis de alérgenos de leche, soja y huevo en productos cárnicos y farináceos. (Tesis doctoral). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; 2016.

Recibido: 21 de mayo de 2020

Aceptado: 28 de julio de 2020