

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD, NUTRICIÓN,
BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA
CÁTEDRA DE BROMATOLOGÍA

**Metodología de control para el análisis de alérgenos de
leche, soja y huevo en productos cárnicos y farináceos**

Lic. Karina Cellerino
Tesis doctoral

Directora de Tesis:
Prof. Dra. Laura Beatriz López

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires**

2016

A mis hijas, Milena y Lucilla cuyas
sonrisas me llenan de ánimo y fuerza

A mi marido, Diego por su invaluable amor y constante compañía

A mi familia y a mis padres, Silvia y
Jorge por sus ejemplos de
perseverancia y por estar a mi lado en
cada momento de la vida

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Beatriz López por su esfuerzo, dedicación, paciencia y motivación que han sido fundamentales para poder llegar hasta la meta y principalmente por su cariño.

Al Dr. Guillermo Docena del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos IIFP, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, por sus consejos y sugerencias en el desarrollo de los enzimoimmunoensayos y por facilitarme los antisueros policlonales de soja y de leche.

Al Dr. Gustavo Polenta y a la Ing. Vanina Ambrosi del Laboratorio de Compuestos Proteicos, Instituto de Tecnología de Alimentos, del Centro de Investigación de Agroindustria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por sus asesoramientos en la técnica de Immunoblotting y por facilitarme los antisueros policlonales de huevo.

A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por otorgarme las becas de investigación que permitieron la realización de este trabajo.

A las distintas empresas que durante estos años enviaron sus muestras para ser analizadas y nos permitieron comprobar la utilidad de estas investigaciones.

A la Dra. Carolina Cagnasso y a la Dra. María Julieta Binaghi por enseñarme y aconsejarme durante esta etapa.

A la Farm. Viviana Rodríguez por brindarme su conocimiento y experiencia durante la validación de los enzimoimmunoensayos desarrollados.

A todos mis compañeros de la Plataforma de Alérgenos en Alimentos, por su acompañamiento durante esta etapa.

A todos mis compañeros de Bromato, por su acompañamiento, apoyo y confianza brindados durante esta etapa.

A Cecilia, Paula, Mariela, Carola y Silvia por hacer que mi lugar de trabajo fuera un sitio agradable y divertido, y principalmente por su amistad.

Los resultados presentados en la tesis forman parte de los siguientes trabajos:

Alcances de SDS-PAGE y blotting en la detección de alérgenos de leche en productos cárnicos. Cellerino K, Binaghi M, Cagnasso C, Mambrín M, Docena G, Polenta G, Valencia M y López L. Trabajos libres completos: 4- Cellerino 1, Pág. 1 - 5. XIII Congreso CYTAL – AATA. ISBN 978-987-22165-4-2. 2011.

Alcances de SDS-PAGE y blotting en la detección de alérgenos de soja en productos cárnicos. Cellerino K, Binaghi M, Cagnasso C, Docena G, Polenta G, Valencia M y López L. Trabajos libres completos: 4- Cellerino 2, Pág. 1 - 5. XIII Congreso CYTAL – AATA. ISBN 978-987-22165-4-2. 2011.

Comparación de SDS-PAGE y métodos inmunoquímicos para la detección de proteínas de soja en productos cárnicos crudos y cocidos. Cellerino K, Binaghi M, Cagnasso C, Docena G y López L. Revista Chilena de nutrición. 39 (3): 52-57. 2012.

Detección de soja en sistemas modelo de fiambres cocidos con soja y en productos cárnicos comerciales utilizando métodos inmunoquímicos. Cellerino K, Binaghi M, Cagnasso C, Docena G, López L. IV Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos: libro de trabajos completos: análisis físicos, químicos y sensoriales / María Verónica Varoni ... (et al.); edición literaria a cargo de María Verónica Varoni ... (et al.) – 1ª ed – Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, 2013. E-Book. ISBN 978-950-33-1070-0. Fecha de catalogación: 25/09/2013.

Milk protein detection in raw and cooked meat products using immunochemical methods. Cellerino K, Binaghi M, Cagnasso CE, Docena G, López L. Journal of Food and Nutrition Sciences. 2(5): 236-242. 2014.

ÍNDICE

1) INTRODUCCIÓN	1
1.1) Alergias	1
1.2) Alergias Alimentarias	1
1.3) Alérgenos alimentarios	2
1.3.1) Alérgenos de leche de vaca	3
1.3.2) Alérgenos de soja	3
1.3.3) Alérgenos de huevo	3
1.4) Legislación del etiquetado de alérgenos	4
1.4.1) Legislación Internacional	4
1.4.2) Legislación en Argentina y Mercosur	9
1.5) Métodos analíticos para la detección de alérgenos en alimentos	13
1.5.1) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	13
1.5.2) Inmunoblotting	15
1.5.3) ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	16
1.5.4) Inmunocromatografía	17
1.5.5) Biosensores	17
1.5.6) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
1.5.7) Espectrometría de masa	20
1.6) Alérgenos en productos cárnicos	21
1.7) Alérgenos en productos farináceos	22
2) OBJETIVOS GENERALES	24
2.1) Objetivos particulares	24
3) MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1) Muestras	26
3.1.1) Materias primas proteicas	26
3.1.2) Productos cárnicos	26
3.1.2.1) Sistemas modelo de productos cárnicos crudos	26
3.1.2.1.1) Sistemas modelo crudos con agregado de leche en polvo	26
3.1.2.1.2) Sistemas modelo crudos con agregado de suero lácteo	26
3.1.2.1.3) Sistemas modelo crudos con agregado de producto de soja	26
3.1.2.1.4) Sistemas modelo crudos con agregado de clara de huevo	26
3.1.2.2) Sistemas modelo de productos cárnicos cocidos	27
3.1.2.2.1) Sistemas modelo cocidos con agregado de leche en polvo	27
3.1.2.2.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de suero lácteo	27
3.1.2.2.3) Sistemas modelo cocidos con agregado de producto de soja	27
3.1.2.2.4) Sistemas modelo cocidos con agregado de clara de huevo	28
3.1.2.3) Muestras provistas por la industria	28
3.1.2.4) Muestras comerciales	29
3.1.2.5) Muestras analizadas en el desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de soja en productos cárnicos	29
3.1.2.5.1) Sistemas modelo con agregado de producto de soja	29

3.1.2.5.2) Muestras comerciales	29
3.1.3) Productos farináceos con huevo	30
3.1.3.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de huevo	30
3.1.3.2) Muestras provistas por la industria	30
3.1.3.3) Muestras comerciales	31
3.1.3.4) Muestras analizadas en el desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de huevo en pastas secas	32
3.1.3.4.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de huevo	32
3.1.3.4.2) Muestras comerciales	32
3.1.4) Productos farináceos con soja	32
3.1.4.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de soja	32
3.1.4.2) Muestras provistas por la industria	32
3.1.4.3) Muestras comerciales	33
3.1.4.4) Muestras analizadas en el desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de soja en pastas secas	33
3.1.4.4.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de soja	33
3.1.4.4.2) Muestras comerciales	33
3.2) Métodos	34
3.2.1) Tratamiento de las muestras para su análisis electroforético y por Inmunoblotting	34
3.2.1.1) Desgrasado/Deshidratado	34
3.2.1.2) Extracción de proteínas totales	34
3.2.1.3) Extracción de las proteínas solubles en isopropanol 55° + 2% de 2-mercaptoetanol (ISO 55°+ 2ME)	34
3.2.2) Metodología	35
3.2.2.1) SDS-PAGE	35
3.2.2.2) Obtención de Anticuerpos primarios utilizados en Inmunoblotting y en los enzimoimmunoensayos desarrollados	36
3.2.2.3) Inmunoblotting	36
3.2.2.4) ELISA con kits comerciales	37
3.2.2.5) Desarrollo de los enzimoimmunoensayos competitivos	48
3.2.2.5.1) Desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de soja en productos cárnicos y productos farináceos	48
3.2.2.5.1.1) Obtención de extractos proteicos a partir de producto de soja	48
3.2.2.5.1.1.1) Cuantificación de proteínas de soja en el extracto y cálculo de la recuperación obtenida	48
3.2.2.5.1.2) Extracción de proteínas de productos cárnicos	49
3.2.2.5.1.3) Extracción de proteínas de productos farináceos	49
3.2.2.5.1.4) Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo	49
3.2.2.5.1.5) Validación de los enzimoimmunoensayos competitivos	50
3.2.2.5.1.5.1) Validación del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/ cuantificación de soja en productos cárnicos	50
3.2.2.5.1.5.1.1) Linealidad	50
3.2.2.5.1.5.1.2) Límite de detección y Límite de cuantificación	52
3.2.2.5.1.5.1.3) Precisión intradía e interdías	52

3.2.2.5.1.5.1.4) Recuperación	53
3.2.2.5.1.5.2) Validación del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de soja en pastas secas	53
3.2.2.5.1.5.2.1) Linealidad	53
3.2.2.5.1.5.2.2) Límite de detección y Límite de cuantificación	54
3.2.2.5.1.5.2.3) Precisión intradía e interdías	54
3.2.2.5.1.5.2.4) Recuperación.	55
3.2.2.5.2) Desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de huevo en pastas secas	55
3.2.2.5.2.1) Obtención de extractos proteicos a partir de huevo entero en polvo	55
3.2.2.5.2.1.1) Cuantificación de proteínas de huevo en el extracto y cálculo de la recuperación obtenida	55
3.2.2.5.2.2) Extracción de proteínas de pastas secas	56
3.2.2.5.2.3) Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo	56
3.2.2.5.2.4) Validación del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de huevo en pastas secas	57
3.2.2.5.2.4.1) Linealidad	57
3.2.2.5.2.4.2) Límite de detección y Límite de cuantificación	57
3.2.2.5.2.4.3) Precisión intradía e interdías	58
3.2.2.5.2.4.4) Recuperación	58
3.2.2.6) Protocolo del enzimoimmunoensayo competitivo final	59
4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
4.1) Detección de proteínas lácteas en productos cárnicos	62
4.1.1) Leche	62
4.1.1.1) Sistemas modelo crudos con agregado de leche en polvo descremada	62
4.1.1.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de leche en polvo descremada	67
4.1.2) Suero lácteo	70
4.1.2.1) Sistemas modelo crudos con agregado de suero lácteo	70
4.1.2.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de suero lácteo	72
4.1.3) Leche y suero lácteo: Muestras provistas por la industria analizadas para la determinación de proteínas lácteas	75
4.1.4) Leche y suero lácteo: Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas lácteas	77
4.2) Detección de proteínas de soja en productos cárnicos	79
4.2.1) Sistemas modelo crudos con agregado de producto de soja	79
4.2.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de producto de soja	83
4.2.3) Muestras provistas por la industria analizadas para la determinación de proteínas de soja	85
4.2.4) Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas de soja	87
4.2.5) Desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para soja en productos cárnicos	90
4.2.5.1) Cuantificación de proteínas de soja en el extracto	90
4.2.5.2) Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo	90

4.2.5.3) Validación	91
4.2.5.3.1) Linealidad	91
4.2.5.3.2) Límite de detección y Límite de cuantificación	93
4.2.5.3.3) Precisión intradía e interdías	93
4.2.5.3.4) Recuperación	93
4.2.5.4) Muestras comerciales analizadas con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado	94
4.3) Detección de proteínas de clara de huevo en productos cárnicos	95
4.3.1) Sistemas modelo crudos con agregado de clara de huevo	95
4.3.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de clara de huevo	97
4.3.3) Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas de huevo	99
4.4) Detección de proteínas de huevo en productos farináceos	102
4.4.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de huevo entero en polvo	102
4.4.2) Muestras provistas por la industria analizadas para la determinación de proteínas de huevo	103
4.4.3) Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas de huevo	105
4.4.4) Desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para huevo en productos farináceos (pastas secas)	108
4.4.4.1) Cuantificación de proteínas de huevo en el extracto	108
4.4.4.2) Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo	109
4.4.4.3) Validación	110
4.4.4.3.1) Linealidad	110
4.4.4.3.2) Límite de detección y Límite de cuantificación	111
4.4.4.3.3) Precisión intradía e interdías	111
4.4.4.3.4) Recuperación	111
4.4.4.4) Muestras comerciales analizadas con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado	111
4.5) Detección de proteínas de soja en productos farináceos	112
4.5.1) Sistemas modelo de pastas con agregado de producto de soja	112
4.5.2) Muestras provistas por la industria analizadas para la determinación de proteínas de soja	115
4.5.3) Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas de soja	117
4.5.4) Desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para soja en productos farináceos (pastas secas)	120
4.5.4.1) Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo	120
4.5.4.2) Validación	120
4.5.4.2.1) Linealidad	120
4.5.4.2.2) Límite de detección y Límite de cuantificación	121
4.5.4.2.3) Precisión intradía e interdías	121
4.5.4.2.4) Recuperación	121
4.5.4.3) Muestras comerciales analizadas con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado	121
5) CONCLUSIONES	123
5.1) Detección de proteínas lácteas en productos cárnicos	123

5.2) Detección de proteínas de soja en productos cárnicos	125
5.3) Detección de proteínas de huevo en productos cárnicos	126
5.4) Detección de proteínas de huevo en productos farináceos	128
5.5) Detección de proteínas de soja en productos farináceos	129
5.6) Conclusiones generales	130
6) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
7) RESUMEN	141

1) Introducción

1.1) Alergias

El sistema inmune detecta y protege frente a diferentes microorganismos. La primer “línea de defensa” que nos protege es la inmunidad innata, mientras que la defensa del huésped frente a infecciones posteriores se denomina inmunidad adaptativa.

Las enfermedades alérgicas son la manifestación clínica dada por una falla en los mecanismos de activación o regulación de la respuesta inmune frente a antígenos inocuos distribuidos en el medio ambiente. Estas reacciones se denominan reacciones de hipersensibilidad y son tipo I, II, III y IV (Gell P y Coombs R, 1963). Las reacciones tipo I, II y III están mediadas por anticuerpos, mientras que la tipo IV está mediada por células. En todas se da la alteración tisular por la inflamación, proceso en el que están involucradas distintos tipos de células. Las reacciones de hipersensibilidad tipo I o inmediatas se caracterizan por la producción exacerbada de inmunoglobulinas E (IgE), proceso mediado por los linfocitos T helper CD4+ de fenotipo Th2 y los linfocitos B. Las citoquinas producidas como consecuencia de la activación de los Linfocitos Th2 reclutan mastocitos, eosinófilos y basófilos, los cuales unen la IgE sintetizada y secretada por las células plasmáticas, a través de sus receptores de membrana de alta afinidad y de baja afinidad.

Estas células “sensibilizadas” con los anticuerpos IgE, al contactar el alérgeno posteriormente se activan y liberan al medio extracelular el contenido de sus gránulos citoplasmáticos que inician un proceso inflamatorio inmediato. Paralelamente se induce la síntesis de una serie de mediadores pro-inflamatorios que mantendrán el proceso inflamatorio en el tiempo. Cuando esto se da repetidas veces, el proceso inflamatorio puede llegar a alterar la histología y la fisiología del tejido y del órgano si intervienen células como eosinófilos o neutrófilos. En este caso estamos ante una reacción alérgica (Curciarello R, 2010).

1.2) Alergias alimentarias

La alergia alimentaria es una respuesta inmunológica anormal a un alimento o a algún componente alimentario (Taylor S, 2006).

Las reacciones adversas a alimentos se clasifican en tóxicas y en no tóxicas. Las alergias alimentarias son reacciones adversas a alimentos “tóxicas”. Provocan una respuesta del sistema inmune, activando IgE u otros mecanismos inmunes. Por lo tanto existen las alergias alimentarias mediadas por IgE (reacciones de hipersensibilidad inmediata), como por ejemplo: la alergia al maní, a la leche de vaca, a la soja, al huevo, etc. Además existen las alergias alimentarias mediadas por células (reacciones de hipersensibilidad retardada), como por ejemplo: enfermedad celíaca (Taylor S, 2006). Estos mecanismos de hipersensibilidad retardada se encuentran poco descritos, excepto la enfermedad celíaca. Los individuos con dicha enfermedad, reaccionan a proteínas específicas del trigo, centeno, cebada y posiblemente avena. Las prolaminas de estos cereales, desencadenan la destrucción de las vellosidades del tracto

intestinal en los pacientes celíacos, provocando una malabsorción de las proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales (Godefroy S y Popping B, 2010). Las reacciones adversas a alimentos no tóxicas, son las reacciones designadas como “intolerancias”. Estas últimas no se encuentran mediadas por el sistema inmune y en general se deben a déficit enzimáticos que impiden la adecuada metabolización del nutriente, como por ejemplo: la intolerancia a la lactosa (Taylor S, 2006).

Los principales síntomas de las alergias a alimentos mediadas por IgE (reacciones de hipersensibilidad inmediata), son de tipo: gastrointestinal: náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales; respiratorios: asma, rinitis, dificultad respiratoria; cutáneos: urticaria, eccema o dermatitis atópica, prurito, enrojecimiento o eritema, edema. Otros de los síntomas de las alergias alimentarias son: hipotensión, edema laríngeo, síndrome de alergia oral, hinchazón de la lengua y shock anafiláctico (Godefroy S y Popping B, 2010).

En las últimas décadas la prevalencia de las alergias a alimentos ha aumentado considerablemente, se estima que el 4-8% de los niños y el 2-4% de los adultos sufren de alergias alimentarias. En niños el 90% de las reacciones de alergia a alimentos son a la leche, huevos, trigo, maní, frutos secos y proteínas de soja. En adultos la mayoría de las alergias alimentarias son a maní, frutos secos y pescado (Ward R, 2015).

Existen ocho grupos de alimentos que son responsables del 90 % de las alergias alimentarias, entre estos encontramos: leche, huevo, soja, trigo, maní, frutos secos, pescado y mariscos. Además se define un segundo grupo de alimentos alergénicos, ellos son los segundos grandes ocho: mostaza, sésamo, girasol, algodón, moluscos, lentejas, arvejas y amapola (Poms R et al, 2004; Lehrer S et al, 2002).

1.3) Alérgenos alimentarios

La mayoría de los alérgenos alimentarios son proteínas (Lehrer S et al, 2002). Sin embargo, sólo un número limitado de proteínas han sido identificadas como alérgenos dentro de un gran grupo de antígenos alimentarios que se ingieren en la dieta. Los alérgenos presentes en estos alimentos pertenecen a relativamente pocas familias de proteínas y tienen ciertas características en común que podrían asociarse a una mayor alergenidad: son inmunogénicas; hidrosolubles; estables al calor, a la acción de ácidos, proteasas e inclusive al procesamiento industrial, entre otras. Se han identificado unos pocos alimentos como los responsables de producir la mayoría de las alergias alimentarias en pacientes alérgicos. Estos comprenden los ocho grupos ya mencionados (Sicherer S y Sampson H, 2009; Curciarello R, 2010).

Si bien en nuestro país no existen estudios de prevalencia las alergias a proteínas de leche, de soja y de huevo son las que se presentan con mayor frecuencia, especialmente en niños (Dr. Martín Bozzola, comunicación personal).

1.3.1) Alérgenos de leche de vaca

La alergia a la leche de vaca es particularmente prevalente en niños. Las proteínas de la leche de vaca son unas de las primeras proteínas introducidas en la dieta de un recién nacido. La alergia a estas proteínas afecta aproximadamente al 2,5% de los niños. Sin embargo alrededor del 80% de los niños superan la alergia a los 5 años (Rona R et al., 2007; Baumgartner S, 2010). Los distintos signos clínicos que se observan por la alergia a la leche de vaca son urticaria, eczema, asma, rinitis, esofagitis, distensión abdominal, diarrea, síndrome de alergia oral con manifestaciones periorales, anafilaxia, etc (Benhamou A et al, 2009; Kneepkens C y Meijer Y, 2009).

La leche de vaca contiene 3% de proteínas de las cuales 80% son caseínas. Se identifican las siguientes caseínas, α caseínas (peso molecular: 23,6 y 25,2 KDa), β caseínas (peso molecular: 23,9 KDa) y κ caseínas (peso molecular: 19 KDa). Las proteínas del suero representan el 20% del total y comprenden la β lactoglobulina (peso molecular: 18,3 KDa), la α lactoalbúmina (peso molecular: 14,2 KDa), las inmunoglobulinas bovinas (BGG), la albúmina sérica (peso molecular: 66,3 KDa) y pequeñas cantidades de lactoferrina (peso molecular: 80 KDa), transferrina y lipasa (Baumgartner S, 2010).

1.3.2) Alérgenos de soja

La soja es uno de los alimentos más comunes que causan alergias alimentarias. La alergia a la soja es normal en niños. Se estima que el 0,5% de la población se encuentra afectada por dicha patología. Los síntomas de la alergia a la soja son leves teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos las reacciones alérgicas severas por alimentos se dan por otros alérgenos alimentarios diferentes a la soja (Gatti M y Ferretti C, 2010).

Se han descrito dieciséis proteínas de la soja ligadas a la alergia a alimentos. La proteína responsable del 75 % de las reacciones alérgicas a la soja es la denominada P34 o Gly m Bd (peso molecular: 30 KDa). Otros alérgenos de la soja son: la cadena ácida de la glicinina (peso molecular: 40 KDa), la subunidad α de la β conglucina (peso molecular: 70 KDa), profilinas o Gly m3 (peso molecular: 14 KDa), inhibidor de tripsina Kunitz de soja (peso molecular: 20 KDa), proteínas hidrofóbicas de la soja o Gly m1 (peso molecular: 7 KDa) y proteínas de la cáscara o Gly m2 (peso molecular: 8 KDa) (Poms R et al, 2004).

1.3.3) Alérgenos de huevo

La alergia a proteínas de huevo es una de las causas más frecuentes de reacciones adversas a alimentos en niños. La prevalencia de la alergia al huevo es del 35% en chicos alérgicos y del 12%, aproximadamente, en adultos alérgicos. La dermatitis atópica es uno de los síntomas predominantes en la población pediátrica (Poms R et al, 2004).

Han sido identificados muchos alérgenos en el huevo. La mayoría de los alérgenos de la clara de huevo son ovomucoide Gal d 1 (peso molecular: 28 KDa), ovoalbúmina Gal d 2 (peso

molecular: 44 KDa), ovotransferrina Gal d 3 (peso molecular: 77 KDa) y lisozima Gal d 4 (peso molecular: 14 KDa). En la yema del huevo se encuentra la α -livetina con un peso molecular de 70 KDa (Poms R et al, 2004).

1.4) Legislación del etiquetado de alérgenos

En el año 1993 los representantes de Noruega, Finlandia, Islandia y Suecia presentaron al Comité del Codex Alimentarius sobre Etiquetado de Alimentos un documento sobre alérgenos presentes en alimentos. En dicho documento se planteaba la necesidad de llevar a cabo un estudio sobre la incidencia de las alergias alimentarias. En el año 1995 la FAO realizó en Roma una Consulta Técnica sobre alergias alimentarias para determinar qué alimentos se debían declarar siempre en la lista de ingredientes.

La norma del Codex, *Codex Stan 1-1985*, que da las recomendaciones para el etiquetado de alimentos envasados, fue enmendada en el año 1999 para contemplar la necesidad de declarar en el rótulo la presencia de alérgenos (*CODEX, Codex Stan 1-1985, 2010*). Los ingredientes que deben declararse siempre, según esta norma, están listados en el siguiente punto:

“4.2.1.4 *Se ha comprobado que los siguientes alimentos e ingredientes causan hipersensibilidad y deberán declararse siempre como tales:*

- *Cereales que contienen gluten; por ejemplo, trigo, centeno, cebada, avena, espelta o sus cepas híbridas, y productos de éstos;*
- *Crustáceos y sus productos;*
- *Huevos y productos de los buevos;*
- *Pescado y productos pesqueros;*
- *Maní, soja y sus productos;*
- *Leche y productos lácteos (incluida lactosa);*
- *Frutos secos y sus productos derivados;*
- *Sulfito en concentraciones de 10 mg/kg o más.”*

Actualmente existen reglamentaciones para la declaración obligatoria de alérgenos en alimentos en la Unión Europea, Estados Unidos, Japón, Australia y Nueva Zelanda, Canadá entre otros países.

1.4.1) Legislación Internacional

Unión Europea

En la Unión Europea se contempla la necesidad de que determinados ingredientes que pueden producir alergias, aparezcan en el etiquetado de los alimentos. La Directiva 2007/68/CE a partir del 26 de noviembre de 2007 exigía que los fabricantes indiquen la presencia de doce grupos de posibles alérgenos (anexo III bis), si se emplean como ingredientes en alimentos preenvasados (*Directiva 2007/68/CE, 2007*).

A continuación se transcribe el anexo III bis:

“ANEXO III bis-

1. *Cereales que contengan gluten (es decir, trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas) y productos derivados, salvo: a) jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa (1); b) maltodextrinas a base de trigo (1); c) jarabes de glucosa a base de cebada; d) cereales utilizados para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.*
2. *Crustáceos y productos a base de crustáceos.*
3. *Huevos y productos a base de huevo.*
4. *Pescado y productos a base de pescado, salvo:*
 - a) *gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides;*
 - b) *gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.*
5. *Cacahuets y productos a base de cacahuets.*
6. *Soja y productos a base de soja, salvo:*
 - a) *aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados (1);*
 - b) *tocoferoles naturales mezclados (E306), d-alfa tocoferol natural, acetato de d-alfa tocoferol natural y succinato de d-alfa tocoferol natural derivados de la soja;*
 - c) *fitosteroles y esteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja;*
 - d) *esteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.*
7. *Leche y sus derivados (incluida la lactosa), salvo:*
 - a) *lactosuero utilizado para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas;*
 - b) *lactitol.*
8. *Frutos de cáscara, es decir, almendras (*Amygdalus communis* L.), avellanas (*Corylus avellana*), nueces (*Juglans regia*), anacardos (*Anacardium occidentale*), pacanas [*Carya illinoensis* (Wangenb.) K. Koch], castañas de Pará (*Bertholletia excelsa*), alhóncigos (*Pistacia vera*), macadamias o nueces de Australia (*Macadamia ternifolia*) y productos derivados, salvo:*
 - a) *nueces utilizadas para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.*
9. *Apio y productos derivados.*
10. *Mostaza y productos derivados.*
11. *Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.*
12. *Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro expresado como SO₂*
13. *Altramuces y productos a base de altramuces.*
14. *Moluscos y productos a base de moluscos.”*

En el año 2011 entró en vigencia el Reglamento (UE) N°1169/2011 del Parlamento Europeo y del consejo (Reglamento (UE) N°1169/2011, 2011) que establece la base para garantizar un alto nivel de protección de los consumidores en relación con la información alimentaria. En el artículo 9 el Reglamento (UE) N°1169/2011 destaca las menciones obligatorias en el rótulo de los alimentos, como por ejemplo todo ingrediente o coadyuvante tecnológico que figure en el anexo II (el mismo detalla a las sustancias o productos que causan alergias e intolerancias) o derive de una sustancia o producto que figure en dicho anexo que cause alergias o intolerancias y se utilice en la fabricación o la elaboración de un alimento y siga estando presente en el producto acabado, aunque sea en una forma modificada. En el artículo 21, el presente reglamento, describe el etiquetado de determinadas sustancias o productos que causan alergias o intolerancias, y los requisitos para el mismo.

El anexo II del reglamento del año 2011 presenta algunas modificaciones con respecto al anexo III bis de la Directiva 2007/68/CE, las mismas son:

- En el punto 8: *Frutos de cáscara, es decir, almendras (Amygdalus communis L.), avellanas (Corylus avellana), nueces (Juglans regia), anacardos (Anacardium occidentale), pacanas [Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch], castañas de Pará (Bertholletia excelsa), alfóncigos (Pistacia vera), nueces macadamias o nueces de Australia (Macadamia ternifolia) y productos derivados, salvo los frutos de cáscara utilizados para hacer destilados alcohólicos incluido el alcohol etílico de origen agrícola.*
- En el punto 12: *Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro en términos de SO₂ total, para los productos listos para el consumo o reconstituidos conforme a las instrucciones del fabricante.*

El uso de las frases de advertencia aún no se encuentra regulado. Las “frases de advertencia” son advertencias voluntarias dirigidas a los consumidores (por ejemplo: puede contener leche) y permiten indicar que un producto que no tiene la intención de contener un alérgeno específico, puede contener ocasionalmente algún alérgeno debido a una contacto cruzado no intencional, que no se puede evitar en el proceso de manufactura incluso después de implementar un plan de control de alérgenos exhaustivo. Se demostró que si dichas frases se emplean frecuentemente los consumidores alérgicos ignoran estas declaraciones, lo que los podría poner en riesgo de sufrir reacciones alérgicas y hasta producir la muerte. Sólo deben ser utilizadas por las industrias cuando se llega a la conclusión de que no se puede evitar el contacto cruzado esporádico de un producto. Esta decisión debe estar sustentada en un cuidadoso proceso de evaluación e implementación de un plan eficaz de control de alérgenos (Publicación FARRP/University of Nebraska, 2008).

Estados Unidos

En el año 2004 se aprobó por el Senado el Acta de Etiquetado de Alérgenos en Alimentos y Protección al Consumidor (FALCPA). En el año 2006 se reglamentó el etiquetado obligatorio de los ocho principales alérgenos (FALCPA, 2006).

La Administración de Fármacos y Alimentos (Food and Drug Administration, FDA) exige a los elaboradores de alimentos que indiquen en sus etiquetas los alérgenos indicados ya sea en la lista de ingredientes, a continuación de la lista o inmediatamente al lado de ella. Deben agregarlos de modo que se entienda que alérgenos contiene el producto, para que se pueda identificar fácilmente los alimentos que pueden causar una reacción alérgica. Si un producto contiene lecitina de soja, en la nueva etiqueta debe figurar soja, entre paréntesis y junto al término lecitina de soja, o bien la etiqueta indicará: Contiene soja. Se requiere que se declare en las etiquetas los alérgenos más importantes: leche, huevo, pescado, mariscos (cangrejo, langosta, camarón), frutos secos (almendras, castañas de cajú, nueces), trigo, maní y soja. La etiqueta deberá indicar el tipo de alérgeno, por ejemplo, el tipo de fruto seco (nuez) o el tipo de marisco crustáceo (camarón), como así también todo ingrediente que contenga cualquier proteína derivada de alguno de los ocho alérgenos principales. Las etiquetas también incluirán todos los alérgenos encontrados en saborizantes, colorantes y otros aditivos (Godefroy S y Popping B, 2010).

Con respecto al uso de las frases de advertencia aún no se encuentra regulado.

Suiza

La Ordenanza N° 817.022.21 del Departamento Federal Interno, que se refiere a la “Caracterización y publicidad de los productos alimentarios”, en la sección cuatro, establece las sustancias que pueden provocar alergias y otras reacciones indeseables, entre ellas: cereales que contienen gluten, crustáceos, huevo, pescados, maní, soja, leche, frutos secos, apio, mostaza, sésamo, lupinos, moluscos y sus productos derivados y sulfitos. En el año 1999 se estableció la declaración obligatoria de alérgenos cuando su contenido supere 1 g de sustancia alergénica por kg de producto alimentario listo para el consumo (1000 ppm); con las siguientes excepciones: valor umbral para sulfitos 10 mg por kg de alimento y para cereales que contienen gluten 10 mg gliadina en 100 g en masa liofilizada de producto alimentario.

En el caso del etiquetado precautorio de alérgenos, los que se encuentren por debajo de los límites establecidos se pueden declarar con la frase: Puede contener...luego de la lista de ingredientes (Ordenanza N° 817.022.21, Suiza, 2005).

Canadá

En el año 2002, Canadian Food Inspection Agency (CFIA) modificó los capítulos B.01.008 y B.01.010 de la Food and Drug Regulations (FDR) para contemplar la declaración voluntaria de alérgenos en la lista de ingredientes, según Codex Stan 1-1985, rev. 1-1991. La CFIA solicitó incluir alimentos o derivados en la lista de ingredientes cuando estén presentes como ingredientes o como ingredientes de ingredientes.

En el año 2012 se hizo efectiva una nueva legislación para la regulación del etiquetado de alérgenos, fuentes de gluten y sulfitos agregados (Normativa Canadá, 2012). Los alérgenos que deben declararse son:

Cualquier proteína o cualquier proteína modificada incluyendo cualquier fracción proteica de:

- *Almendras, nueces de Brasil, avellanas, nueces pecan, castañas de Pará, pistachos, nueces macadamia, nueces de pino.*

- *Maní*

- *Semillas de sésamo.*

- *Trigo o Triticale*

- *Huevo*

- *Leche*

- *Soja*

- *Crustáceos*

- *Mariscos*

- *Pescado*

- *Mostaza*

- *Sulfitos >10 ppm*

- *Gluten:*

(a) cualquier proteína del gluten de los granos de los siguientes cereales o de los híbridos creados a partir de ellos: cebada, avena, centeno, triticale y trigo.

(b) cualquier proteína modificada, incluyendo sus fracciones de gluten de los granos de cereales (a) o de los híbridos creados a partir de ellos.

Los fabricantes tendrán que declarar los alérgenos alimentarios por su nombre en la lista de ingredientes o al final de la lista de ingredientes como: “Contiene...”

En cuanto a las frases de advertencia Health Canadá y la CFIA recomiendan a fabricantes y exportadores el uso sólo de una frase: “Puede contener...”

Japón

En el año 2002, el Ministerio de Salud Trabajo y Bienestar de Japón (MHLW) decidió implementar el sistema de etiquetado de alérgenos, que modifica la ley de saneamiento de alimentos. Esta legislación se modificó en el año 2008.

Existen dos tipos de declaraciones: una declaración obligatoria y una declaración recomendada. La declaración obligatoria incluye los denominados “specific allergenic ingredients” (SAI): Huevo, leche, trigo, trigo sarraceno, maní, langostino/camarón y cangrejo. La declaración recomendada incluye: abulón (molusco), ovas de salmón, calamar, naranja, kiwi, frutos secos, caballa, salmón, soja, pollo, carne roja, cerdo, hongos (Matsutake), damasco, batata, manzana, banana, gelatina.

Se estableció un umbral para los alérgenos de declaración obligatoria (SAI) de 10 µg de proteína alergénica /g de alimento. En el caso de que el alimento contenga una concentración de proteína alergénica menor a 10 ppm no se debe declarar en el rótulo del producto, en caso de que este contenga una concentración de proteína alergénica mayor o igual a 10 ppm se debe declarar su presencia en el rótulo como ingrediente. Se desarrollaron métodos oficiales para la detección de alérgenos. La frase “puede contener...” no está permitida. Solamente está permitido colocar “este producto se elabora en un establecimiento que procesa...” (Godefroy S y Popping B, 2010; Akiyama H et al, 2011).

Australia y Nueva Zelanda

En el año 2002 se estableció el etiquetado para alérgenos y sustancias capaces de generar intolerancias. Entre estas se incluyen: cereales que contienen gluten, crustáceos, huevo, pescado, leche, maní y porotos de soja, sulfitos en concentraciones mayores o iguales a 10 mg/kg, frutos secos y semillas de sésamo. Deben declararse cuando están presentes como: ingredientes, ingredientes de ingredientes compuestos, aditivos o componentes de aditivos, coadyuvantes de elaboración o componentes de coadyuvantes de elaboración (Godefroy S y Popping B, 2010).

En el año 2012 en Australia y Nueva Zelanda surgió el sistema VITAL 2.0 (Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling). El mismo ha sido desarrollado para que los productores de alimentos utilicen adecuadamente las frases de advertencia en el etiquetado de alimentos (VITAL 2.0, 2012). El sistema VITAL 2.0 establece si se deben utilizar o no dichas frases de advertencia. Para esto establece una dosis de referencia para cada alérgeno. La dosis de referencia es el nivel de mg de proteínas (proteínas totales de un alimento alergénico) que se consumen en una ocasión de consumo, por debajo del cual solo los individuos más sensibles (entre 1 y 5 % dependiendo de los datos disponibles) en las poblaciones alérgicas son propensos a experimentar una reacción adversa.

Las dosis de referencia establecidas en este sistema son:

- para leche: 0,1mg de proteína de leche
- para soja: 1 mg de proteína de soja
- para huevo: 0,03 mg de proteína de huevo

Si el alérgeno fue agregado intencionalmente, éste se debe declarar en la etiqueta del alimento.

En el caso de que el alérgeno no se pueda eliminar del producto, a pesar de haber tomado todas las medidas precautorias para evitar el contacto cruzado, se deben tener en cuenta dos niveles de acción para saber si declarar o no la frase precautoria.

- Nivel de acción 1: no se requiere la frase precautoria por contacto cruzado
- Nivel de acción 2: se requiere la frase precautoria por contacto cruzado

La única frase precautoria permitida es “puede estar presente...”. Para determinar si se debe colocar la frase precautoria o no en el rótulo del alimento, se calcula un “Valor límite” utilizando la siguiente fórmula:

Valor límite (ppm) = (dosis de referencia [mg] x 1000) / porción [g]

Si la concentración de alérgeno en la muestra se encuentra por debajo de dicho valor límite calculado, estaríamos en el nivel de acción 1, por lo tanto no se requiere la frase precautoria. Si el nivel de alérgeno en la muestra es mayor al valor límite, estaríamos en el nivel de acción 2, es decir, se requiere la frase precautoria por contacto cruzado (VITAL 2.0, 2012).

1.4.2) Legislación en Argentina y en Mercosur

En Argentina, actualmente en el Código Alimentario Argentino no existe la obligatoriedad de etiquetar los componentes alérgenos en el rótulo de los alimentos envasados. En el mismo se establece que, es obligatorio que figure en la rotulación de alimentos envasados, la lista de ingredientes en orden decreciente de peso inicial. Los aditivos alimentarios están incluidos dentro del concepto de ingredientes (Código Alimentario Argentino, capítulo V, 2016).

La CONAL (Comisión Nacional de Alimentos) trabajó sobre un proyecto para la “Declaración obligatoria de los componentes alérgenos en el rótulo de los alimentos,” según el Expediente N° 1-0047-2110-9531-08-9 del registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (Acta N°84 CONAL, 2014). El mismo formó parte de una consulta pública. En la reunión de CONAL realizada en septiembre de 2009 se dio lectura a las observaciones recibidas y al dictamen emitido por CONASE (Consejo Asesor de la Comisión Nacional de Alimentos). En virtud de las mismas se propusieron pequeñas modificaciones al proyecto y la CONAL acordó su contenido, remitiéndolo a trámite administrativo. El 6 de octubre de 2010 fue publicada en el Boletín Oficial la Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos que establece que debe incorporarse el artículo 235 séptimo al Código Alimentario Argentino sobre la rotulación de alérgenos en alimentos (Resolución Conjunta N°57/2010 y 548/2010, 2010).

“Artículo 235 séptimo:

1- Los alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles indicados en el presente deberán ser declarados a continuación de la lista de ingredientes del rótulo siempre que ellos o derivados

de ellos estén presentes en los productos alimenticios envasados, ya sean añadidos como ingredientes o como parte de otros ingredientes, estos son:

1.1- Cereales que contienen gluten; trigo, centeno, cebada, avena y sus variedades híbridas y productos de éstos (excepto: a- jarabes de glucosa derivados de trigo, o cebada, incluida la dextrosa; b- maltodextrinas derivadas de trigo o cebada cereales utilizados para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas);

1.2- Crustáceos y productos derivados;

1.3- Huevos y productos de los huevos;

1.4- Pescado y productos de la pesca (excepto: a- gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides; b- gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.);

1.5- Maní, y productos derivados;

1.6- Soja, y productos derivados (excepto: a- aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados; b- tocoferoles naturales mezclados (INS306), d-alfa tocoferol natural, acetato de d-alfa tocoferol natural y succinato de d-alfa tocoferol natural derivados de la soja; c- fitosteroles y esteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja; d- esteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.);

1.7- Leche y productos lácteos (incluida lactosa), (excepto: a- lactosuero utilizado para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas; b- lactitol).

1.8- Frutas secas (almendras, avellanas, castañas, nueces, piñones, pistacho; y productos derivados, (excepto: las frutas secas utilizadas para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas);

1.9- Dióxido de azufre y sulfitos.

1.10- Tartrazina.

2- La información se presentará en contraste de colores que permita su visibilidad y de la siguiente forma: “Contiene: ...” seguido del nombre de la sustancia y /o “derivados de...” completando el espacio según corresponda de acuerdo al listado del Artículo I

3- No se admite ninguna frase de advertencia que exprese o sugiera el posible o probable contenido de un alérgeno.

Se otorgará a las empresas un plazo de ciento ochenta (180) días desde su publicación en el Boletín Oficial a los efectos de su adecuación” (Resolución Conjunta N°57/2010 y 548/2010, 2010).

Desde junio de 2011 la aplicación de la Resolución Conjunta N°57/2010 y 548/2010 se encuentra suspendida hasta tanto la CONAL elabore una propuesta de adecuación del artículo 235 séptimo del CAA. En la Resolución Conjunta N° 106/2011 y N° 297/2011 del año 2011, se destacan las principales causas por las cuales se suspendió la Resolución Conjunta N°57/2010 y 548/2010 (Resolución Conjunta N° 106/2011 y N° 297/2011, 2011).

Dichas causas son:

“Que la información disponible actualmente es insuficiente para establecer valores umbrales de alérgenos en las personas debido a la variabilidad de las dosis disparadoras, la sensibilidad individual, el tipo y variedad de alérgeno y la reactividad cruzada.

Que la falta de estos valores umbrales dificulta el establecimiento de límites de alérgenos en alimentos que puedan ser armonizados en las normas de referencia internacional y en las legislaciones de los países, y la determinación de las metodologías más adecuadas a utilizar en el control de alérgenos en alimentos.

Que la Ley 18.284, en su artículo 6° establece: "La observancia de las normas establecidas por el Código Alimentario Argentino será verificada con arreglo a métodos y técnicas analíticas uniformes para toda la República, que determinará la Autoridad Sanitaria Nacional"; en este sentido, la Autoridad Sanitaria Nacional se encuentra en proceso de revisión de las técnicas y métodos más apropiados para la determinación de alérgenos.

Que las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), también denominadas Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), son una herramienta básica para lograr alimentos inocuos, saludables y sanos para el consumo humano.

Que las Buenas Prácticas de Manufactura establecidas en la Resolución del Grupo Mercado Común del MERCOSUR N° 80/96 fueron incorporadas al Código Alimentario Argentino mediante la Resolución del ex MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL N° 587 del 1° de septiembre de 1997 que aprobó el Reglamento Técnico MERCOSUR sobre las Condiciones Higiénico Sanitarias y de Buenas Prácticas de Elaboración para Establecimientos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos.

Que las Buenas Prácticas de Manufactura disminuyen el riesgo de contaminación en los alimentos, entendiéndose por contaminación la presencia de sustancias o agentes extraños de origen biológico, químico o físico que se presuma nociva o no para la salud humana.

Que para implementar las Buenas Prácticas de Manufactura en toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta la comercialización del producto final, se requiere concientizar a todo el personal involucrado en cada etapa, realizar un diseño adecuado del proceso, disponer de protocolos y validación de los procedimientos de limpieza.

Que la implementación de un plan de control con base en la evaluación de peligros en toda la cadena alimentaria puede, según el caso, prevenir la contaminación cruzada (directa o indirecta) con alérgenos.

Que hay países que disponen de normas para el rotulado de alérgenos y admiten el uso de frases de advertencia de alérgenos de manera voluntaria y en forma preventiva cuando aun implementando un plan de control de alérgenos, incluyendo las Buenas Prácticas de Manufactura, se llega a la conclusión que el riesgo de contaminación cruzada persiste en un determinado producto, como es el caso de Australia, Canadá, Chile, Estados Unidos de América, Nueva Zelanda y Reino Unido.

Que la asociación civil Plataforma Alérgenos en Alimentos —organización interdisciplinaria sin fines de lucro integrada por organismos oficiales, universidades, industrias de alimentos, médicos especialistas y padres de niños alérgicos a alimentos— remitió a la SECRETARÍA DE POLÍTICAS, REGULACION E INSTITUTOS y a la SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA observaciones referidas al artículo 235 séptimo del Código Alimentario Argentino, y solicitó, entre otros aspectos, rever y analizar la posibilidad de incluir en los rótulos frases de advertencia sobre la posible presencia de alérgenos.

Que empresas alimenticias, a través de sus cámaras, plantearon a la SECRETARÍA DE POLÍTICAS, REGULACION E INSTITUTOS y a la SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA dificultades para adecuarse a la Resolución Conjunta N° 57/2010 y N° 548/2010, como la falta de definición de los métodos de control que deben implementar las empresas, el tiempo que requieren para capacitar y concientizar a todos los operarios involucrados en la elaboración de los productos, la necesidad de analizar y definir inversiones a realizar y/o decisión de discontinuar productos por la imposibilidad de aislar su fabricación y asegurarse que los proveedores garanticen insumos que no contengan alérgeno."

En el año 2014 se trató el tema de declaración de alérgenos en CONAL y se elaboró un documento en el que se detallan los alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles, que deberán ser declarados a continuación de la lista de ingredientes del rótulo, siempre que ellos o derivados de ellos estén presentes en los productos alimenticios envasados, ya sean añadidos como ingredientes o como parte de otros ingredientes (Acta N°102 CONAL, 2014; Acta N°103 CONAL, 2014).

Algunos de los cambios con respecto a la Resolución Conjunta N°57/2010 y 548/2010, del año 2010 son:

- En el punto 1.1: *“Trigo, centeno, cebada, avena, o sus cepas híbridas, y productos derivados, reemplazando: Cereales que contienen gluten; trigo, centeno, cebada, avena y sus variedades híbridas y productos de éstos;”*
- En el punto 1.8: *“Frutas secas (indicando la/s que corresponda), reemplazando: Frutas secas (almendras, avellanas, castañas, nueces, piñones, pistacho; y productos derivados, (excepto: las frutas secas utilizadas para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas);”*
- En el punto 1.9: *“Dióxido de azufre y sulfitos [presentes en concentraciones iguales o mayores a 10 ppm], mientras que en la resolución del 2010 no aclara concentraciones de sulfitos.”*
- Frases de advertencia: *“Cuando una sustancia del listado anterior no forme parte de los ingredientes del alimento pero exista la posibilidad de contaminación accidental durante el proceso de elaboración aún habiendo aplicado las BPM, debe constar en el rótulo la expresión “Puede contener...” (se indicará el nombre del alérgeno principal), a continuación del listado de ingredientes y de la frase “Contiene:...”, si corresponde.”*

Lo acordado en CONAL fue presentado como posición Argentina en las reuniones de MERCOSUR en las que se trató el reglamento 26/03 de etiquetado de alimentos.

En julio de 2015 Brasil aprobó su propia legislación (Resolución RDC N°26, 2015). Sin embargo, las diferentes delegaciones del Mercosur no están de acuerdo con algunos puntos de dicha Resolución.

En la LVII Reunión Ordinaria MERCOSUR, en noviembre de 2015, se trataron los diferentes puntos en discusión y se elaboró un informe técnico (MERCOSUR/SGT N° 3/ACTA N° 04/15, 2015). Los puntos en discusión con respecto a la legislación brasilera son:

- No se encuentran incluidos los sulfitos.
 - Se debe declarar Alérgicos: contiene...; Alérgicos: contiene derivados de... o Alérgicos: contiene... y contiene derivados de...
 - No se admiten derivados exceptuados de ser declarados como alérgenos.
 - Está incluido el látex natural.
 - En los casos en que no es posible garantizar la ausencia de contaminación cruzada con alérgenos alimentarios, debe constar en el rótulo la declaración Alérgicos: puede contener....
- Actualmente el tema continúa en tratamiento en el marco de las tareas de la decisión CMC N°23 /15 sobre el fortalecimiento del MERCOSUR Comercial y Económico, dado que la medida se encuentra listada dentro de su plan de acción.

En consecuencia, desde el año 2011, no hay en Argentina ninguna reglamentación vigente con respecto a la declaración de alérgenos en alimentos. Sin embargo, desde hace algunos años son numerosos los rótulos de alimentos que las presentan.

1.5) Métodos analíticos para la detección de alérgenos en alimentos

1.5.1) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis es la migración de solutos iónicos (con carga eléctrica) bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), dependiendo de la combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (Poms R et al, 2004; García Pérez H, 2000).

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza.

Existen numerosas variaciones de los métodos electroforéticos en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación:

- Electroforesis capilar.
- Electroforesis en papel.
- Electroforesis en gel de agarosa.
- Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- Isoelectroenfoque.
- Electroforesis bidimensional.

La técnica electroforética que se emplea para el análisis de proteínas en matrices alimenticias es la electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta técnica puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturizantes (SDS-PAGE). Las diferencias entre uno y otro tipo radican en los componentes de los geles y del tampón de electroforesis, así como el tratamiento de las muestras. En SDS-PAGE se incluyen agentes desnaturizantes: reductores, detergentes y caótopos. En ND-PAGE las proteínas mantienen su estructura tridimensional y las diferentes cadenas polipeptídicas pueden permanecer unidas, separándose no sólo en función de su carga eléctrica, sino también según su tamaño y forma. Por el contrario, cuando las proteínas se solubilizan en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS), en el caso de SDS-PAGE, éste se une a las proteínas, rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturizándolas. Las proteínas desnaturizadas de la muestra adoptarán una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas de SDS cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. La carga nativa original de la molécula está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. A diferencia de la

electroforesis en condiciones nativas, en la SDS-PAGE las proteínas se separan únicamente en función de su tamaño.

Los métodos electroforéticos permiten la separación de las proteínas presentes en una muestra obteniendo una serie de bandas cuyo número y posición constituye una huella dactilar característica (López L; 2000).

En la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires, en la cátedra de Bromatología se han desarrollado dos tesis doctorales relacionadas con la utilización de SDS-PAGE, según el sistema de Laemmli, como herramienta para la detección y cuantificación de proteínas en alimentos. En una de ellas presentada por la Dra. Margarita Olivera Carrión en el año 1988 se trabajó en la extracción de las proteínas de la muestra con una solución extractiva de proteínas totales (buffer Tris-ClH con dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol) y resultó útil para la detección y cuantificación de soja en productos cárnicos; detección de proteínas de origen vacuno en productos que debieran ser elaborados exclusivamente con proteínas de origen porcino; detección de plasma bovino y huevo en pastas al huevo e identificación de especies de pescados enlatados (Olivera Carrión M, 1988; Olivera Carrión M y Valencia M, 1990 a; Olivera Carrión M y Valencia M, 1990 b; Olivera Carrión M y Valencia M, 1991).

En la segunda tesis presentada por la Dra. Laura Beatriz López en el año 2000 se estudió la aplicabilidad del SDS-PAGE, utilizando solventes de extracción selectivos, para establecer la composición cualitativa de proteínas en alimentos crudos o cocidos y de esta manera verificar el cumplimiento de lo declarado en el rótulo en lo que respecta a materias primas proteicas. Además se estudió la posibilidad de utilizar las técnicas de extracción y separación desarrolladas para cuantificar proteínas extrínsecas en alimentos crudos y cocidos. Se estudió la posibilidad de detectar proteínas extrínsecas de uso permitido y muy frecuente en la elaboración de productos cárnicos vacunos utilizando un solvente de extracción selectivo. Se evaluó la aplicabilidad de esta metodología electroforética para la cuantificación de las proteínas separadas por SDS-PAGE, presentes en muestras sometidas o no a tratamiento térmico (López L et al, 1996; López L y Valencia M, 1999; López L, 2000; López L y Valencia M, 2000; López L y Valencia M, 2001 a; López L y Valencia M, 2001 b).

Posteriormente se estudió la aplicabilidad de esta metodología para establecer la posible adulteración con trigo pan de pastas comerciales que declaraban trigo candeal como único ingrediente. Se estudió también la posibilidad de detectar la adulteración con trigo pan en fideos elaborados con huevo (López L et al, 2005).

En otro trabajo con el fin de establecer el nivel de detección de materias primas proteicas extrínsecas en mezcla con carne porcina en jamones cocidos se realizó la extracción de proteínas de diversos sistemas modelo y la posterior separación por SDS-PAGE. Se estudió la posibilidad de detectar y de cuantificar proteínas extrínsecas en sistemas modelo de jamones cocidos con aislado de soja, caseinato, leche en polvo descremada, plasma bovino, plasma porcino y suero lácteo (López L et al, 2006).

Las ventajas de esta metodología son:

- Permite confirmar la presencia de ingredientes o aditivos proteicos declarados o no, en un alimento, en una única corrida electroforética.
- Es posible una cuantificación de ciertos alérgenos en algunas matrices alimentarias.

Las desventajas son:

- Es laboriosa y requiere experiencia.
- No posee una buena sensibilidad para la detección de trazas de alérgenos.

Muchas veces se detectan proteínas extrínsecas presentes en alimentos procesados, ya sea agregadas como ingredientes o presentes por contacto cruzado con determinado alérgeno. Si dichas proteínas no se encuentran declaradas en el rótulo de los alimentos pueden ser un riesgo para personas alérgicas. La metodología electroforética puede resultar una herramienta útil para la detección de dichas proteínas alergénicas, presentes en productos comerciales que las contienen en mayor concentración.

1.5.2) Inmunoblotting

La técnica de inmunoblotting es una técnica rápida y muy sensible para la detección y caracterización de proteínas. Se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Implica la separación por electroforesis por el sistema SDS-PAGE o Isoelectroenfoco y luego una transferencia irreversible de las proteínas a una membrana de Fluoruro de polivideno (PVDF) o de nitrocelulosa. Los antígenos que se han transferido a la membrana son luego reconocidos por anticuerpos específicos contra ellos. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por la acción de una enzima sobre un sustrato cromógeno que desarrolla color o mediante otro sistema de revelado (Van Ree R et al, 2006).

Las ventajas de esta metodología son:

- Permite confirmar la presencia de ingredientes o aditivos proteicos declarados o no, en un alimento.
- En general posee mejor sensibilidad que el SDS-PAGE.

Las desventajas son:

- Requiere de los anticuerpos específicos contra las proteínas buscadas.
- El revelado debe ser realizado para cada alérgeno buscado.
- Es un método cualitativo.
- Es laboriosa y requiere experiencia.
- No es tan sensible como ELISA.
- Se requiere equipamiento específico y personal altamente capacitado.

Este ensayo resulta más específico que el SDS-PAGE ya que detecta la proteína de interés a través de su peso molecular y a través de la unión del anticuerpo con el antígeno (Van Ree R et al, 2006). Es aplicable para análisis cualitativos, es decir determina si la proteína de interés se

encuentra presente o no. En cambio para análisis cuantitativos se deben utilizar técnicas más apropiadas como el método de ELISA (Diaz Amigo C, 2010 c).

1.5.3) ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

La técnica ELISA consiste en un ensayo basado en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos a las moléculas que reconocen como extrañas (antígenos).

En este ensayo se produce una unión del anticuerpo al antígeno sobre una superficie a la que previamente el anticuerpo o el antígeno se han unido. Alguno de los componentes del ensayo (anticuerpo o antígeno) se encuentra unido a una enzima que catalizará la formación de un producto coloreado, que podrá ser cuantificado mediante la medida de la luz absorbida por dicho compuesto (espectrofotometría).

Existen distintos tipos de ensayos ELISA, siendo los más utilizados en la detección de alérgenos en alimentos los ensayos tipo sándwich y competitivos. En el ELISA tipo sándwich se utilizan dos anticuerpos, el anticuerpo primario o de captura y el anticuerpo secundario conjugado a una enzima. En este ensayo el alérgeno se une a los dos anticuerpos y queda “atrapado” entre ambos. En el ELISA competitivo se incuba la muestra con el anticuerpo para después añadir esta preparación sobre una superficie recubierta de antígeno, de tal forma que se une a la superficie el anticuerpo libre, no unido al alérgeno de la muestra. Finalmente se detecta la cantidad de anticuerpo libre. Cuanto más anticuerpo libre es detectado, menos cantidad de alérgeno contiene la muestra (Yeung J, 2006; Diaz Amigo C, 2010 c).

Las ventajas de esta metodología son:

- Simple y rápida en su realización.
- Versátil y robusta. Se pueden combinar diferentes tipos de anticuerpos con distintas especificidades, distintos tipos de ensayos, competitivos o sándwich, diferentes buffers de ensayo y diferentes buffers de extracción. Algunos buffers contienen agentes desnaturizantes y reductores que permiten solubilizar agregados de proteínas. En principio estos son incompatibles con el ensayo ya que afectan a los anticuerpos y a la unión antígeno-anticuerpo pero se los puede utilizar muy diluidos y no afectan la performance del ensayo.
- Elevada sensibilidad.
- Selectivo para residuos de alérgenos.
- La detección se realiza por medio de dispositivos ópticos.
- Técnica Cuantitativa: Cuantificación de concentraciones sugeridas como seguras (por debajo de los umbrales clínicos).
- Como ensayo biológico es sensible a variaciones en las condiciones de ensayo que incluye al alérgeno target, es sensible a modificaciones en la estructura del alérgeno. Los anticuerpos policlonales permiten un cierto grado de modificación de los alérgenos en comparación con los monoclonales.

Las desventajas son:

- Demanda un largo tiempo para el desarrollo de nuevos kits.
- Efectos de la matriz.
- Falta de disponibilidad de ensayos multi-alérgenos.
- Pueden producirse falsos negativos cuando se desnaturalizan las proteínas por cambios de presión, temperatura o concentración de sales.
- Posibilidad de reacciones cruzadas entre proteínas estrechamente relacionadas.

El método de ELISA es el ensayo más utilizado para la detección de alérgenos en alimentos. Debido a la alta sensibilidad de este ensayo, es aplicable para la detección de trazas de alérgenos presentes en alimentos por contacto cruzado.

A nivel internacional hay desarrollados kits comerciales que permiten la detección/cuantificación de diferentes alérgenos: leche, soja, huevo, maní, almendras, avellanas, gliadinas, mariscos, nueces, etc. Estos ensayos pueden ser cuantitativos pero los resultados varían entre los ensayos comerciales (Yeung J, 2006; Diaz Amigo C y Popping B, 2010).

1.5.4) Inmunocromatografía

La detección de alérgenos mediante tiras inmunocromatográficas es un método rápido y sencillo. El alérgeno se extrae de la muestra con una solución de extracción. Luego la muestra extraída se aplica sobre la tira, donde se encuentran pegados los anticuerpos específicos que reconocen el alérgeno. Este complejo antígeno-anticuerpo se desplaza a través de la tira mediante un proceso cromatográfico de separación. Finalmente, dicho complejo antígeno-anticuerpo se inmoviliza en una región de la tira, donde se puede detectar la presencia del mismo como una banda coloreada (Van Herwijnen R y Baumgartner S, 2006). Existen ensayos de este tipo competitivos y no competitivos (Diaz Amigo C, 2010 c).

Las ventajas de este método son:

- Método sencillo y rápido.
- Suficientemente específico.
- Sensibilidad satisfactoria.
- Interpretación visual.
- No requiere de equipamiento complejo.

Las desventajas son:

- Es un método cualitativo. No permite obtener la concentración del alérgeno en la muestra.

Se comercializan test inmunocromatográficos que permiten la detección rápida en las plantas industriales para algunos alérgenos como: gluten, leche, maní, nueces, huevo, etc.

1.5.5) Biosensores

Un biosensor es un dispositivo de análisis conformado por un elemento biológico de reconocimiento (célula, tejido, receptor, ácido nucleico, enzima, ribozima o anticuerpo, entre

otros) o nanomateriales (nanopartículas, nanocompuestos), materiales inteligentes o compuestos biomiméticos (aptámeros, polímeros de microporosidad intrínseca, sondas de ácidos nucleicos), asociado a un mecanismo que garantiza la detección e interpretación de la variación de propiedades ópticas, fisicoquímicas, eléctricas, entre otras, obtenida de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico (Turner A y Newman J, 1998).

Los biosensores se pueden clasificar atendiendo a las siguientes variables:

- Tipo de interacción: biocatalíticos o de bioafinidad.
- Método de detección: directo o indirecto.
- Elemento de reconocimiento: célula, organela, tejido, enzima, receptor, anticuerpo, ácido nucleico, polímero de impresión molecular (PIM), ácido nucleico peptídico (PNA).
- Sistema de transducción: nanomecánico, piezoeléctrico, electroquímico, termoelectrónico u óptico (Jiménez C y León D, 2009).

Las ventajas de este método son:

- Alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad.
- Fácil manejo, bajo costo y corto tiempo de análisis.
- Permiten obtener resultados en tiempo real.

Las desventajas son:

- Se encuentran en etapa de desarrollo y no hay aún dispositivos disponibles para alérgenos en alimentos.

En matrices alimentarias se destacan en el análisis de la composición, compuestos xenobióticos como pesticidas, dioxinas, fármacos, aditivos, hidrocarburos poliaromáticos; patógenos y toxinas de origen bacteriano, procesos de trazabilidad, determinación de organismos genéticamente modificados, antinutrientes, control de procesos y estabilidad. Además esta metodología ha sido utilizada para la detección de alérgenos en alimentos en trabajos de investigación (Jiménez C y León D, 2009; Mohammed I et al, 2001; Yman I et al 2006; Pilolli R et al, 2013).

1.5.6) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El método de PCR para la detección de alérgenos es una técnica con una elevada sensibilidad que permite detectar trazas de alérgenos presentes en alimentos, en el rango de mg alérgeno/kg alimento. Esta metodología permite obtener millones de copias de una secuencia de ADN específica del organismo diana en muy poco tiempo. Dado que esta técnica detecta ADN, es posible analizar muestras muy procesadas (sometidas a un tratamiento térmico), ya que el ADN es más estable que las proteínas.

La técnica PCR estándar es cualitativa pero la introducción de una sonda específica marcada con un compuesto fluorescente en la reacción (PCR en tiempo real) permite controlar su progreso y cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra. Esta metodología se basa en la actividad de la enzima termorresistente ADN polimerasa, capaz de fabricar una cadena de

ADN complementaria a otra ya existente. Para esto se requiere de la presencia de nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina en el medio (materia base para la elaboración de ADN), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se desee copiar para que sirva como cebador o “primer”.

Se han desarrollado variaciones de la técnica tradicional dando lugar a lo que se conoce como PCR en tiempo real o PCR cuantitativa. Se denomina PCR en Tiempo Real a la técnica que permite detectar y cuantificar de forma fiable y reproducible el producto generado en cada ciclo de la PCR, siendo los valores obtenidos directamente proporcionales a la cantidad de ADN inicialmente presente en la reacción. La PCR clásica implica una detección a punto final y un posterior análisis mediante diversas técnicas de análisis de ADN. La PCR en Tiempo Real permite realizar las fases de amplificación y análisis simultáneamente (Diaz Amigo C y Popping B, 2010). Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos, casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que se quiera amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (denominada "quencher"), de tal forma que cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

Las ventajas de este método son:

- Sensibilidad muy alta en la detección del ADN (5-50 picogramos de ADN).
- Permite identificar la especie de la que proviene el alérgeno presente, muy útil para identificar el origen de una contaminación cruzada.
- El ADN es menos susceptible de ser degradado durante el procesado de los alimentos.
- Son fáciles de desarrollar, todos los componentes necesarios están disponibles comercialmente y no necesitan insumos animales ni mantenimiento de líneas celulares.

Las desventajas son:

- Se requiere tiempo y personal calificado en el análisis.
- Técnica indirecta para detectar alérgenos.
- No diferencia productos animales de una misma especie, por ejemplo no diferencia ADN de músculo bovino del ADN de leche bovina, o músculo de pollo de huevo de gallina. Es decir no es tejido específico.
- No se pueden detectar huevo y leche por PCR ya que la abundancia de ADN en estos dos productos es muy baja, perjudicando la sensibilidad del ensayo.
- Requieren laboratorios con salas especialmente dedicadas. Esto no resulta práctico para las industrias o para laboratorios estándar de análisis de alimentos (Holzhauser T et al, 2006; Diaz Amigo C y Popping B, 2010).

Se encuentran disponibles kits comerciales PCR en tiempo real para la determinación de pescado, crustáceos, moluscos, soja, sésamo, nueces, gliadina, etc.

La aplicación de esta técnica para la detección de alérgenos es controvertida ya que no detecta las proteínas alergénicas alimentarias en sí mismas. La concentración de ADN puede no estar correlacionada con la presencia de proteínas alergénicas o con su concentración (Díaz Amigo C y Popping B, 2010).

1.5.7) Espectrometría de masa

La espectrometría de masa se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos (Hoffmann E y Stroobantohn V, 2007). El espectro de masa de cada compuesto es único y se puede utilizar para caracterizar a cada analito. En el caso de los alérgenos los péptidos de interés son utilizados como “huella dactilar” (fingerprint) de los mismos.

Se ha demostrado que la espectrometría de masas se puede utilizar para la detección de alérgenos en matrices complejas (Careri M et al 2008, Chassaigne H et al, 2007). Un estudio ha permitido identificar y detectar siete alérgenos, incluyendo huevo, leche y soja en pan con tratamiento térmico. Se observó que el tratamiento aplicado al producto no evita la detección de los alérgenos. También se han comparado los resultados de esta metodología con los kits comerciales de ELISA para huevo, soja y leche. Se ha comprobado que en productos crudos ambas metodologías se comportan de manera similar y en productos terminados los kits de ELISA se comportan diferentes. Algunos kits de ELISA detectaron el alérgeno y otros no, a diferencia de la espectrometría de masa que detectó los alérgenos en el producto final siempre (Heick J et al, 2011).

Las ventajas de este método son:

- Gran potencial para screening multialérgico, es decir se pueden detectar muchos compuestos en un solo ensayo, no sólo uno como ocurre con los métodos de ELISA y PCR.
- La detección de proteínas no se ve afectada por modificaciones en su estructura.
- Detección directa del alérgeno sin necesidad de recurrir a un intermediario (anticuerpos en el ELISA).
- Detección no ambigua del alérgeno (se evitan falsos positivos por reactividad cruzada).
- Sensibilidad similar a ELISA (ppm).
- Permite cuantificar.
- Amplio rango de posibilidades de extracción con respecto a ELISA, incluyendo aquellas soluciones extractivas que podrían interferir en la unión antígeno-anticuerpo.

Las desventajas son:

- Es una técnica muy laboriosa.

- Muy elevado costo del equipamiento requerido.
- Se debe contar con personal altamente capacitado.

Dado que la espectrometría de masa es un análisis confirmativo robusto ante un tribunal, tiene un elevado potencial como método de detección de alérgenos en alimentos (Díaz Amigo C y Popping B, 2010).

1.6) Alérgenos en productos cárnicos

En la elaboración de los productos cárnicos es frecuente el agregado de proteínas extrínsecas, debido a que sus propiedades funcionales mejoran las características organolépticas y el rendimiento de este tipo de productos (Giese J, 1994). Entre las materias primas proteicas que se comercializan para ser utilizadas en la industria cárnica se encuentran diferentes productos de soja, plasma bovino, plasma porcino, diversas materias primas de origen lácteo como por ejemplo leche en polvo, suero lácteo y caseinatos, mezclas de plasma bovino con proteínas lácteas y “mezclas proteicas” que contienen caseinato de sodio, ovoalbúmina, proteínas de cerdo deshidratadas y aislado de soja, entre otros. Estas materias primas proteicas actúan como agentes de retención de agua y emulsionantes de grasa, mejoran la liga durante el masajeo, permiten obtener muy buena coagulación durante la cocción y confieren brillo y humectación al producto terminado (López L et al, 2006).

En nuestro país la Resolución SENASA N° 395/03 estableció que los jamones, paletas y lomos de cerdo cocidos no deben incluir en su formulación sustancias amiláceas ni aislados proteínicos de soja (Resolución N° 395/03 SENASA, 2003). El Boletín Oficial N° 30676 del 16 de junio de 2005 incorporó modificaciones en el Código Alimentario Argentino estableciendo que el jamón cocido (art. 294), la paleta cocida (art. 296) y el lomo de cerdo cocido (art. 297 bis) no pueden contener proteínas agregadas ni otros extensores. Sí permite el agregado de proteínas de soja según el límite para chacinados en fiambre de cerdo cocido (art. 360 bis), fiambre cocido de pata de cerdo (art.360 tris), fiambre cocido de paleta de cerdo (art. 360 quater), fiambre cocido de lomo de cerdo (art. 360 quinto) y fiambre cocido de diferentes especies cárnicas para emparedados (art. 360 sexto). El agregado de soja está permitido en los chacinados en una concentración máxima de 2 % de aislado de soja (Código Alimentario Argentino, Capítulo VI, 2016).

Algunas de las materias primas proteicas utilizadas en los productos cárnicos son alérgenos alimentarios y por lo tanto constituyen un riesgo para pacientes alérgicos, fundamentalmente cuando dichas proteínas no están declaradas en la lista de ingredientes. Como ya se mencionó según el Código Alimentario Argentino, es obligatorio declarar en el rótulo la totalidad de los ingredientes empleados (Código Alimentario Argentino, Capítulo V, 2016). Sin embargo en algunos productos cárnicos se pueden detectar ingredientes proteicos no declarados (López L et al, 2010).

La presencia de proteínas alergénicas no declaradas en los productos cárnicos puede deberse a diversos motivos. Las mismas pueden haber sido agregadas como ingredientes o aditivos y no

se declaran porque no están autorizadas en estos productos. Si están autorizadas puede ocurrir una omisión voluntaria en la declaración, por ejemplo se modifica la formulación pero se siguen utilizando envases no actualizados. La omisión puede ser involuntaria por ejemplo cuando se agrega un ingrediente o aditivo y se desconoce su composición real. Otro motivo puede corresponder a un contacto cruzado, se comparten equipos en el proceso de elaboración y entonces un producto que no debería contener el alérgeno finalmente lo contiene.

El presente trabajo de tesis doctoral plantea una evaluación de metodologías que permitan la detección/cuantificación de bajas concentraciones de proteínas de leche, de soja y de clara de huevo (proteínas alergénicas de mayor importancia en Argentina) en productos cárnicos crudos y cocidos.

1.7) Alérgenos en productos farináceos

En el Código Alimentario Argentino, Artículo 713 se definen a las pastas secas o fideos con huevo como los productos que durante el empaste y amasado mecánico se les incorporan no menos de dos yemas por kilogramo de sémola o harina o sus mezclas. Este producto se rotulará: Fideos con huevo o al huevo (Código Alimentario Argentino, Capítulo IX, 2016).

Otros productos farináceos también involucran el uso de huevo en su elaboración. Además de aumentar el valor nutricional, el huevo cumple una función importante en el desarrollo de las masas fermentadas, mejorando el aspecto y el sabor. La yema mejora las propiedades emulsionantes, por su contenido de lecitinas y en las masas fermentadas, logra una mayor unión de la grasa y el agua. La clara, por su contenido de proteínas, aporta un mayor volumen (Lezcano E, 2011).

La presencia de proteínas de huevo no declaradas en los productos farináceos puede deberse a dos motivos. Las mismas pueden haber sido agregadas en el proceso de elaboración y por errores en los rótulos de los productos no se declaran en la lista de ingredientes. Otro motivo puede corresponder a la presencia de huevo por contacto cruzado, por ejemplo en el caso de fideos, ya sea porque comparten líneas de producción con fideos elaborados con huevo, por la presencia de líneas cercanas de producción de fideos con huevo o porque directamente contienen reproceso con huevo (fideos con huevo que se vuelven a procesar por diferentes motivos).

En productos farináceos también se ha comprobado que es posible la presencia de proteínas de soja, debido a que el trigo utilizado para la elaboración de estos productos puede estar contaminado con soja. Se ha detectado la presencia soja en productos farináceos a nivel mundial. El origen del contacto cruzado de granos se ha investigado y se ha encontrado que podría originarse en el campo, durante la producción y la cosecha o durante el transporte y manipuleo de los mismos. Por lo tanto es probable que se encuentre contacto cruzado con soja en productos que contienen trigo, siendo esto un riesgo para los individuos alérgicos a la soja (Boye J et al., 2010; Ward R, 2015; Cattapan R et al, 2013).

Por lo expuesto previamente en la elaboración de productos farináceos es posible encontrar presencia de huevo y/o de soja aún cuando dichas materias primas no son declaradas en los respectivos rótulos.

En el presente trabajo de tesis doctoral se plantea la evaluación de metodologías que permitan la detección/cuantificación de bajas concentraciones de proteínas de huevo y de soja en fideos secos y en otros productos farináceos.

2) Objetivos Generales

Ante la inminente aprobación en nuestro país de legislación relacionada con la declaración de alérgenos, presentes en los alimentos, y ante la escasa disponibilidad de metodología accesible para realizar un correcto control de los alimentos que se comercializan en nuestro país en cuanto a su contenido de alérgenos, el presente trabajo de tesis plantea el estudio y desarrollo de metodologías que permitan la detección de las proteínas alergénicas de mayor importancia en Argentina. Se trabajó en la detección de proteínas lácteas, de soja y de huevo en productos cárnicos y en la detección de proteínas de soja y de huevo en productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal. Se estudió la complementación de la metodología SDS PAGE con Inmunoblotting con el objetivo de aumentar la sensibilidad en la detección de proteínas alergénicas. Se evaluaron kits comerciales de ELISA disponibles para detección de alérgenos. Se desarrollaron enzimoimmunoensayos. Se establecieron para los diferentes alérgenos de interés en nuestro medio (proteínas lácteas, de soja y de huevo) y en diferentes matrices alimentarias (productos cárnicos y productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal) cual es la metodología que resulta de mayor utilidad y accesibilidad en cada caso.

2.1) Objetivos Particulares

- 1- Evaluar los alcances de SDS-PAGE y de Inmunoblotting para la detección de proteínas lácteas, de soja y de clara de huevo en sistemas modelo cárnicos crudos y cocidos de composición conocida con agregado de leche, suero lácteo, soja o clara de huevo.
- 2- Analizar productos cárnicos comerciales crudos y cocidos con SDS-PAGE y con Inmunoblotting a los fines de detectar la posible presencia de proteínas de leche, de suero lácteo, de soja y de clara de huevo declaradas o no en los respectivos rótulos.
- 3- Determinar con kits comerciales de ELISA la presencia de proteínas de leche, de suero lácteo, de soja y de clara de huevo en sistemas modelo crudos y cocidos de composición conocida con agregado de leche, de suero lácteo, de soja o clara de huevo y en productos cárnicos comerciales con el fin de evaluar la correcta cuantificación de cada uno de ellos y de comparar los resultados hallados con los obtenidos por SDS-PAGE e Inmunoblotting.
- 4- Desarrollar un enzimoimmunoensayo competitivo utilizando antisueros policlonales de conejo específicos contra proteínas de soja para la detección y/o cuantificación de dichas proteínas en productos cárnicos crudos.
- 5- Evaluar los alcances de SDS-PAGE e Inmunoblotting para la detección de proteína de huevo y de soja en sistemas modelo de fideos secos de composición conocida con agregado de huevo y de soja.

- 6- Analizar muestras provistas por la industria de composición conocida y fideos secos comerciales con SDS-PAGE y con Inmunoblotting a los fines de detectar la posible presencia de proteínas de huevo y de soja.
- 7- Determinar con kits comerciales de ELISA la presencia de proteínas de huevo y de soja en sistemas modelo de fideos secos de composición conocida con agregado de huevo y de soja, en muestras provistas por la industria de composición conocida y en fideos secos comerciales con el fin de evaluar la correcta cuantificación de cada uno de ellos y de comparar los resultados hallados con los obtenidos por SDS-PAGE e Inmunoblotting.
- 8- Desarrollar enzimoimmunoensayos competitivos utilizando antisueros policlonales de conejo específicos contra proteínas de soja y de huevo para la detección y/o cuantificación de dichas proteínas en fideos secos comerciales.

3) Materiales y métodos

3.1) Muestras

3.1.1) Materias primas proteicas

Se utilizó leche en polvo descremada de origen comercial (34 % proteínas) y suero lácteo (74% proteínas), clara de huevo (78% proteínas) y huevo entero en polvo (44% proteínas) de origen industrial. También se trabajó con un producto de soja. Este producto supuestamente correspondía a un concentrado de soja, sin embargo el porcentaje de proteínas obtenido por Kjeldahl fue menor al 70% (63% proteína). Por este motivo se hace referencia a producto de soja y no a concentrado de soja (Código Alimentario Argentino, Capítulo XIX, 2016).

3.1.2) Productos cárnicos

3.1.2.1) Sistemas modelo de productos cárnicos crudos

Los sistemas modelos crudos se elaboraron mezclando en una tritadora carne vacuna picada comercial con cada materia prima proteica, en diferentes proporciones, de manera de obtener los sistemas modelo a analizar.

3.1.2.1.1) Sistemas modelo crudos con agregado de leche en polvo

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de carne vacuna con cantidades entre 0 y 5000 ppm de leche en polvo descremada. Los sistemas modelo analizados fueron: 5000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 18 ppm, 10 ppm y 0 ppm de leche en polvo en mezcla con carne vacuna.

3.1.2.1.2) Sistemas modelo crudos con agregado de suero lácteo

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de carne vacuna con cantidades entre 0 y 2000 ppm de suero lácteo. Los sistemas modelo analizados fueron: 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 18 ppm, 10 ppm y 0 ppm de suero lácteo en mezcla con carne vacuna.

3.1.2.1.3) Sistemas modelo crudos con agregado de producto de soja

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de carne vacuna con cantidades entre 0 y 5000 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo analizados fueron: 5000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm, 5 ppm y 0 ppm de producto de soja en mezcla con carne vacuna.

3.1.2.1.4) Sistemas modelo crudos con agregado de clara de huevo

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de carne vacuna con cantidades entre 0 y 2000 ppm de clara de huevo. Los sistemas modelo analizados fueron: 2000 ppm; 1000 ppm; 500 ppm; 100

ppm; 50 ppm; 25 ppm; 18 ppm; 10 ppm; 7,5 ppm; 5 ppm; 4ppm; 2ppm; 1 ppm; 0,5 ppm y 0 ppm de clara de huevo en mezcla con carne vacuna.

3.1.2.2) Sistemas modelo de productos cárnicos cocidos

Para la elaboración de los sistemas modelo de productos cárnicos cocidos se utilizaron fiambres de cerdo elaborados con diferentes materias primas proteicas, en cada caso y un fiambre de cerdo sin agregado de proteínas extrínsecas. Se mezclaron los fiambres correspondientes, en diferentes proporciones, de manera de obtener los sistemas modelo a analizar en cada caso.

Los fiambres de cerdo fueron elaborados en un frigorífico de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina y recibieron un tratamiento térmico en horno industrial con inyección de vapor, durante cuatro horas y media, hasta llegar a una temperatura de aproximadamente 74°C en el centro de la pieza.

3.1.2.2.1) Sistemas modelo cocidos con agregado de leche en polvo

Para la elaboración de los sistemas modelo de fiambres de cerdo cocido con agregado de leche se utilizó un fiambre de cerdo con 0,5 % leche en polvo descremada y un fiambre de cerdo sin agregado de proteínas extrínsecas.

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de fiambre con cantidades entre 0 y 5000 ppm de leche en polvo descremada. Los sistemas modelo analizados fueron: 5000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 18 ppm, 10 ppm y 0 ppm de leche en polvo en fiambre cocido.

3.1.2.2.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de suero lácteo

Para la elaboración de los sistemas modelo de fiambres de cerdo cocido con agregado de suero lácteo se utilizó un fiambre de cerdo con 0,2 % suero lácteo y un fiambre de cerdo sin agregado de proteínas extrínsecas.

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de fiambre con cantidades entre 0 y 2000 ppm de suero lácteo. Los sistemas modelo analizados fueron: 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 18 ppm, 10 ppm y 0 ppm de suero lácteo en fiambre cocido.

3.1.2.2.3) Sistemas modelo cocidos con agregado de producto de soja

Para la elaboración de los sistemas modelo de fiambres de cerdo cocido con agregado de soja se utilizó un fiambre de cerdo con 0,2 % de producto de soja y un fiambre de cerdo sin agregado de proteínas extrínsecas.

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de fiambre con cantidades entre 0 y 2000 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo analizados fueron: 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm, 5 ppm y 0 ppm de producto de soja en fiambre cocido.

3.1.2.2.4) Sistemas modelo cocidos con agregado de clara de huevo

Para la elaboración de los sistemas modelo de fiambres de cerdo cocido con agregado de clara de huevo se utilizó un fiambre de cerdo con 0,2 % clara de huevo y un fiambre de cerdo sin agregado de proteínas extrínsecas.

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de fiambre de cerdo cocido con cantidades entre 0 y 2000 ppm de clara de huevo. Los sistemas modelo analizados fueron: 2000 ppm; 1000 ppm; 500 ppm; 100 ppm; 50 ppm; 25 ppm; 18 ppm; 10 ppm; 7,5 ppm; 5 ppm; 4 ppm; 2 ppm; 1 ppm; 0,5 ppm y 0 ppm de clara de huevo en fiambre cocido.

3.1.2.3) Muestras provistas por la industria

En el caso de las muestras analizadas para los alérgenos soja y leche, algunas muestras fueron provistas por la industria. Se informó la composición y características de cada una de las muestras entregadas.

A continuación se detalla cada muestra analizada mencionando solo los ingredientes proteicos y almidones e información brindada por la industria.

Jamones:

- IJ1: Jamón cocido. Ingredientes: carne de cerdo. Sin agregado de proteínas extrínsecas. No se puede asegurar la ausencia de contacto cruzado.
- IJ2: Jamón cocido. Ingredientes: carne de cerdo, plasma < 0,5%. No se puede asegurar la ausencia de contacto cruzado.
- IJ3: Jamón cocido natural. Ingredientes: carne de cerdo; 0,5 % proteína aislada de soja y 0,5 % proteína concentrada de suero lácteo (WPC 80).
- IJ4: Jamón cocido natural. Ingredientes: carne de cerdo. Muestra sin agregado de proteínas extrínsecas pero que puede haber sufrido contacto cruzado.
- IJ5: Jamón cocido natural. Ingredientes: carne de cerdo. Posible contenido de proteína de cerdo menor a 1 %. Muestra sin agregado de otras proteínas extrínsecas pero que puede haber sufrido contacto cruzado.
- IJ6: Jamón cocido natural. Ingredientes: carne de cerdo. Sin agregado de proteínas extrínsecas. Se presume que no sufrió contacto cruzado.

Fiambres:

- IF1: Fiambre de pata de cerdo. Ingredientes: carne de cerdo; almidón de trigo 5,3 %; almidón de mandioca 3,2 %; proteína de soja y plasma.
- IF2: Fiambre de paleta de cerdo. Ingredientes: carne de cerdo; almidón de trigo 6,9 %; almidón de mandioca 2,1 %; proteína de soja y plasma.

3.1.2.4) Muestras comerciales

Estas muestras fueron adquiridas en supermercados de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. A continuación se detalla la composición de cada muestra en cuanto a ingredientes proteicos y almidones que se describen en listado de ingredientes presente en cada uno de los rótulos.

Fiambres:

- CF1: Fiambre de cerdo. Ingredientes: Carne de cerdo.
- CF2: Fiambre de cerdo. Ingredientes: Carne de cerdo y aislado de soja.
- CF3: Fiambre de cerdo. Ingredientes: Carne de cerdo y leche en polvo descremada.
- CF4: Fiambre de cerdo. Ingredientes: Carne de cerdo y suero lácteo.
- CF5: Fiambre de cerdo. Ingredientes: Carne de cerdo y clara de huevo.
- CF6: Fiambre de cerdo. Ingredientes: Carne de cerdo.

Jamones:

- CJ1: Jamón Cocido feteado seleccionado. Ingredientes: Pernil de cerdo.

Embutidos cocidos:

- CE1: Mortadela. Ingredientes: carne vacuna, carne de cerdo, almidón.
- CE2: Mortadela. Ingredientes: carne vacuna, carne de cerdo, almidón, aislado de soja.
- CE3: Salchicha cocida de pollo. Ingredientes: carne de pollo, almidón.

Embutidos secos:

- CE4: Sopressatta. Ingredientes: carne vacuna, gluten de trigo.
- CE5: Chorizo. Ingredientes: carne vacuna, carne de cerdo.

Medallones de carne:

- CM1: Medallón de carne vacuna con soja congelado. Ingredientes: Carne vacuna, proteínas de soja.

Productos de pescado:

- CP1: Pescaditos de merluza rebozados. Ingredientes: Merluza, rebozador, harina de trigo, almidón.
- CP2: Medallones de merluza. Ingredientes: Merluza, harina de trigo, almidón.
- CP3: Medallones de merluza rebozados congelados. Ingredientes: Merluza, rebozador, harina de trigo, almidón.

3.1.2.5) Muestras analizadas en el desarrollo del ensayo inmunoenzimático competitivo para la detección/cuantificación de soja en productos cárnicos

3.1.2.5.1) Sistemas modelo con agregado de producto de soja

Los sistemas modelo crudos se elaboraron mezclando en una trituradora carne vacuna picada comercial con producto de soja de origen industrial en diferentes proporciones, de manera de obtener los sistemas modelo a analizar. Se analizaron dos sistemas modelo de mezclas de carne vacuna con 75 y 20 ppm de proteína de soja.

3.1.2.5.2) Muestras comerciales

Hamburguesas:

- CH1: Hamburguesa de carne vacuna. Ingredientes: carne vacuna.

- CH2: Hamburguesa de carne vacuna. Ingredientes: carne vacuna.
- CH3 Hamburguesa de carne vacuna. Ingredientes: carne vacuna.

Embutidos Cocidos:

- CE6: Salchicha cocida. Ingredientes: no se conoce la composición de esta muestra.

Salazones:

- CS1: Paleta de cerdo cocida. Ingredientes: no se conoce la composición de esta muestra.

3.1.3) Productos farináceos con huevo

3.1.3.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de huevo

Para la elaboración de estos sistemas modelo se utilizaron pastas secas elaboradas con 0,1 % de huevo entero en polvo y pastas secas sin agregado de huevo. Se molieron y se mezclaron ambas pastas, en diferentes proporciones, de manera de obtener los sistemas modelo a analizar en cada caso.

Ambas pastas fueron elaboradas en una industria elaboradora de pastas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. En la elaboración de las mismas se empleó un secadero estático (capacidad de 13 a 20 kg) para llevar a cabo la etapa de secado, con un diagrama lento y seguro a baja temperatura (45°-60 °C, 16 hs totales de secado). La curva de temperatura se muestra a continuación:

Etapa	T (°C)	HR (%)	Tiempo (h)
1	50	90	2
2	57	85	3
3	60	80	2
4	55	78	2
5	52	72	2
6	50	68	3
7	45	65	2
Total			16 hs.

En este caso particular, se contó con un generador de vapor para alcanzar las humedades relativas buscadas.

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de pastas secas con cantidades entre 0 y 1000 ppm de huevo entero. Los sistemas modelo analizados fueron: 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5 ppm y 0 ppm de huevo entero en polvo en pasta seca.

3.1.3.2) Muestras provistas por la industria

Se analizaron 19 productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

- 6 lotes de fideos de harina de trigo pan (Lotes 1 a 6). Ingredientes: Harina de trigo, sulfato ferroso, cúrcuma.

- 4 lotes de fideos elaborados con sémola de trigo candeal (lotes 7 a 10). Ingredientes: Sémola de trigo candeal, espinaca.
- 1 lote de Producto 1 elaborado con productos molidos que contienen harina y sémola (Lote 11). Ingredientes: Harina enriquecida, sémola, espinaca deshidratada, carbonato de calcio, niacina, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico y cúrcuma.
- 2 lotes de Producto 2 elaborado con productos molidos que contienen harina y sémola (Lotes 12 y 13). Ingredientes: Harina enriquecida, sémola, zapallo deshidratado, azúcar, zanahoria deshidratada, carbonato de calcio, espinaca deshidratada, niacina, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico, cúrcuma, rocú y clorofila.
- 2 lotes de Producto 3 elaborado con productos molidos que contienen harina y sémola (Lotes 14 y 15). Ingredientes: Harina enriquecida, sémola, zapallo deshidratado, carbonato de calcio, niacina, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico y cúrcuma.
- 4 lotes de Producto 4 elaborado con productos molidos que contienen harina y sémola (Lotes 16 a 19). Ingredientes: Harina enriquecida, sémola, carbonato de calcio, niacina, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico y cúrcuma.

3.1.3.3) Muestras comerciales

Se analizaron 9 muestras comerciales correspondientes a fideos secos (muestras F1 a F9) que presentaban en sus respectivos rótulos frases de advertencia sobre la posible presencia de huevo en su composición. Las muestras F1, F2 y F3 correspondían a una misma fábrica de pastas secas (M1), las muestras F4, F5, F6 y F7, correspondían a una segunda fábrica de pastas secas (M2) y las muestras F8 y F9 correspondían a una tercera fábrica de pastas secas (M3). La fábrica M1 utilizaba la frase de advertencia: Este producto se elabora en un equipo que procesa pasta al huevo, la fábrica M2 empleaba la frase: Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo y la fábrica M3 presentaba la frase: Puede contener vestigios de huevo.

- F1: Fideos de sémola de trigo candeal, spaghetti (M1). Ingredientes: Sémola de trigo candeal.
- F2: Fideos secos fortificados con hierro, vitamina B1 y ácido fólico. Spaghetti (M1). Ingredientes: Harina de trigo, sulfato ferroso, hierro, niacina, vitamina B1, Vitamina B2, ácido fólico, colorante cúrcuma.
- F3: Fideos semolados fortificados con hierro. Moños (M1). Ingredientes: Sémola, Harina enriquecida, Ley 25630 (Harina, hierro 30 mg/kg; ácido fólico 2,2 mg/kg; Vitamina B1 6,3 mg/kg; Vitamina B2 1,3 mg/kg; niacina 13 mg/kg), hierro.
- F4: Fideos de sémola de trigo candeal y sémola de trigo pan, Foratini (M2). Ingredientes: Sémola de trigo candeal, sémola de trigo pan.
- F5: Fideos Bavettas (M2). Ingredientes: Harina de trigo enriquecida, Ley 25630 (harina, hierro 30 mg/Kg; ácido fólico 2,2 mg/Kg; vitamina B1 6,3 mg/Kg; vitamina B2 1,3 mg/Kg niacina 13 mg/Kg).
- F6: Fideos de sémola de trigo candeal y sémola de trigo pan. Spaghetti (M2). Ingredientes: Sémola de trigo candeal, sémola de trigo pan.
- F7: Fideos Cellentani. (M2). Ingredientes: Harina de trigo enriquecida, Ley 25630 (Harina, hierro 30 mg/kg; ácido fólico 2,2 mg/kg; Vitamina B1 6,3 mg/kg; Vitamina B2 1,3 mg/kg; niacina 13 mg/kg) hierro.

- **F8:** Fideos secos, spaghetti (M3). Ingredientes: Semolín de trigo pan, semolín de trigo candeal, agua, colorante natural cúrcuma.
- **F9:** Fideos secos. Coditos (M3). Ingredientes: Semolín de trigo pan, semolín de trigo candeal, agua, colorante.

3.1.3.4) Muestras analizadas en el desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de huevo en pastas secas

3.1.3.4.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de huevo

Para la elaboración de los sistemas modelo de pastas secas se utilizaron pastas secas elaboradas con 0,1% de huevo entero en polvo y pastas secas sin agregado de huevo. Se molieron y se mezclaron ambas pastas en diferentes proporciones de manera de obtener los sistemas modelo a analizar en cada caso. Ambas pastas fueron elaboradas como se describió en 3.1.3.1). Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150 ppm de proteína de huevo entero en polvo.

3.1.3.4.2) Muestras comerciales

- **F10:** Fideos de sémola de trigo candeal, fussilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.
- **F11:** Fideos de sémola de trigo candeal, fussilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.
- **F12:** Fideos de sémola de trigo candeal, fussilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.
- **F13:** Fideos de sémola de trigo candeal, fussilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.
- **F14:** Fideos de sémola de trigo candeal, fussilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.
- **F15:** Fideos de sémola de trigo candeal, fussilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.
- **F16:** Fideos de sémola de trigo candeal, fussilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.

3.1.4) Productos farináceos con soja

3.1.4.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de soja

Para la elaboración de los sistemas modelo de pastas secas se utilizaron pastas secas elaboradas con 0,1 % de producto de soja y pastas secas sin agregado de soja. Se molieron y se mezclaron ambas pastas en diferentes proporciones de manera de obtener los sistemas modelo a analizar en cada caso. Ambas pastas fueron elaboradas como se describió en 3.1.3.1).

Se analizaron sistemas modelo de mezclas de pastas secas con cantidades entre 0 y 1000 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo analizados fueron: 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 100 ppm; 50 ppm; 30 ppm; 20ppm; 10 ppm; 7,5 ppm; 5 ppm; 2,5 ppm y 0 ppm de producto de soja en pastas secas.

3.1.4.2) Muestras provistas por la industria

Se analizaron 19 productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria descriptos en 3.1.3.2).

3.1.4.3) Muestras comerciales

Se analizaron 13 muestras comerciales correspondientes a productos farináceos.

- PF1: Fideos secos fortificados con hierro y calcio. Tallarín. Ingredientes: Semolín de trigo pan, semolín de trigo candeal, agua, carbonato de calcio, fumarato ferroso, colorante natural: cúrcuma.
- PF2: Fideos de semolín de trigo pan coloreados con cúrcuma. Spaghetti. Ingredientes: Semolín de trigo pan, agua y cúrcuma (colorante natural).
- PF3: Fideos secos. Penne Rigatte. Ingredientes: Sémola de trigo candeal, sémola de trigo pan.
- PF4: Fideos de sémola de trigo candeal fortificados con vitaminas A, B1, B2, B6, B9, B12, D, hierro y zinc. Tirabuzón. Ingredientes: Sémola de trigo candeal, fumarato ferroso, óxido de zinc, riboflavina, vitamina B6, tiamina, vitamina A, ácido fólico, vitamina D, vitamina B12.

Muestras PF5, PF6, PF7, PF8, PF9, PF10: Harina de trigo.

- PF11: Premezcla para preparar tortas fritas. Ingredientes: Harina enriquecida, sal, aceite vegetal hidrogenado, leudantes químicos.
- PF12: Premezcla para pizza. Ingredientes: Harina tipo 0000 enriquecida; oleomargarina; sal; azúcar; leudantes químicos INS 500ii, 541i, 341i; saborizante a pizza; fosfato tricálcico; hierro; vitamina B6.
- PF13: Producto en polvo a base de harina de trigo, cebada, avena, maíz, arroz, vitaminas y minerales, para lactantes a partir de los 6 meses de vida y niños de la primera infancia. Ingredientes: Harina de trigo, azúcar, agua, harina de cebada, extracto de malta, harina de avena, harina de maíz, harina de arroz, carbonato de calcio, fosfato disódico, Cultivos Bifidus (Bifidobacterium Lactis), vitaminas (A, D, E, C, Niacina, Ácido pantoténico, B1, B6, Ácido fólico, Biotina), sulfato de zinc, fumarato ferroso, aromatizante (vainillina).

3.1.4.4) Muestras analizadas en el desarrollo del ensayo inmunoenzimático competitivo para la detección/cuantificación de soja en pastas secas

3.1.4.4.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de soja

Para la elaboración de los sistemas modelo de pastas secas se utilizaron pastas secas elaboradas con 0,1% de producto de soja y pastas secas sin agregado de soja. Se molieron y se mezclaron ambas pastas en diferentes proporciones de manera de obtener los sistemas modelo a analizar en cada caso. Ambas pastas fueron elaboradas como se describió en 3.1.3.1).

Se analizaron dos sistemas modelo de mezclas de pastas secas con 300 y 150 ppm de proteína de producto de soja.

3.1.4.4.2) Muestras comerciales

- F17: Fideos secos. Ingredientes: semolín de trigo pan.
- F18: Fideos secos. Ingredientes: semolín de trigo pan.
- F19: Fideos secos. Ingredientes: semolín de trigo pan.
- F20: Fideos secos. Ingredientes: semolín de trigo pan.
- F21: Fideos secos. Ingredientes: semolín de trigo pan.
- F22: Fideos secos. Ingredientes: semolín de trigo pan.

- **F23:** Fideos secos. Ingredientes: sémola de trigo candeal.
- **F24:** Fideos secos. Ingredientes: sémola de trigo candeal.

3.2) Métodos

3.2.1) Tratamiento de las muestras para su análisis electroforético y por Inmunoblotting

Los productos cárnicos fueron homogeneizados en una procesadora y los productos farináceos (pastas secas) fueron homogeneizados en un molinillo.

3.2.1.1) Desgrasado/Deshidratado

Los productos cárnicos fueron desgrasados/deshidratados con acetona. Se pesaron 10 g de muestra. El desgrasado/deshidratado de los sistemas modelo y de las muestras comerciales, previamente picados y pesados, se realizó 2 veces con 100 mL de acetona por agitación en homogeneizador VirTis modelo 23, durante 5 minutos a velocidad media. La separación de la acetona se realizó por volcado dejando que el residuo sólido sedimente previamente (Olivera Carrión M, 1988). El residuo obtenido se secó bajo lámpara (150W). Las muestras desgrasadas y secas fueron molidas hasta una granulometría de 35 mesh para la extracción de proteínas (López L, 2000).

3.2.1.2) Extracción de proteínas totales

Se realizó con Buffer Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) – HCl 0,0625 M (pH: 6,8) con 3 % de dodecilsulfato de sodio (SDS) y 2 % de 2-mercaptoetanol (2-ME). Este corresponde a la solución extractiva de proteínas totales.

Las materias primas proteicas descritas en 3.1.1) se utilizaron como controles.

Para la extracción de proteínas totales se pesaron alícuotas de las muestras desgrasadas y secas de manera que la concentración final en el extracto fuera de 5 a 15 mg de proteínas por mL de solución extractiva. Se agregaron 2 mL de la solución extractiva y se agitó con varilla. Se calentaron los tubos en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Aproximadamente transcurridos 2 minutos en el baño se volvió a agitar con varilla enérgicamente. Se trasvasó el contenido de los tubos de extracción a tubos de plástico y se centrifugaron. Los productos cárnicos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y los productos farináceos a 11000 rpm durante 15 minutos a 20°C. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos Eppendorf y se conservaron a – 20°C hasta su análisis (Olivera Carrión M, 1988; López L, 2000).

3.2.1.3) Extracción de proteínas solubles en isopropanol 55° + 2% de 2-mercaptoetanol (ISO 55°+ 2ME)

Se utilizó como control leche en polvo descremada.

Se pesaron en los recipientes de extracción 350 mg de productos cárnicos molidos y desgrasados/deshidratados y 50 mg de leche en polvo. Se agregaron 2 mL ISO 55° + 2ME. Se agitaron en homogeneizador VirTis modelo 23 durante 5 minutos a velocidad media, se dejaron 60 minutos en reposo y se volvieron a agitar 5 minutos más. Se trasvasó el contenido de los recipientes de extracción a tubos de plástico y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos Eppendorf y se analizaron el mismo día de la extracción (López L, 2000).

3.2.2) Metodología

3.2.2.1) SDS-PAGE

Se utilizó el sistema de Laemmli (Laemmli U, 1970). Se trabajó con geles de poliacrilamida en sistema discontinuo, con gel de separación (poro fino) y gel de concentración (poro grueso). El gel de separación se preparó con 10 % de acrilamida en una solución 1,5 M Tris-ClH con 0,4 % de SDS (pH 8,8). El gel de concentración se preparó con 3 % de acrilamida en una solución 0,5 M de Tris-ClH con 0,4 % de SDS (pH 6,8). Se utilizó como buffer de corrida: 0,025 M Tris; 0,192 M glicina; 0,1 % SDS; pH: 8,3.

Para la siembra de los extractos de proteínas totales y de proteínas solubles en ISO 55°+ 2-ME se realizaron en cada caso las siguientes mezclas:

- 1 volumen de extracto de proteínas totales de la muestra + 1/2 volumen de glicerina 50 % + 1/2 volumen de solución de azul de bromofenol (0,001 % en agua).
- 1 volumen de extracto de proteínas solubles en ISO 55° + 2-ME de la muestra + 1 volumen de glicerina 50 % + 1/10 volumen de solución de azul de bromofenol (0,001 % en agua).

Las alícuotas sembradas de los extractos de proteínas totales fueron 5 µL. El volumen de siembra de los extractos de ISO 55°+ 2ME fue de 15 µL para los sistemas modelos y para las muestras y 5 µL para los controles.

Las corridas electroforéticas se realizaron utilizando cubas electroforéticas Mini protean 3 Cell de Bio Rad y Tetra Cell de Bio Rad y fuente de poder Power Pac 300 de Bio Rad durante 45 a 55 minutos a 180 volts. La tinción de las placas se realizó con Coomassie Brilliant Blue R 250 al 0,1 % en solución metanol 40 % y ácido acético 10 % (solución colorante) durante 30 minutos. La destinción de las placas se realizó por difusión con etanol 40 % y ácido acético 10 % (solución decolorante) en 2 períodos de 20 minutos cada uno. Se descartaron las soluciones decolorantes utilizadas. En todos los casos las placas se conservaron en solución de ácido acético 7% con unas gotas de solución colorante hasta su densitometría, posteriormente se secaron en Gelair Dryer de Bio Rad. Las placas desecadas se conservaron en sobres de papel.

Las resoluciones proteicas obtenidas se densitometraron por transmisión con equipo Shimadzu Dual - Wavelength Chromatogram Scanner Model CS - 910. Se trabajó con longitud de onda de máxima absorción de 550 nm y de mínima absorción, utilizada como referencia, de 400 nm. La adquisición de datos se realizó con el programa Chromatography Station CSW de DataApex Ltd. (López L, 2000). En todos los casos se trabajó por duplicado.

3.2.2.2) Obtención de Anticuerpos primarios utilizados en Inmunoblotting y en los enzimoimmunoensayos desarrollados

Se empleó antisuero policlonal obtenido en conejos inmunizados con leche bovina o extracto de soja, obtenidos según Rozenfeld P et al, 2002. Se inocularon conejos NZW con 100 µg de proteína de leche bovina o proteína de soja emulsificadas con adyuvante de Freund completo. Se administraron cada tres semanas una serie de cuatro inyecciones (50 µg) del mismo antígeno emulsificado en adyuvante de Freund incompleto. El título del anticuerpo se determinó por ELISA indirecto. Estos antisueros policlonales fueron proporcionados por el Doctor Guillermo Docena del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos IIFP, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Para la detección de huevo se empleó antisuero policlonal obtenido en conejos inmunizados con una solución que contenía huevo sin tratamiento y con diferentes tratamientos. Se preparó una solución de huevo en polvo en PBS (1mg/mL) y se separó en tres porciones: una porción sin tratar, otra porción se calentó a 60°C 2 horas y la última a 100 °C 1 minuto. Se combinaron las tres porciones y se continuó con el protocolo de obtención de anticuerpos citado anteriormente. Este antisuero policlonal fue proporcionado por el Doctor Gustavo Polenta del Laboratorio de Compuestos Proteicos, Instituto de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

3.2.2.3) Inmunoblotting

Se realizó la separación electroforética por SDS-PAGE como se describió en 3.2.2.1). Luego se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana de nitrocelulosa, según Towbin H et al, 1979, mediante el sistema comercial de Bio-Rad. Previamente se hidrataron los geles, los filtros, las membranas previamente cortadas y los pads, durante 20 minutos con el buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% v/v metanol, pH 8,3). Posteriormente se preparó el sándwich de gel en el casete, el cual se colocó en el módulo de transferencia. Este módulo se colocó junto con una unidad de frío en la cuba, llenando la misma con el buffer. Se realizó la transferencia durante 60 minutos a 100 V y 350 mA, con agitación. A continuación las membranas fueron bloqueadas con 7 mL de solución de bloqueo, que contiene 1,2 g de plasma porcino disuelto en 30 mL de solución TBS-Tween 20 (0,05 M Tris; 0,15 M NaCl; pH: 7,5 con 0,125 % v/v Tween 20). Se incubó durante 30 minutos con agitación. Se agregaron 5,8 µL del antisuero policlonal obtenido en conejos específico de la proteína en estudio (anticuerpo primario) y se incubó 1 hora y 30 minutos con agitación. Posteriormente se descartó la solución y se lavó 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con 7 mL de solución TBS-Tween 20, con agitación. Se agregaron 7 mL de solución de bloqueo y 15 µL del anticuerpo secundario (Anti IgG conjugado con fosfatasa alcalina de Bio-Rad). Se agitó 1 hora 30 minutos. Se lavó 3 veces durante 5 minutos cada vez con 7 mL de solución TBS-Tween 20, con agitación. La solución fue descartada y se tiñó la membrana con 7 mL de reactivo colorante de BIO-RAD (Alkaline Phosphatase conjugate substrate kit, Catalog Number 170-6432). La misma se dejó reposar durante 7 minutos. Finalmente se lavó tres veces, durante

3 minutos cada vez, con 7 mL de agua destilada, con agitación. Las membranas se conservaron entre papeles absorbentes.

3.2.2.4) ELISA con kits comerciales

Para la determinación por el método ELISA de la presencia de proteínas de soja, leche o huevo se utilizaron diferentes kits comerciales:

Para leche:

Neogen Veratox® for Total Milk Allergen, R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Milk, R-Biopharm RIDASCREEN® FAST β -Lactoglobulin, R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Casein.

Para Soja:

Neogen ELISA Alert® for Soy, Neogen Veratox® for Soy Allergen, Romer AgraQuant® Soy Assay, R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Soya.

Para huevo:

R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein, Neogen Veratox® for Egg Allergen, Romer AgraQuant® Egg white Assay.

Todas las muestras se analizaron por duplicado siguiendo los protocolos de trabajo de cada uno de los kits, los que se describen a continuación:

- Neogen, Veratox® for Total Milk Allergen: (Código: 8470)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por Neogen, Veratox® para leche total. Este consiste en un ELISA sándwich para el análisis cuantitativo de proteínas de la leche, suero y caseína en alimentos (Neogen Veratox® For Total Milk Allergen, 2011).

El límite de detección del kit es de 1 ppm de leche en polvo descremada y el rango de cuantificación: 2,5-25 ppm de leche en polvo descremada.

Extracción de proteínas:

1. Se preparó la solución de extracción 10 mM PBS. La misma fue precalentada a 60°C.
2. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesaron 5 g en frascos estériles.
3. Una cucharada de aditivo de extracción de leche (el kit no detalla la composición del aditivo) se agregó en cada frasco con muestra y 125 mL de la solución de extracción a 60°C.
4. Se extrajo por agitación en baño de agua a 60°C por 15 minutos.
5. Luego se mantuvo durante 5 minutos en reposo.
6. Se transfirieron 2 mL de sobrenadante con una micropipeta a tubos Eppendorf.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de leche en polvo descremada: 0 ppm; 2,5 ppm; 5 ppm; 10 ppm; y 25 ppm.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente (18-30°C). Se agregaron 100 µL de cada solución estándar y de muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó con solución buffer de lavado que provee el kit, esto se repitió 5 veces.
3. Se agregaron 100 µL del anticuerpo anti leche unido a una enzima, en cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) en oscuridad.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con solución buffer de lavado provista por el kit.
5. Se agregaron 100 µL de la solución de sustrato cromógeno provista por el kit en cada pocillo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Finalmente se agregaron 100 µL de la solución stop (ácido sulfúrico 1N)
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 650 nm (lector de microplacas de ELISA RT-2100C, Rayto).

Resultados

Se utilizó un software especial Neogen's Log/Logit software provisto por Neogen. La concentración de leche en polvo descremada se determinó usando la curva de calibración provista por el kit.

- RIDASCREEN® FAST Milk: (Art. N° 4652)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por R-Biopharm. Este consiste en un ELISA sándwich para el análisis cuantitativo de proteínas de leche en productos que contengan suero, leche o leche en polvo (R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Milk, 2011).

El límite de detección del test es de 0,7 ppm de proteína de leche y el límite de cuantificación de 2,5 ppm de proteína de leche.

Extracción de leche:

1. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesó 1 g en frascos estériles y se agregaron 4 mL de la solución de extracción 2 (el kit detalla que contiene betamercaptoetanol en su composición). Se agitó y colocó durante 10 minutos a 100°C en baño de agua.
2. Se dejó enfriar. Se agregaron 16 mL de buffer de extracción de alérgenos conteniendo aditivo 1 (el kit no detalla la composición del buffer de extracción de alérgeno ni del aditivo) a cada muestra cocida.
3. Se extrajo durante 10 minutos a 60°C en baño de agua con agitación.
4. Se enfriaron las muestras con agua helada y se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm.
5. Las muestras fueron diluidas 1:5 con la solución buffer de extracción de alérgenos, sin el agregado de aditivo 1.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de proteína de leche: 0 ppm; 2,5 ppm; 7,5 ppm; 22,5 ppm; y 67,5 ppm.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μL de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó con 250 μL de solución buffer de lavado que provee el kit (el kit no detalla la composición de dicha solución). Esto se repitió 5 veces.
3. Se agregaron 100 μL del anticuerpo conjugado con peroxidasa en cada pocillo (el kit no detalla la composición de dicha solución) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con 250 μL de solución buffer de lavado.
5. Se agregaron 100 μL de la solución de sustrato cromógeno en cada pocillo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Se agregaron 100 μL de la solución stop (ácido sulfúrico 1N)
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 450 nm.

Resultados

Se utilizó un software especial RIDA®SOFT Win, provisto por R-Biopharm. La concentración de proteínas de leche en la muestra se determinó usando la curva de calibración de estándar de proteínas de leche de concentración conocida.

- RIDASCREEN® FAST β lactoglobulin: (Art. N°: R4902)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por R-Biopharm. Este consiste en un ELISA sándwich para el análisis cuantitativo de proteínas nativas y procesadas en productos que contengan suero, leche o leche en polvo (R-Biopharm RIDASCREEN® FAST β -Lactoglobulin, 2011).

El límite de detección del test es de 0,19 ppm de β lactoglobulina y el límite de cuantificación de 0,5 ppm de β lactoglobulina.

Extracción de β lactoglobulina:

1. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesó 1 g en frascos estériles y se agregaron 4 mL de la solución de extracción 2 (el kit no detalla la composición de la solución), se agitó y colocó durante 10 minutos a 100°C en baño de agua.
2. Se dejó enfriar. Se agregaron 16 mL de solución buffer de extracción de alérgeno conteniendo aditivo 1 a cada muestra cocida (el kit no detalla la composición de estos reactivos). Se extrajo durante 10 minutos a 60°C en baño de agua con agitación.
3. Se enfriaron las muestras con agua helada y se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm.

4. Las muestras fueron diluidas 1:5 con la solución buffer de extracción de alérgenos, sin el agregado de aditivo 1.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de β lactoglobulina: 0 ppm; 0,5 ppm; 1,5 ppm; 4,5 ppm; y 13,5 ppm.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μ L de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó con 250 μ L de solución buffer de lavado que provee el kit (el kit no detalla la composición de esta solución). Esto se repitió 3 veces.
3. Se agregaron 100 μ L del anticuerpo anti β lactoglobulina unido a peroxidasa en cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 3 veces con 250 μ L de solución buffer de lavado.
5. Se agregaron 100 μ L de la solución de sustrato cromógeno en cada pocillo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Se agregaron 100 μ L de la solución stop (ácido sulfúrico 1N).
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 450 nm.

Resultados

Se utilizó un software especial RIDA®SOFT Win, provisto por R-Biopharm. La concentración de β lactoglobulina en la muestra se determinó usando la curva de calibración de estándar de β lactoglobulina de concentración conocida.

- RIDASCREEN® Fast Casein: (Art. N° 4612)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por R-Biopharm. Este consiste en un ELISA sándwich para el análisis cuantitativo de caseína en alimentos (R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Casein, 2011).

El límite de detección del test es de 0,12 ppm de caseínas y el límite de cuantificación de 0,5 ppm de caseínas.

Extracción de caseína:

1. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesó 1 g en frascos estériles, a la misma se le agregaron 20 mL del buffer de extracción calentado a 60°C provisto por el kit. El kit no detalla la composición de dicha solución.
2. Se mezcló y se extrajo por 10 minutos a 60°C con agitación.
3. Se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm.
4. Se transfirieron 2 mL de sobrenadante con una micropipeta a tubos Eppendorf.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de caseína: 0 ppm; 0,5 ppm; 1,5 ppm; 4,5 ppm; y 13,5 ppm.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μL de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó con 250 μL de solución buffer de lavado que provee el kit (el kit no detalla la composición de dicha solución). Esto se repitió 5 veces.
3. Se agregaron 100 μL del anticuerpo anti caseína unido a peroxidasa en cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con 250 μL de solución buffer de lavado provista por el kit.
5. Se agregaron 100 μL de la solución de sustrato cromógeno provista por el kit en cada pocillo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Finalmente se agregaron 100 μL de la solución stop (ácido sulfúrico 1N).
7. Se midió la absorbancia en un lector de pocillos con un filtro de 450 nm.

Resultados

Se utilizó un software especial RIDA®SOFT Win, provisto por R-Biopharm. La concentración de caseína en la muestra se determinó usando la curva de calibración de estándar de caseína de concentración conocida.

- Neogen, ELISA Alert for Soy (Código: 8491)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por Neogen. La técnica consiste en un test de tipo cualitativo, para la detección de soja en alimentos (Neogen ELISA Alert® for Soy, 2009).

Extracción de proteínas de soja:

1. Se preparó la solución de extracción (10 mM PBS). Esta solución de extracción fue precalentada a 60°C.
2. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesaron 5 g en frascos estériles. Se agregó una cucharada de aditivo de extracción de soja (el kit no detalla la composición del aditivo) y 125 mL de la solución de extracción a 60°C en cada frasco. Se extrajo por agitación en baño de agua a 60°C por 15 minutos.
3. Se mantuvo durante 5 minutos en reposo, para luego centrifugar a 4000 rpm 10 minutos. Se transfirió 1 mL del sobrenadante con una micropipeta a frascos proporcionados por el kit.

Controles:

Se utilizaron dos controles positivos con 5 ppm y con 10 ppm de harina de soja.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente (18-30°C). Se mezcló cada reactivo antes de su uso y se agregaron tres gotas de los controles y de las muestras en los respectivos pocillos, se agitó por 20 segundos, para luego incubar los pocillos por 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C).
2. Se descartó el contenido de los pocillos y empleando solución buffer de lavado (10mM PBS Tween) se lavaron los pocillos 10 veces.
3. Luego se agregaron tres gotas del conjugado provisto por el kit a cada pocillo, se mezcló durante 20 segundos y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C).
4. Se descartó el contenido de los pocillos y empleando solución buffer de lavado se lavaron los pocillos 10 veces.
5. Tres gotas del sustrato provisto por el kit se agregaron a cada pocillo. Se mezcló durante 20 segundos y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C). El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Finalmente se agregaron tres gotas de la solución Stop (ácido sulfúrico 1N) a cada pocillo, se mezcló por 20 segundos, para finalmente leer los resultados.

Interpretación de resultados

Si bien la interpretación de los resultados puede realizarse visualmente, se midió la absorbancia de los diferentes pocillos en un lector de ELISA con un filtro de 650 nm. Los resultados se obtuvieron comparando con los pocillos control que contenían 5 y 10 ppm de harina de soja. Si la muestra tenía una densidad óptica mayor que el pocillo control de 10 ppm, la muestra fue considerada positiva con valores mayores a 10 ppm. Si la muestra tenía una densidad óptica intermedia entre las de los controles de 5 y 10 ppm de harina de soja, la muestra fue considerada positiva con valores entre 5 y 10 ppm de harina de soja. Si la muestra tenía una densidad óptica menor que el pocillo control de 5 ppm, la muestra fue considerada negativa.

- Neogen Veratox® quantitative Soy Allergen test: (Código: 8410)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por Neogen. Dado que este kit se modificó durante el desarrollo de esta tesis doctoral, para algunos productos se utilizó un kit comercial del año 2011, y para otros productos se utilizó el kit que actualmente se encuentra en el mercado. Consiste en un ELISA sándwich para el análisis cuantitativo de soja en alimentos (Neogen Veratox® quantitative Soy Allergen test, 2014).

Este test detecta proteínas de soja y los resultados se expresan como ppm de aislado de proteína de soja o ppm de harina de soja (2011 y actual, respectivamente). El límite de cuantificación del kit del 2011 era de: 10 ppm de aislado de soja y el rango de cuantificación era de 10-100 ppm. En el caso del kit actual es de: 2,5 ppm de harina de soja y el rango de cuantificación es de 2,5-25 ppm.

Extracción de soja:

1. Se preparó la solución de extracción (10 mM PBS). La misma fue precalentada a 60°C
2. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesaron 5 g en frascos estériles.

3. Una cucharada de aditivo de extracción de soja se agregó en cada frasco con muestra (el kit no detalla la composición del aditivo) y 125 mL de la solución de extracción a 60°C.
4. Se extrajo por agitación en baño de agua a 60°C por 15 minutos.
5. Luego se mantuvo durante 5 minutos en reposo.
6. Se transfirieron 2 mL de sobrenadante con una micropipeta a tubos Eppendorf.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva:

- Kit del 2011 concentraciones de aislado de soja: 0 ppm; 10 ppm; 25 ppm; 50 ppm; y 100 ppm.
- Kit actual concentraciones de harina de soja: 0 ppm; 2,5 ppm; 5 ppm; 10 ppm y 25 ppm.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente (18-30°C). Se agregaron 100 µL de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con solución buffer de lavado que provee el kit.
3. Se agregaron 100 µL del anticuerpo conjugado en cada pocillo (el kit no detalla la composición de dicha solución) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) en oscuridad.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con solución buffer de lavado.
5. Se agregaron 100 µL de la solución de sustrato cromógeno en cada pocillo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Se agregaron 100 µL de la solución stop (ácido sulfúrico 1N).
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 650 nm.

Resultados

Se utilizó un software especial Neogen's Log/Logit software provisto por Neogen. La concentración de aislado de soja o de harina de soja se determinó usando la curva de calibración provista por el kit.

- Romer AgraQuant® Soy Assay: (COKAL0448)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por Romer. La técnica consiste en un enzimoimmunoensayo tipo sándwich cuantitativo, que determina la presencia de soja en alimentos (Romer AgraQuant® Soy Assay, 2011). Este kit determina la presencia de soja en los alimentos a través de anticuerpos específicos contra una proteína inhibidora de tripsina de soja (STI).

El límite de detección del test es de 16 ppb de Inhibidor de Tripsina de soja y el límite de cuantificación de 40 ppb de Inhibidor de Tripsina de soja. El rango de cuantificación: 40-1000 ppb de Inhibidor de Tripsina de soja.

Extracción de Soja:

1. Se tomó una cantidad representativa de muestra (5 g) y se homogeneizó en un molinillo o procesadora, de la cual se pesó 1 g en frascos estériles y se agregaron 20 mL de la solución de extracción diluida previamente (el kit no detalla la composición de dicha solución).
2. Se agitó y colocó durante 15 minutos a 60°C en baño de agua.
3. Se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de Inhibidor de Tripsina de soja: 0 ppb; 40 ppb; 100 ppb; 400 ppb; y 1000 ppb.

Procedimiento del test:

1. Se agregaron 100 µL de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó llenando los pocillos con solución buffer de lavado que provee el kit (el kit no detalla la composición de dicha solución). Esto se repitió 5 veces.
3. Se agregaron 100 µL del conjugado (el kit no detalla la composición de dicha solución) en cada pocillo y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó llenando los pocillos con solución buffer de lavado que provee el kit. Esto se repitió 5 veces.
5. Se agregaron 100 µL de la solución de sustrato cromógeno en cada pocillo y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Se agregaron 100 µL de la solución stop (ácido sulfúrico 1N).
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 450 nm.

Resultados:

Se utilizó un software especial provisto por Romer Labs®. La concentración de Inhibidor de Tripsina de soja en la muestra se determinó usando la curva de calibración de estándar de Inhibidor de Tripsina de soja de concentración conocida. Los resultados se expresan en ppb de inhibidor de Tripsina de soja.

- R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Soya: (Art. N°: R7102)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por R-Biopharm. Este consiste en un ELISA sándwich para el análisis cuantitativo de soja en alimentos (R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Soya, 2011).

El límite de detección del test es de 0,31 ppm de proteína de soja y el límite de cuantificación de 2,5 ppm de proteína de soja.

Extracción de soja:

1. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesó 1 g en frascos estériles y se agregaron 2,5 mL de la solución de extracción 2 (el kit detalla que contiene

betamercaptoetanol en su composición) provista por el kit y 17,5 ml del buffer de extracción diluido (el kit no detalla la composición de dicha solución) calentado a 60 °C. Se agitó y colocó durante 10 minutos a 100°C en baño de agua.

2. Se enfriaron las muestras con agua helada y se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm.
3. Las muestras fueron diluidas 1:5 con la solución buffer de extracción de alérgenos.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de proteína de soja: 0 ppm; 2,5 ppm; 5 ppm; 10 ppm; y 20 ppm.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µL de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó con 250 µL de solución buffer de lavado que provee el kit (el kit no detalla la composición de dicha solución). Esto se repitió 5 veces.
3. Se agregaron 100 µL del anticuerpo conjugado con peroxidasa en cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con 250 µL de solución buffer de lavado.
5. Se agregaron 100 µL de la solución de sustrato cromógeno en cada pocillo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Se agregaron 100 µL de la solución stop (ácido sulfúrico 1N).
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 450 nm.

Resultados

Se utilizó un software especial RIDA®SOFT Win, provisto por R-Biopharm. La concentración de proteína de soja en la muestra se determinó usando la curva de calibración de estándar de proteína de soja de concentración conocida.

- RIDASCREEN® FAST Ei/Egg protein: (Art. N°: R6402)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por R-Biopharm. Este consiste en un ELISA sándwich para el análisis cuantitativo de productos que contengan huevo entero en polvo (R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein, 2012).

El límite de detección del test es de 0,1 ppm de huevo entero en polvo y el límite de cuantificación de 0,5 ppm de huevo entero en polvo.

Extracción de huevo:

1. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesó 1 g en frascos estériles y se agregaron 20 ml de solución buffer de extracción (el kit no detalla la composición de dicha solución).
2. Se extrajo durante 10 minutos a 60°C en baño de agua con agitación.

3. Se enfriaron las muestras y se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de huevo entero en polvo: 0 ppm; 0,5 ppm; 1,5 ppm; 4,5 ppm; y 13,5 ppm.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μL de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó con 250 μL de solución buffer de lavado que provee el kit (el kit no detalla la composición de dicha solución). Esto se repitió 5 veces.
3. Se agregaron 100 μL del anticuerpo conjugado con peroxidasa en cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con 250 μL de solución buffer de lavado.
5. Se agregaron 100 μL de la solución de sustrato cromógeno en cada pocillo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Se agregaron 100 μL de la solución stop (ácido sulfúrico 1N).
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 450 nm.

Resultados

Se utilizó un software especial RIDA®SOFT Win, provisto por R-Biopharm. La concentración de huevo entero en polvo en la muestra se determinó usando la curva de calibración. El factor de conversión de huevo entero en polvo a proteína de clara de huevo utilizado es 0,263.

- Neogen Veratox® for Egg Allergen: (Código: 8450)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por Neogen, Veratox® para huevo. Este consiste en un ELISA sándwich para el análisis cuantitativo de proteínas de huevo en alimentos (Neogen Veratox® for Egg Allergen, 2013).

El límite de cuantificación del kit es de: 2,5 ppm de huevo entero en polvo y el rango de cuantificación: 2,5-25 ppm de huevo entero en polvo.

Extracción de proteínas:

1. Se preparó la solución de extracción (10 mM PBS). La misma fue precalentada a 60°C.
2. Se tomó una cantidad representativa de muestra molida previamente, de la cual se pesaron 5 g en frascos estériles.
3. Una cucharada de aditivo de extracción de huevo (el kit no detalla la composición del aditivo) se agregó en cada frasco con muestra y 125 mL de la solución de extracción a 60°C.
4. Se extrajo por agitación en baño de agua a 60°C por 15 minutos.
5. Luego se mantuvo durante 5 minutos en reposo.

6. Se transfirieron 2 mL de sobrenadante con una micropipeta a tubos Eppendorf.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de huevo entero en polvo: 0 ppm; 2,5 ppm; 5 ppm; 10 ppm; y 25 ppm.

Procedimiento del test:

1. Antes de iniciar el test se aseguró que el kit y todos los reactivos del mismo se encontraran a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μ L de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó con solución buffer de lavado (10 mM PBS-Tween) que provee el kit, esto se repitió 5 veces.
3. Se agregaron 100 μ L del anticuerpo anti huevo unido a una enzima en cada pocillo (el kit no detalla la composición de dicha solución) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con solución buffer de lavado provista por el kit.
5. Se agregaron 100 μ L de la solución de sustrato cromógeno provista por el kit en cada pocillo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Finalmente se agregaron 100 μ L de la solución stop (ácido sulfúrico 1N)
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 650 nm.

Resultados

Se utilizó un software especial provisto por Neogen. La concentración de huevo entero en polvo se determinó usando la curva de calibración provista por el kit.

- Romer AgraQuant® Egg White Assay: (COKAL0848)

Se trabajó con un kit comercial desarrollado por Romer. La técnica consiste en un enzimoinmunoensayo tipo sándwich cuantitativo, que determina la presencia de proteína de clara de huevo en alimentos (Romer AgraQuant® Egg White Assay, 2011).

El límite de detección del test es de 0,05 ppm proteína de clara de huevo y el límite de cuantificación de 0,4 ppm de proteína de clara de huevo. El rango de cuantificación: 0,4 a 10 de proteína de clara de huevo.

Extracción de huevo:

1. Se tomó una cantidad representativa de muestra (5 g) y se homogeneizó en un molinillo o procesadora, de la cual se pesó 1 g en frascos estériles y se agregaron 20 mL de la solución de extracción diluida previamente (el kit no detalla la composición de dicha solución).
2. Se agitó y colocó durante 15 minutos a 60°C en baño de agua.
3. Se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm.

Curva de calibración

Se trabajó con cinco puntos de la curva con las siguientes concentraciones de proteína de clara de huevo: 0 ppm; 0,4 ppm; 1 ppm; 4 ppm y 10 ppm.

Procedimiento del test:

1. Se agregaron 100 μ L de cada solución estándar y de cada muestra en los respectivos pocillos y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó llenando los pocillos con solución buffer de lavado que provee el kit (el kit no detalla la composición de dicha solución). Esto se repitió 5 veces.
3. Se agregaron 100 μ L del conjugado en cada pocillo y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). El kit no detalla la composición de dicha solución.
4. Se descartó el líquido de los pocillos y se lavó llenando los pocillos con de solución buffer de lavado que provee el kit. Esto se repitió 5 veces.
5. Se agregaron 100 μ L de la solución de sustrato cromógeno en cada pocillo y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. El kit no detalla la composición del sustrato cromógeno.
6. Se agregaron 100 μ L de la solución stop (ácido sulfúrico 1N).
7. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 450 nm.

Resultados

Se utilizó un software especial provisto por Romer Labs®. La concentración de proteína de clara de huevo en la muestra se determinó usando la curva de calibración de estándar de proteína de clara de huevo de concentración conocida.

3.2.2.5) Desarrollo de los enzimoimmunoensayos competitivos

3.2.2.5.1) Desarrollo del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/cuantificación de soja en productos cárnicos y productos farináceos

3.2.2.5.1.1) Obtención de extractos proteicos a partir de producto de soja

Para la extracción de proteínas de soja se pesaron 30 mg del producto de soja. Se agregaron 2 mL de la solución extractiva de proteínas totales y se agitó con varilla. Se calentaron los tubos en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Aproximadamente transcurridos 2 minutos en el baño se volvió a agitar con varilla enérgicamente. Se trasvasó el contenido de los tubos de extracción a tubos de plástico y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos Eppendorf y se conservaron a – 20°C hasta su análisis.

3.2.2.5.1.1.1) Cuantificación de proteínas de soja en el extracto y cálculo de la recuperación obtenida

Se utilizó el método de Lowry (Lowry O et al, 1951). Se precipitaron las proteínas previamente extraídas como se describió en 3.2.2.5.1.1). Se tomó 0,2 mL del extracto agregándole 2 mL de acetona con agitación constante en vortex, luego se centrifugó a 3500 rpm

durante 25 minutos. La proteína precipitada se resuspendió y lavó dos veces con acetona. Se reconstituyó con 0,5 mL de NaOH 1N con agitación 30 minutos a 37°C, finalmente se disolvió la proteína con 2 mL de agua destilada. Se tomaron 0,2 mL de esta solución para realizar el método de Lowry. Se utilizó seroalbúmina bovina como estándar de proteínas para la curva de calibración (Olivera Carrión M, 1988).

A partir de la concentración teórica se calculó el porcentaje de recuperación de proteína de soja en el extracto.

3.2.2.5.1.2) Extracción de proteínas de productos cárnicos

Para la extracción de proteínas de los productos cárnicos se pesaron 300 mg de los productos cárnicos. Se agregaron 2 mL de la solución extractiva y se realizó la extracción como se describió en 3.2.2.5.1.1).

3.2.2.5.1.3) Extracción de proteínas de productos farináceos

Para la extracción de proteínas de los productos farináceos se pesaron 200 mg de productos farináceos. Se agregaron 2 mL de la solución extractiva y se realizó la extracción como se describió en 3.2.2.5.1.1). La centrifugación se realizó a 11000 rpm durante 15 minutos a 20°C.

3.2.2.5.1.4) Puesta a punto del enzoinmunoensayo competitivo

Se determinó la concentración óptima de antígeno (extracto de soja) a inmovilizar en la placa y la dilución óptima de anticuerpo primario (antisuero policlonal de conejo específico de proteínas de soja) a utilizar en la competencia.

Sensibilización de la placa:

La sensibilización se refiere al pegado del antígeno (extracto de soja) en la placa. Se emplearon placas para microelisa (Maxisorp®, NUNC, Denmark). Para esto se sembraron en la placa 100 µL por pocillo de dos concentraciones diferentes de antígeno 10 µg de proteína de soja/100µL o 1 µg de proteína de soja/100 µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 (Buffer Carbonato de Sodio 0,015 M, Bicarbonato de sodio 0,035 M; pH: 9,6). Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4°C durante 24 hs. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado (0,9 % p/v NaCl y 0,0125 % v/v Tween 20 en agua). Se sembraron 200 µL de solución de bloqueo (1 % p/v gelatina bovina y 0,1 % v/v Tween 20 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 0,1% v/v Tween 20 y 3% polietilenglicol. Se ensayaron diluciones de anticuerpo primario entre 1/156 y 1/10000. En los pocillos correspondientes al Blanco (Blanco 1 y Blanco 10) se sembró solamente el buffer utilizado para la dilución del anticuerpo primario.

Se trabajó con el esquema que se presenta a continuación:

	1 µg / 100 µL		10 µg / 100 µL	
A	1/156	1/156	1/156	1/156
B	1/312,5	1/312,5	1/312,5	1/312,5
C	1/625	1/625	1/625	1/625
D	1/1250	1/1250	1/1250	1/1250
E	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
F	1/5000	1/5000	1/5000	1/5000
G	1/10000	1/10000	1/10000	1/10000
H	Bco 1	Bco 1	Bco 10	Bco 10

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 anticuerpo secundario, Anti IgG conjugado con fosfatasa alcalina de Bio-Rad (el mismo fue obtenido en cabras inmunizadas con IgG purificada de conejo) diluido 1:3000 con buffer TBS con 0,1% v/v Tween 20 y 3% 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 (paranitrofenil fosfato 1mg/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.
Absorbancia corregida= Absorbancia leída- Absorbancia blanco.

Se graficaron las curvas de Absorbancia corregida versus ln 1/dilución del anticuerpo primario utilizando una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010.

3.2.2.5.1.5) Validación de los enzimoimmunoensayos competitivos

Para la validación de los enzimoimmunoensayos desarrollados se determinó la linealidad, los límites de detección y cuantificación, la precisión intradía e interdías y la recuperación de cada inmunoensayo.

3.2.2.5.1.5.1) Validación del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/ cuantificación de soja en productos cárnicos

3.2.2.5.1.5.1.1) Linealidad

Para la determinación de la linealidad del método se utilizaron concentraciones crecientes de un extracto de producto de soja extraído con buffer Tris-HCL 0,0625M con 3% de SDS y 2% de 2-ME. Se trabajó con cinco puntos 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 µg proteína de soja/ mL buffer

Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. Para cada punto de la curva se realizó una dilución del extracto original de soja pero se mantuvo constante la concentración de SDS y de ME. De esta manera los componentes de la solución extractiva fueron diluidos 1:175 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 conteniendo 75 μ L de la dilución del anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo, previamente descrita en 3.2.2.5.1.4) y 75 μ L de cada una de las diluciones de los puntos de la curva previamente preparadas. Además se preparó un control Inespecífico (I) que contenía 200 μ L del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y un control de “unión máxima” (M) que contenía 100 μ L del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y 100 μ L de la dilución del Anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo. Se incubaron los preincubados a 4°C en cámara húmeda y oscuridad durante 24 hs. Paralelamente se sensibilizó una placa de ELISA sembrando en la misma la concentración de antígeno (proteína de soja) previamente seleccionada en la puesta a punto del ensayo descrita en 3.2.2.5.1.4). Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4°C durante 24 hs. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 200 μ L 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 μ L de los preincubados en los pocillos según el siguiente esquema:

	1	2	3
A	0	0,03	M
B	0	0,1	M
C	0	0,1	I
D	0,01	0,1	I
E	0,01	0,3	I
F	0,01	0,3	-
G	0,03	0,3	-
H	0,03	M	-

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 μ L de anticuerpo secundario. 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 μ L de solución de revelado. Se incubó 20 minutos en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación.

Se midió la absorbancia en lector de ELISA a 405 nm. Los valores de absorbancia fueron corregidos con la absorbancia promedio correspondiente al control inespecífico I.

Absorbancia corregida= Absorbancia leída- Absorbancia promedio control inespecífico I.

A continuación se construyó una curva de calibración Absorbancia corregida versus ln concentración de soja (μ g proteína de soja/ mL).

Los test utilizados para el análisis estadístico de los resultados fueron: método de Barlett, para homogeneidad de varianzas y análisis de regresión lineal (Box G et al, 1999).

3.2.2.5.1.5.1.2) Límite de detección y Límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección y de cuantificación del método se utilizó una muestra sin analito (soja), carne vacuna picada. La misma se extrajo por quintuplicado como se describió en 3.2.2.5.1.2). Cada extracto se analizó por duplicado, como se describió en 3.2.2.5.1.5.1.1), realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:175 de cada una de los extractos con buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según el cálculo *¹. Se calculó el valor medio del analito para la muestra de carne vacuna picada 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.

*¹ Cálculo de la concentración de proteína de soja en los productos cárnicos:

Por interpolación en la curva de calibración se obtienen los μg de proteína de soja /mL. Esto corresponde al contenido de soja en el extracto diluido analizado.

La cantidad de proteína de soja en $\mu\text{g}/1000$ mg de producto cárnico se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de proteína de soja en el producto cárnico } -\mu\text{g} = \frac{\text{cantidad de prot. de soja (curva)}-\mu\text{g}_{(1)} \times V-\mu\text{L}_{(2)} \times 1000-\text{mg}_{(3)}}{5,7-\mu\text{L}_{(4)} \times P-\text{mg}_{(5)}}$$

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

(2) Volumen de sobrenadante al realizar la extracción del producto cárnico con solución extractiva de proteínas totales: 1600 μL

(3) 1000 mg; para expresar el contenido en 1000 mg de producto cárnico.

(4) 5,7 μL . Es el volumen de extracto que se toma de los 1600 μL de sobrenadante y se diluyen 1:175. 5,7 μL se llevan a 1000 μL con Buffer Carbonato/ Bicarbonato; pH 9,6.

(5) P: 300 mg; es el peso de producto cárnico que se extrae con solución extractiva de proteínas totales.

De esta manera se calculan los μg de proteína de soja en 1000 mg de producto cárnico: ppm de proteína de soja.

3.2.2.5.1.5.1.3) Precisión intradía e interdías

Para evaluar la precisión intradía del método se analizaron tres muestras cárnicas que contenían igual cantidad de analito (soja). Cada muestra se extrajo por simplificado como se describió en 3.2.2.5.1.2) (n=3). Cada extracto se analizó con el enzimoimmunoensayo por duplicado como se describió en 3.2.2.5.1.5.1.1), realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:175 de cada una de los extractos con buffer

Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según el cálculo *¹.

Para el procesamiento estadístico se promediaron los valores de 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. Se adoptó como criterio de aceptación que el CV de la precisión intradía no superara el 15% (Huber L, 2010).

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 interdías no superara el 15% (Huber L, 2010).

3.2.2.5.1.5.1.4) Recuperación

Para evaluar la recuperación del método se analizaron dos sistemas modelo de carne vacuna con 75 y 20 ppm de proteína de soja. Los mismos se extrajeron por triplicado como se describió en 3.2.2.5.1.2). Se analizaron con el enzimoimmunoensayo por duplicado como se describió en 3.2.2.5.1.5.1.1), realizando las diluciones 1:175 de cada una de las muestras antes de la preparación de los preincubados con buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según el cálculo *¹. Se promediaron los tres valores de 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 proteína de soja obtenida al aplicar el enzimoimmunoensayo para los SM de 75 y 20 ppm de proteína de soja, respectivamente.

Valor teórico: 75 o 20 ppm de proteína de soja, respectivamente.

Luego se promediaron las recuperaciones de los dos sistemas modelo.

Se consideran valores adecuados de recuperación entre 70-130 % (Gatti M y Ferretti C, 2010).

3.2.2.5.1.5.2) Validación del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/ cuantificación de soja en pastas secas

3.2.2.5.1.5.2.1) Linealidad

Se utiliza la misma curva de calibración que la utilizada en productos cárnicos. Ver 3.2.2.5.1.5.1.1).

3.2.2.5.1.5.2.2) Límite de detección y Límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección y de cuantificación del método se utilizó una muestra sin analito (soja), pastas secas. La misma se extrajo por quintuplicado como se describió en 3.2.2.5.1.3). Cada extracto se analizó por duplicado, como se describió en 3.2.2.5.1.5.1.1), realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:175 con buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 de cada uno de los extractos. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo*². Se calculó el valor medio del analito para la muestra de pastas secas 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.

*² Cálculo de la concentración de proteína de soja en pastas secas:

Por interpolación en la curva de calibración se obtienen los μg de proteína de soja / mL. Esto corresponde al contenido de soja en el extracto diluido analizado.

La cantidad de proteína de soja en μg / 1000 mg de pastas secas se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de proteína de soja en pastas secas } -\mu\text{g} = \frac{\text{cantidad de prot. de soja (curva)}-\mu\text{g}_{(1)} \times V-\mu\text{L}_{(2)} \times 1000-\text{mg}_{(3)}}{5,7-\mu\text{L}_{(4)} \times P-\text{mg}_{(5)}}$$

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

(2) Volumen de sobrenadante al realizar la extracción de pastas secas con solución extractiva de proteínas totales: 1600 μL

(3) 1000 mg: para expresar el contenido en 1000 mg de pastas secas.

(4) 5,7 μL . Es el volumen de extracto que se toma de los 1600 μL de sobrenadante y se diluyen 1:175. 5,7 μL se llevan a 1000 μL con Buffer Carbonato/Bicarbonato; pH 9,6.

(5) P: 200 mg; es el peso de pastas secas que se extrae con solución extractiva de proteínas totales.

De esta manera se calculan los μg de proteína de soja en 1000 mg de pastas secas: ppm de proteína de soja.

3.2.2.5.1.5.2.3) Precisión intradía e interdías

Para evaluar la precisión intradía del método se analizaron tres muestras de pastas secas que contenían igual cantidad de analito (soja). Cada muestra se extrajo por simplificado como se describió en 3.2.2.5.1.3) (n=3). Cada extracto se analizó con el enzimoimmunoensayo por duplicado como se describió en 3.2.2.5.1.5.1.1), realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:175 de cada una de los extractos con buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo*².

Para evaluar la precisión interdías se realizó el mismo procedimiento que se describió previamente en intradía pero tres días diferentes(n=9).

El cálculo de la precisión y los criterios de aceptación fueron detallados en el ítem 3.2.2.5.1.5.1.3).

3.2.2.5.1.5.2.4) Recuperación

Para evaluar la recuperación del método se analizaron dos sistemas modelo de mezclas de pastas secas con 300 y 150 ppm de proteína de soja. Los mismos se extrajeron por triplicado como se describió en 3.2.2.5.1.3). Se analizaron por duplicado como se describió en 3.2.2.5.1.5.1.1), realizando las diluciones 1:175 de cada una de las muestras antes de la preparación de los preincubados. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo*². Se calculó el valor del analito de cada extracto. Se promediaron los tres valores de analito para cada sistema modelo.

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

% de recuperación = valor obtenido x 100 / valor teórico

Valor obtenido: concentración de proteína de soja obtenida al aplicar el enzoinmunoensayo para los SM de 300 y 150 ppm de proteína de soja, respectivamente.

Valor teórico: 300 o 150 ppm de proteína de soja, respectivamente.

Luego se promedian las recuperaciones de los dos sistemas modelo.

Se consideran valores adecuados de recuperación entre 70-130 % (Gatti M y Ferretti C, 2010).

3.2.2.5.2) Desarrollo del enzoinmunoensayo competitivo para la detección/ cuantificación de huevo en pastas secas

3.2.2.5.2.1) Obtención de extractos proteicos a partir de huevo entero en polvo

Para la extracción de proteínas del huevo entero en polvo se pesaron 60 mg de huevo entero en polvo. Se realizó la extracción como se describió en 3.2.2.5.1.1).

3.2.2.5.2.1.1) Cuantificación de proteínas de huevo en el extracto y cálculo de la recuperación obtenida

Se realizó por el método de Lowry como se describió en 3.2.2.5.1.1.1).

A partir de la concentración teórica se calculó el porcentaje de recuperación de proteína de huevo en el extracto.

3.2.2.5.2.2) Extracción de proteínas de pastas secas

Para la extracción de proteínas de pastas secas se pesaron 200 mg de pastas secas. Se agregaron 2 mL de la solución extractiva de proteínas totales y se extrajo como se detalla en 3.2.2.5.1.3). La centrifugación se realizó a 11000 rpm durante 15 minutos a 20°C.

3.2.2.5.2.3) Puesta a punto del enzoinmunoensayo competitivo

El objetivo de la puesta a punto del ensayo es la determinación de la concentración óptima de antígeno (extracto de huevo entero) a inmovilizar en la placa y la determinación de la dilución óptima de anticuerpo primario (antisuero policlonal de conejo específico de proteínas de huevo) a utilizar en la competencia.

Sensibilización de la placa:

La sensibilización se refiere al pegado del antígeno (extracto de huevo entero) en la placa. Se sembraron en la placa 100 µL por pocillo de dos concentraciones diferentes de antígeno 10 µg de proteína de huevo/100 µL o 1 µg de proteína de huevo/100 µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. Luego se incubó en oscuridad y en cámara húmeda a 4°C durante 24 hs. 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 las diferentes diluciones del anticuerpo primario (antisuero policlonal de conejo específico de proteínas de huevo) diluido con buffer TBS con 0,1% v/v Tween 20 y 3% polietilenglicol. Se ensayaron diluciones de anticuerpo primario entre 1/25000 y 1/800000. En los pocillos correspondientes al Blanco (Blanco 1 y Blanco 10) se sembró solamente el buffer utilizado para la dilución del anticuerpo primario.

Se trabajó con el esquema que se presenta a continuación:

	1 µg / 100 µL		10 µg / 100 µL	
A	1/25000	1/25000	1/25000	1/25000
B	1/50000	1/50000	1/50000	1/50000
C	1/100000	1/100000	1/100000	1/100000
D	1/200000	1/200000	1/200000	1/200000
E	1/400000	1/400000	1/400000	1/400000
F	1/800000	1/800000	1/800000	1/800000
G	Bco 1	Bco 1	Bco 10	Bco 10
H	Bco 1	Bco 1	Bco 10	Bco 10

Se continuó el protocolo del enzoinmunoensayo como se describió en 3.2.2.5.1.4).

3.2.2.5.2.4) Validación del enzimoimmunoensayo competitivo para la detección/ cuantificación de huevo en pastas secas

3.2.2.5.2.4.1) Linealidad

Para la determinación de la linealidad del método se utilizaron concentraciones crecientes de un extracto de huevo entero extraído con buffer Tris-HCL 0,0625M con 3% de SDS y 2% de 2-ME. Se trabajó con cinco puntos 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de huevo/mL buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. La curva se realizó por triplicado. Para cada punto de la curva se realizó una dilución del extracto original de huevo pero se mantuvo constante la concentración de SDS y de ME. De esta manera los componentes de la solución extractiva fueron diluidos 1:260 en todos los puntos de la curva.

Una vez preparadas las diluciones de la curva se prepararon los preincubados en tubos Eppendorf conteniendo los mismos: 75 μL de la dilución del anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo (previamente descrita en 3.2.2.5.2.3) y 75 μL de cada una de las diluciones de los puntos de la curva previamente preparadas. Además se preparó un control “Inespecífico” (I) que contiene 200 μL del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y un control de “unión máxima” (M) que contiene 100 μL del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y 100 μL del anticuerpo primario de la dilución del Anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo.. Se incubaron los preincubados a 4°C en cámara húmeda y oscuridad durante 24 hs. Paralelamente se sensibilizó una placa de ELISA sembrando en la misma la concentración de antígeno (proteína de huevo) previamente seleccionada en la puesta a punto del ensayo descrita en 3.2.2.5.2.3). Se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4°C durante 24 hs y se continuó el protocolo descrito en 3.2.2.5.1.5.1.1).

A partir de los valores de absorbancia corregidos de los estándares, se construyó una curva de calibración Absorbancia corregida versus ln concentración de huevo (μg proteína de huevo/mL).

Los test utilizados para el análisis estadístico de los resultados fueron: método de Barlett, para homogeneidad de varianzas y análisis de regresión lineal (Box G et al, 1999).

3.2.2.5.2.4.2) Límite de detección y Límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección y de cuantificación del método se utilizó una muestra sin el analito (huevo): pastas secas. La misma se extrajo por quintuplicado como se describió en 3.2.2.5.2.2). Cada extracto se analizó por duplicado, como se describió en 3.2.2.5.2.4.1), realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:260 de cada uno de los extractos. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo *³ Se calculó el valor medio del analito para la muestra de pastas secas 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.

***³ Cálculo de la concentración de proteína de huevo en pastas secas:**

Por interpolación en la curva de calibración se obtienen los μg de proteína de huevo/ 1000 μL . Esto corresponde al contenido de huevo en el extracto diluido analizado.

La cantidad de proteína de huevo en μg / 1000 mg de pastas secas se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de proteína de huevo en pastas secas } -\mu\text{g} = \frac{\text{cantidad de prot. de huevo}(\text{curva})-\mu\text{g}_{(1)} \times V \mu\text{L}_{(2)} \times 1000\text{-mg}_{(3)}}{3,8-\mu\text{L}_{(4)} \times P\text{-mg}_{(5)}}$$

(1) μg de proteína de huevo interpolados en la curva de calibración.

(2) Volumen de sobrenadante al realizar la extracción de pastas secas con solución extractiva de proteínas totales: 1600 μL

(3) 1000 mg; para expresar el contenido en 1000 mg de pastas secas.

(4) 3,8 μL . Es el volumen de extracto que se toma de los 1600 μL de sobrenadante y se diluyen 1:260. 3,8 μL se llevan a 1000 μL con Buffer Carbonato/Bicarbonato; pH: 9,6.

(5) P: 200 mg; es el peso de pastas secas que se extrae con solución extractiva de proteínas totales.

De esta manera se calculan los μg de proteína de huevo en 1000 mg de pastas secas: ppm de proteína de huevo.

3.2.2.5.2.4.3) Precisión intradía e interdías

Para evaluar la precisión intradía del método se analizaron tres muestras de pastas secas que contenían igual cantidad de analito (huevo). Cada muestra se extrajo por simplificado como se describió en 3.2.2.5.2.2) (n=3). Cada extracto se analizó con el enzimoimmunoensayo por duplicado como se describió en 3.2.2.5.2.4.1), realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:260 de cada una de los extractos con buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo *³

Para evaluar la precisión interdías se realizó el mismo procedimiento que se describió previamente en intradía pero tres días diferentes (n=9).

El cálculo de la precisión y los criterios de aceptación fueron detallados en el ítem 3.2.2.5.1.5.1.3).

3.2.2.5.2.4.4) Recuperación

Para evaluar la recuperación del método se analizaron dos sistemas modelo de mezclas de pastas secas con 300 y 150 ppm de proteína de huevo entero. Los mismos se extrajeron por triplicado como se describió en 3.2.2.5.1.3). Se analizaron por duplicado como se describió en 3.2.2.5.2.4.1), realizando las diluciones 1:260 de cada una de las muestras antes de la preparación de los preincubados. La concentración de analito en cada muestra analizada se

determinó según cálculo *³. Se promediaron los tres valores de analito para cada sistema modelo.

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

% de recuperación = valor obtenido x 100 / valor teórico

Valor obtenido: concentración de proteína de huevo obtenida al aplicar el enzimoimmunoensayo para los SM de 300 y 150 ppm de proteína de huevo, respectivamente.

Valor teórico: 300 o 150 ppm de proteína de huevo, respectivamente.

Luego se promediaron las recuperaciones de los dos sistemas modelo.

Se consideran valores adecuados de recuperación entre 70-130 % (Gatti M y Ferretti C, 2010).

3.2.2.6) Protocolo del enzimoimmunoensayo competitivo final

Se realizaron las diluciones de los puntos de la curva y de las muestras a analizar a partir del extracto original (para soja 1:175 y para huevo 1:260).

A continuación se prepararon los preincubados en tubos Eppendorf conteniendo 75 µL de la dilución del anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo, previamente descriptas en 3.2.2.5.1.4) ó 3.2.2.5.2.3) y 75 µL de cada una de las diluciones de los puntos de la curva y de las muestras previamente preparadas. Además se preparó un control “Inespecífico” (I) que contenía 200 µL del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y un control de “unión máxima” (M) que contenía 100 µL del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y 100 µL del anticuerpo primario diluido.

Se incubaron los preincubados a 4°C en cámara húmeda y oscuridad durante 24 hs. Paralelamente se sensibilizó una placa de ELISA sembrando en la misma la concentración de antígeno (proteína de soja o proteína de huevo) previamente seleccionada en la puesta a punto del ensayo descripta en 3.2.2.5.1.4) (soja) y 3.2.2.5.2.3) (huevo). Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4°C durante 24 hs. 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 según el siguiente esquema:

A	0	0,03	Muestra1'
B	0	0,1	Muestra2
C	0	0,1	Muestra2'
D	0,01	0,1	M
E	0,01	0,3	M
F	0,01	0,3	I
G	0,03	0,3	I
H	0,03	Muestra1	I

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 anticuerpo secundario. 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. Se incubó 20 minutos en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación.

Se midió la absorbancia en lector de ELISA a 405 nm. Los valores de absorbancia fueron corregidos con la absorbancia promedio correspondiente al control inespecífico (I).

Absorbancia corregida = Absorbancia leída - Absorbancia promedio control inespecífico.

Se construyó una curva de calibración Absorbancia corregida versus ln concentración de soja o de huevo (µg de proteína de soja o huevo/mL).

Cálculo de la concentración de proteínas de soja o de huevo en productos cárnicos o pastas secas:

Por interpolación en la curva de calibración se obtienen los µg de proteína de soja o huevo/mL. Esto corresponde al contenido de soja o huevo en el extracto diluido analizado.

La cantidad de proteína de soja o huevo en µg/ 1000 mg de productos cárnicos o pastas secas se calcula según la siguiente fórmula:

Cantidad de proteína

de soja o huevo en el producto -µg = $\frac{\text{cantidad de prot. de soja o huevo (curva)} - \mu\text{g}_{(1)} \times V - \mu\text{L}_{(2)} \times 1000 - \text{mg}_{(3)}}{5,7 \text{ ó } 3,8 - \mu\text{L}_{(4)} \times P - \text{mg}_{(5)}}$

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

(2) Volumen de sobrenadante al realizar la extracción de productos cárnicos o pastas secas con solución extractiva de proteínas totales: 1600 µl

(3) 1000 mg: para expresar el contenido en 1000 mg de productos cárnicos o pastas secas.

(4) 5,7 µL (soja) ó 3,8 µL (huevo). Es el volumen de extracto que se toma de los 1600 µL de sobrenadante y se diluyen 1:175 (soja) ó 1:260 (huevo). 5,7 µL ó 3,8 µl se llevan a 1000 µL con Buffer Carbonato/Bicarbonato; pH: 9,6.

(5) P: 300 mg (productos cárnicos) ó 200 mg (pastas secas); es el peso de productos cárnicos o pastas secas que se extrae con solución extractiva de proteínas totales.

De esta manera se calculan los μg de proteína de soja o huevo en 1000 mg de productos cárnicos o pastas secas: ppm de proteína de soja o huevo, que tiene la muestra.

4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1) Detección de proteínas lácteas en productos cárnicos

4.1.1) Leche

4.1.1.1) Sistemas modelo crudos con agregado de leche en polvo descremada

Para el análisis de los sistemas modelo de carne vacuna con leche en polvo descremada se utilizaron dos solventes de extracción, la solución extractiva de proteínas totales y un solvente selectivo para la extracción de caseínas (ISO 55° + 2ME) (López L, 2000; López L et al, 2006). Se evaluaron ambos solventes de extracción con la finalidad de establecer cuál de los dos resultaba más eficiente para la detección de bajas concentraciones de proteínas lácteas en mezcla con proteínas cárnicas utilizando SDS-PAGE e Inmunoblotting.

En la Tabla N° 1 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los sistemas modelo de carne vacuna con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting, utilizando dos solventes de extracción.

SISTEMA MODELO ppm leche en polvo descremada	L0 0 ppm	L1 10 ppm	L2 50 ppm	L3 100 ppm	L4 500 ppm	L5 1000 ppm	L6 2000 ppm	L7 3000 ppm	L8 5000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI

SISTEMA MODELO ppm leche en polvo descremada	L0 0 ppm	L1 10 ppm	L2 50 ppm	L3 100 ppm	L4 500 ppm	L5 1000 ppm	L6 2000 ppm	L7 3000 ppm	L8 5000 ppm
SDS-PAGE ISO 55°+ 2ME	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
Inmunoblotting ISO 55°+ 2ME	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI

Tabla N° 1: Detección de proteínas lácteas en sistemas modelo de carne vacuna con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting, utilizando dos solventes de extracción.

En la Tabla N° 1 se observa que mediante **SDS-PAGE** el solvente ISO 55° + 2ME permite detectar la presencia de proteínas de leche a partir de 2000 ppm, mientras que con solución extractiva de proteínas totales no es posible detectar la presencia de proteínas de leche ni siquiera en la mayor concentración analizada (5000 ppm). A modo de ejemplo en la Figura N°

1 se presentan los densitogramas correspondientes a proteínas totales de los sistemas modelo de carne vacuna con agregado de 3000 y 5000 ppm de leche en polvo descremada y de los controles leche en polvo descremada y carne vacuna.

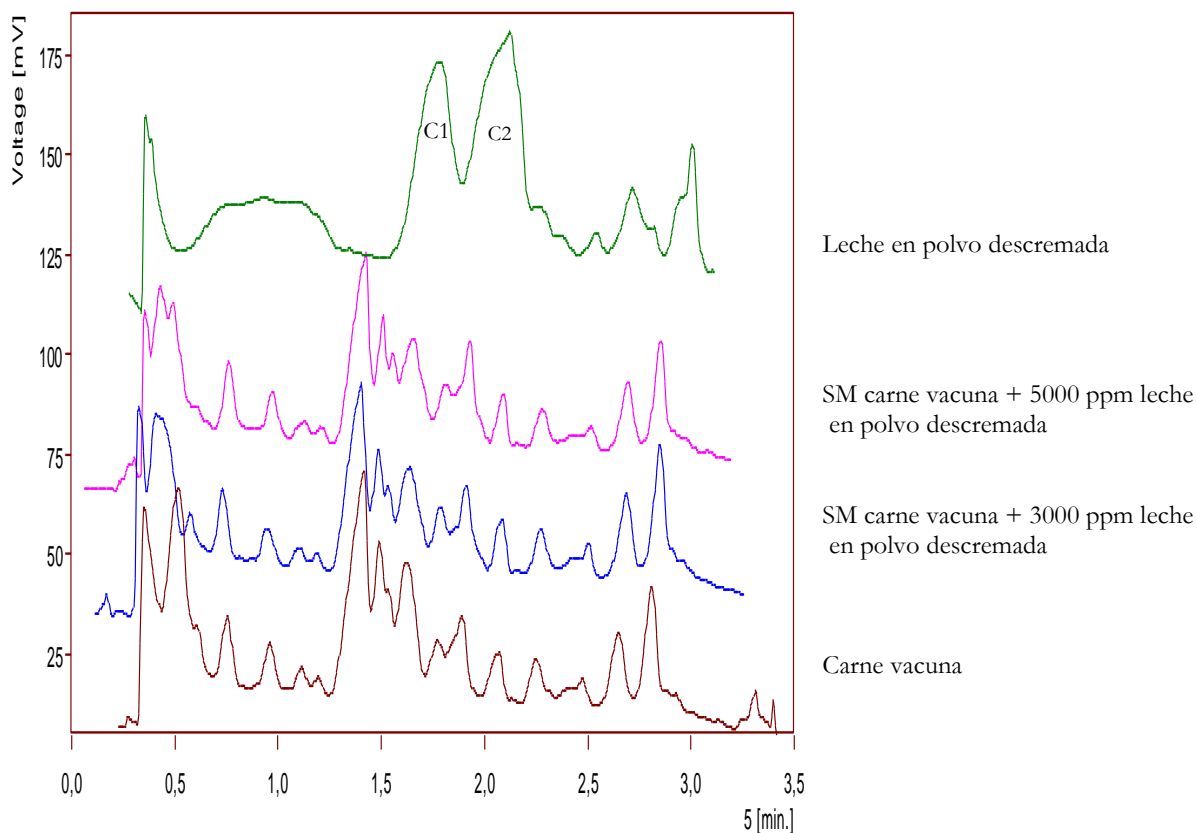


Figura N° 1: Densitogramas correspondientes a proteínas totales de los sistemas modelo de carne vacuna con 3000 y 5000 ppm de leche en polvo descremada y de los controles leche en polvo descremada y carne vacuna, separadas por SDS-PAGE. C1, C2: picos característicos de caseínas. C1: 37000 D, C2: 34000 D.

En la Figura N° 1 se observa que no se presentan diferencias entre el densitograma de carne vacuna y los de los sistemas modelo con 3000 y 5000 ppm de leche en polvo descremada.

En la Figura N° 2 se presentan los densitogramas correspondientes a proteínas solubles en ISO 55° + 2ME de los sistemas modelos de carne vacuna con 2000, 3000 y 5000 ppm de leche en polvo y de los controles leche en polvo descremada y carne vacuna, separadas por SDS-PAGE.

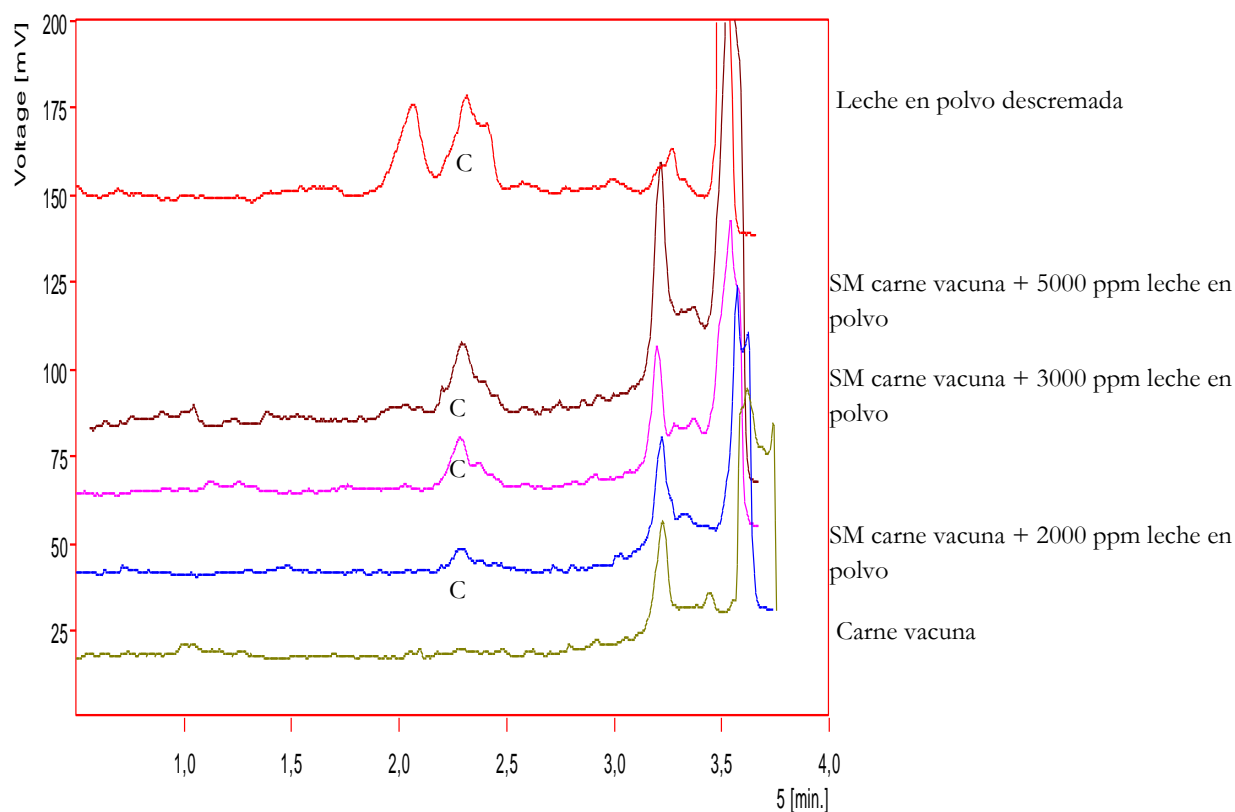


Figura N° 2: Densitogramas correspondientes a proteínas solubles en ISO 55° + 2ME de los sistemas modelo de carne vacuna con 2000, 3000 y 5000 ppm de leche en polvo descremada y de los controles leche en polvo descremada y carne vacuna, separadas por SDS-PAGE. C: picos característicos de caseínas de leche. C: 34000 D.

En la Figura N° 2 se observa en los sistemas modelo de carne vacuna con 2000, 3000 y 5000 ppm de leche en polvo descremada un pico característico de las proteínas caseínas de la leche (C).

Cuando los sistemas modelo se analizan por **Inmunoblotting** se observa que con ambos solventes de extracción se detecta la presencia de leche en polvo descremada a partir de 1000 ppm (Tabla N° 1). Sin embargo resulta más eficiente la extracción de proteínas totales ya que con este solvente se ven claramente dos bandas de caseínas, mientras que con ISO 55° + 2ME se ve una única banda de caseínas de menor intensidad.

A modo de ejemplo en la Foto N° 1 se presenta la imagen del Inmunoblotting de proteínas totales de los sistemas modelo de carne vacuna con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada.

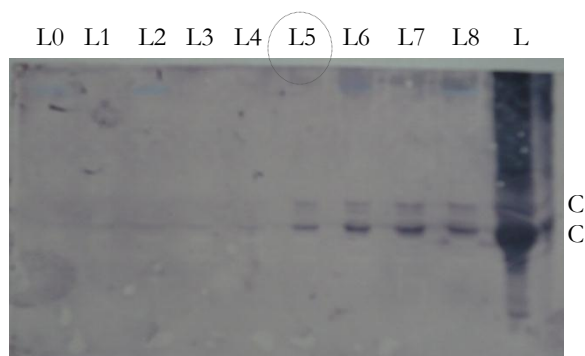


Foto N° 1: Inmunoblotting correspondiente a proteínas totales de los sistemas modelo L0: SM 0 ppm, L1: SM 10 ppm, L2: SM 50 ppm, L3: SM 100 ppm, L4: SM 500 ppm, L5: SM 1000 ppm, L6: SM 2000 ppm, L7: SM 3000 ppm, L8: SM 5000 ppm de leche en polvo descremada. L: leche C: bandas características de caseína. (37000 y 34000 D)

Una de las ventajas del Inmunoblotting es que además de identificar las proteínas de interés por su peso molecular, también permite identificar dichas proteínas por medio de la unión específica del anticuerpo. Por este motivo algunos investigadores lo consideran como un método adecuado para confirmar la presencia de la proteína de interés en alimentos (Díaz Amigo C, 2010c).

En la Tabla N° 2 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de leche en sistemas modelo de carne vacuna con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada, utilizando dos kits comerciales de **ELISA** (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

SISTEMA MODELO ppm leche en polvo descremada (ppm proteína de leche en polvo descremada)	ELISA Veratox-Neogen ppm leche en polvo descremada	ELISA R-Biopharm ppm proteína de leche en polvo descremada
0	<2,5	<2,5
10 (3,4)	2,7±0,8	2,8±0,4
18 (6,1)	4,7±1,3	3,6±0,5
25 (8,5)	5,9±1,8	5,0±1,3
50 (17,0)	11,6±3,6	11,0±1,4
100 (34,0)	24,2±7,3	14,8±2,1
500 (170,0)	>25,0	32,8±0,1
1000 (340,0)	>25,0	>67,5
2000 (680,0)	>25,0	>67,5
3000 (1020,0)	>25,0	>67,5
5000 (1700,0)	>25,0	>67,5

Tabla N° 2: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de leche en sistemas modelo de carne vacuna con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada, utilizando dos kits comerciales de ELISA (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

En la Tabla N° 2 se observa que los kits **Veratox-Neogen** y **R-Biopharm** detectan leche a partir del sistema modelo de 10 ppm de leche en polvo descremada. Con el kit **Veratox-Neogen** los sistemas modelo de 10 a 100 ppm de leche en polvo descremada presentan resultados positivos y cuantificables de leche, aunque muy alejados de los valores reales. Los sistemas modelo de 500 a 5000 ppm de leche en polvo descremada presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (25 ppm de leche en polvo descremada). Con el kit de **R-Biopharm** los sistemas modelo de 10 a 500 presentan resultados positivos y cuantificables de leche, aunque muy alejados de los valores reales. Los sistemas modelo de 1000 a 5000 ppm de leche en polvo descremada presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (67,5 ppm de proteína de leche en polvo descremada).

4.1.1.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de leche en polvo descremada

En la Tabla N° 3 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada extraídos con solución extractiva de proteínas totales, analizados por **SDS-PAGE e Inmunoblotting**. No se utilizó el solvente ISO 55° +2ME para la extracción de proteínas en sistemas modelo cocidos, dado que cuando se analizaron sistemas modelo crudos de leche en polvo descremada en mezcla con carne vacuna, resultó más eficiente la extracción de proteínas totales. Con este solvente se observaban claramente dos bandas de caseínas, mientras que con ISO 55° + 2ME se observaba una única banda de caseínas de menor intensidad.

SISTEMA MODELO ppm leche en polvo descremada	L0 0 ppm	L1 10 ppm	L2 50 ppm	L3 100 ppm	L4 500 ppm	L5 1000 ppm	L6 2000 ppm	L7 3000 ppm	L8 5000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI

Tabla N° 3: Detección de proteínas totales de leche en sistemas modelo de fiambre con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

De acuerdo con estos resultados **SDS-PAGE** no detecta leche en mezcla con fiambre, utilizando solución extractiva de proteínas totales, ni siquiera en la mayor concentración analizada (5000 ppm leche en polvo descremada).

Con **Inmunoblotting** se observan bandas características de leche en los sistemas modelo con 1000, 2000, 3000 y 5000 ppm de leche en polvo descremada. Se observaron dos bandas de caseínas de 37000 D y de 34000 D (resultados no mostrados).

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en los sistemas modelo crudos (ítem 4.1.1.1) **SDS-PAGE** no detecta leche ni siquiera en la mayor concentración analizada (5000 ppm de leche en polvo descremada). En cambio **Inmunoblotting** detecta leche a partir del sistema modelo de 1000 ppm de leche en polvo descremada tanto en sistemas modelo crudos como cocidos.

En la Tabla N° 4 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de leche en sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada, utilizando dos kits comerciales de **ELISA** (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

SISTEMA MODELO ppm leche en polvo descremada (ppm proteína de leche en polvo descremada)	ELISA Veratox-Neogen ppm leche en polvo descremada	ELISA R-Biopharm ppm proteína de leche en polvo descremada
0	<2,5	<2,5
10 (3,4)	<2,5	2,7±0,7
18 (6,1)	<2,5	3,4±0,3
25 (8,5)	<2,5	6,5±1,5
50 (17,0)	<2,5	10,1±1,9
100 (34,0)	5,7±1,4	12,8±1,9
500 (170,0)	15,7±3,1	>67,5
1000 (340,0)	16,5±4,0	>67,5
2000 (680,0)	19,9±1,4	>67,5
3000 (1020,0)	>25,0	>67,5
5000 (1700,0)	>25,0	>67,5

Tabla N° 4: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de leche en sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-5000 ppm de leche en polvo descremada, utilizando dos kits comerciales de ELISA (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

Se observa que la metodología ELISA utilizando el kit **Veratox-Neogen** detecta leche a partir del sistema modelo de 100 ppm de leche en polvo descremada. Los sistemas modelo de 100, 500, 1000 y 2000 de leche en polvo descremada presentan resultados positivos y cuantificables de leche, aunque muy alejados de los valores reales. Los sistemas modelo de 3000 y 5000 ppm presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (25 ppm de leche en polvo descremada). El kit de **R-Biopharm** resultó ser más sensible para la detección de leche en productos cárnicos cocidos ya que detecta proteínas de leche a partir del sistema modelo de 10 ppm de leche en polvo descremada. Los sistemas modelo de 10 a 100 ppm de leche en polvo descremada también presentan resultados positivos y cuantificables de leche, aunque muy alejados de los valores reales. Los sistemas modelo de 500-5000 ppm de leche en polvo descremada presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (67,5 ppm de proteína de leche).

Si se comparan los resultados obtenidos con los de los sistemas modelo crudos (ítem 4.1.1.1), se observa que el kit **Veratox-Neogen** resulta más sensible para la detección de leche en los sistemas modelo crudos (10 ppm de leche en polvo descremada) comparados con los sistemas modelo cocidos (100 ppm de leche en polvo descremada). Además utilizando el kit **Veratox-Neogen** los resultados de los sistemas modelo crudos fueron siempre mayores con respecto a los sistemas modelo cocidos. Estas diferencias no se observaron utilizando el kit de **R-Biopharm**, ya que con este se obtuvieron resultados similares en sistemas modelo con y sin tratamiento térmico.

En la elaboración de los productos cocidos es importante agregar el alérgeno en estudio antes del procesado del alimento (Díaz Amigo C, 2010a). Esto se debe a que, durante el procesado, el alérgeno está expuesto a condiciones físicas o químicas que pueden provocar cambios en su estructura, estabilidad y solubilidad (Díaz Amigo C y Popping B, 2010). En los alimentos procesados puede ocurrir que las proteínas se desnaturalicen, que se modifique la solubilidad de las mismas y que se altere la interacción antígeno–anticuerpo. Durante la elaboración de los alimentos la inmunorreactividad de los mismos puede verse disminuida o aumentada. Los cambios observados en la inmunorreactividad pueden ser: inactivación o destrucción de las estructuras de los epítopes, formación de nuevos epítopes o generación de un mejor acceso a los epítopes dado por la desnaturalización del alérgeno nativo (Besler M et al, 2001; Parker C et al, 2015). Todos estos cambios anteriormente descritos producidos en un alimento procesado, tratado térmicamente, explican los diferentes resultados obtenidos entre los sistemas modelo crudos y cocidos.

De acuerdo con nuestros resultados el tratamiento térmico produciría modificaciones en las proteínas de leche presentes que afectan de manera negativa en el caso de la detección con el kit **Veratox-Neogen**. Contrariamente a lo observado con este kit, la detección y cuantificación realizada con el kit de **R-Biopharm** no se ve afectada por el tratamiento térmico. Se debe tener en cuenta que ambos kits utilizan diferentes solventes de extracción y que pueden contener anticuerpos con diferente especificidad.

En cuanto a los resultados obtenidos con los dos kits comerciales para una misma muestra (por ejemplo sistema modelo de fiambre de cerdo con 100 ppm de leche en polvo descremada), los mismos no se pueden comparar. Según distintos investigadores existen diversas variables que llevan a obtener resultados diferentes entre los distintos kits comerciales. Estas variables son: productos utilizados en la curva estándar que varían entre kits (por ejemplo leche en polvo y proteína de leche purificada), diferentes soluciones de extracción utilizadas que hacen que la eficiencia de extracción sea distinta entre los distintos kits (por ejemplo: buffer fosfato, agregado de mercaptoetanol), unidades informadas (ppm leche en polvo y ppm proteína de leche), especificidad del anticuerpo, habilidad del anticuerpo a unirse a proteínas según el procesamiento que ha sufrido el alimento (Díaz Amigo C, 2010 a).

4.1.2) Suero lácteo

4.1.2.1) Sistemas modelo crudos con agregado de suero lácteo

En la Tabla N° 5 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de suero lácteo analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

SISTEMA MODELO ppm suero lácteo	SL0 0 ppm	SL1 10 ppm	SL2 18 ppm	SL3 25 ppm	SL4 100 ppm	SL5 500 ppm	SL6 1000 ppm	SL7 2000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI

Tabla N° 5: Detección de proteínas de suero lácteo en sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de suero lácteo analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

Se observa que **SDS-PAGE** permite la detección de 2000 ppm de suero lácteo en mezcla con carne vacuna mientras que **Inmunoblotting** resulta más sensible ya que permite la detección de 1000 ppm de suero lácteo en mezcla con carne vacuna.

En la Figura N° 3 se presentan los densitogramas correspondientes a proteínas totales de los sistemas modelo de carne vacuna con agregado de diferentes concentraciones de suero lácteo, separadas por **SDS-PAGE**.

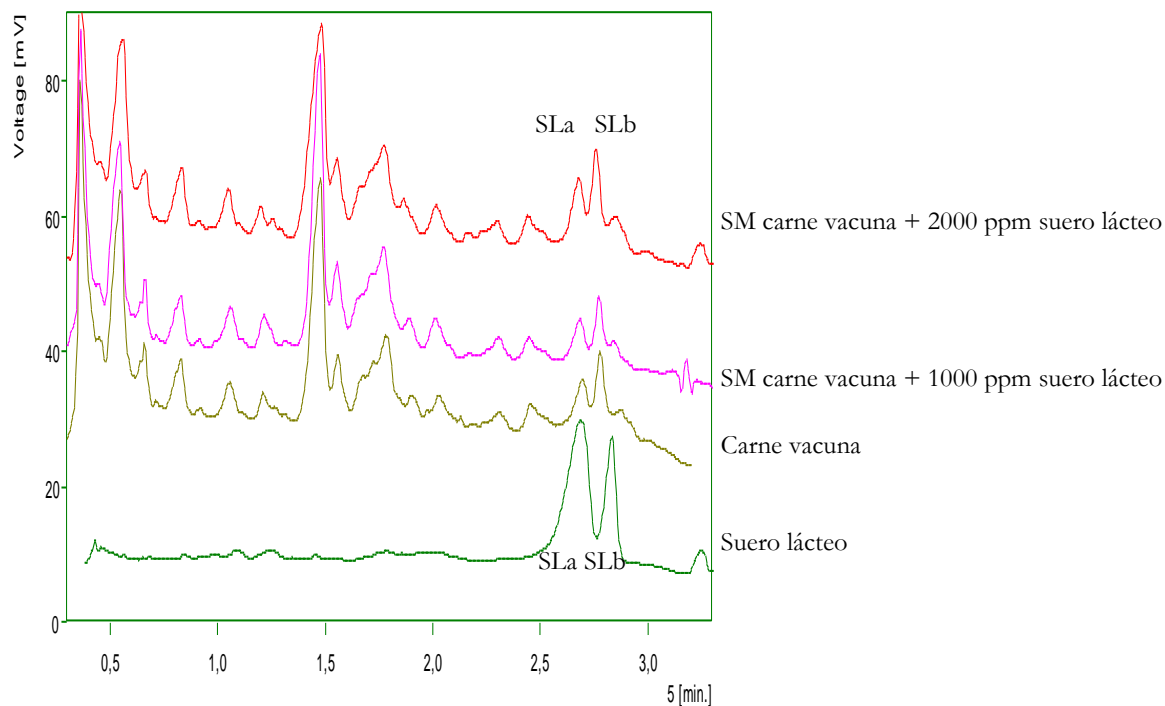


Figura N° 3: Densitogramas correspondientes a proteínas totales de los sistemas modelo de carne vacuna con agregado de diferentes concentraciones de suero lácteo, separadas por SDS-PAGE. SLa y SLb: Picos característicos de suero lácteo. SLa: 18300 D. SLb: 14200 D

Como se observa en la Figura N° 3 los picos característicos comienzan a detectarse a partir del sistema modelo carne vacuna + 2000 ppm de suero lácteo. Los picos que se observan corresponden a SLa 18300 D (β lactoglobulina) y SLb 14200 D (α lactoalbúmina).

Cuando los sistemas modelo se analizan por **Inmunoblotting** se observa que resulta más sensible que **SDS-PAGE** ya que detecta la presencia de suero lácteo a partir de 1000 ppm (Tabla N° 5). Se pudo observar una banda característica de suero lácteo (β lactoglobulina: 18300 D).

En la Tabla N° 6 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de suero lácteo en sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de suero lácteo, utilizando dos kits comerciales de **ELISA** (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

SISTEMA MODELO ppm de suero lácteo	ELISA Veratox-Neogen ppm leche en polvo descremada	ELISA R-Biopharm ppm proteína de leche en polvo descremada
0	<2,5	<2,5
10	5,0±1,4	8,2±2,0
18	9,0±1,3	17,5±3,5
25	9,4±0,6	19,1±2,2
50	12,0±3,6	36,8±0,7
100	17,1±0,8	>67,5
500	22,2±7,6	>67,5
1000	23,8±6,7	>67,5
2000	>25,0	>67,5

Tabla N° 6: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de suero lácteo en sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de suero lácteo, utilizando dos kits comerciales de ELISA (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

En la Tabla N° 6 se observa que los kits **Veratox-Neogen** y **R-Biopharm** detectan proteínas lácteas a partir del sistema modelo de 10 ppm de suero lácteo. Utilizando el kit **Veratox-Neogen** en los sistemas modelo de 10 a 1000 ppm de suero lácteo y utilizando el kit de **R-Biopharm** en los sistemas modelo de 10 a 50 ppm de suero lácteo, presentan resultados positivos y cuantificables de leche. Dado que la materia prima proteica agregada en los sistemas modelo fue suero lácteo, no se puede determinar si la cuantificación de los kits es correcta, ya que los mismos expresan sus resultados como ppm de leche en polvo descremada (Veratox-Neogen) y ppm de proteína de leche en polvo descremada (R-Biopharm). Con el kit **Veratox-Neogen** el sistema modelo de 2000 ppm de suero lácteo presenta un valor que supera el control superior de la curva de calibración (25 ppm de leche en polvo descremada). Con el kit de **R-Biopharm** los sistemas modelo de 100 a 2000 ppm de suero lácteo también presentan un valor que superan el control superior de la curva de calibración (67,5 ppm de proteína de leche en polvo descremada).

4.1.2.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de suero lácteo

En la Tabla N° 7 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-2000 ppm de suero lácteo, analizados por **SDS-PAGE** e **Inmunoblotting**.

SISTEMA MODELO ppm de suero lácteo	SL0 0 ppm	SL1 10 ppm	SL2 18 ppm	SL3 25 ppm	SL4 100 ppm	SL5 500 ppm	SL6 1000 ppm	SL7 2000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI

Tabla N° 7: Detección de proteínas de suero lácteo en sistemas modelo de fiambre con 0-2000 ppm de suero lácteo, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

De acuerdo con estos resultados **SDS-PAGE** detecta suero lácteo en mezcla con fiambre de cerdo a partir del sistema modelo de 2000 ppm de suero lácteo. La banda característica de suero lácteo detectada es la de β lactoglobulina de 18300 D.

Con **Inmunoblotting** se detecta suero lácteo en los sistemas modelo con 1000 y 2000 ppm de suero lácteo. La banda características de suero lácteo detectada es la banda de β lactoglobulina de 18300 D.

Si se comparan estos resultados con los resultados obtenidos en los sistemas modelo crudos (ítem 4.1.2.1) se observa que en ambos **SDS-PAGE** detecta suero lácteo, a partir del sistema modelo de 2000 ppm de suero lácteo e **Inmunoblotting** detecta suero lácteo a partir del sistema modelo de 1000 ppm de suero lácteo.

En la Tabla N° 8 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de suero lácteo en sistemas modelo de fiambre con 0-2000 ppm de suero lácteo, utilizando dos kits comerciales de **ELISA** (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

SISTEMA MODELO ppm de suero lácteo	ELISA Veratox-Neogen ppm leche en polvo descremada	ELISA R-Biopharm ppm proteína de leche en polvo descremada
0	<2,5	<2,5
10	5,7±1,4	11,6±2,8
18	6,3±1,6	20,0±4,0
25	7,5±0,7	21,0±3,6
50	n.d.	n.d.
100	18,3±5,1	>67,5
500	24,0±5,8	>67,5
1000	>25,0	>67,5
2000	>25,0	>67,5

Tabla N° 8: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de suero lácteo en sistemas modelo de fiambre con 0-2000 ppm de suero lácteo, utilizando dos kits comerciales de ELISA (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche). n.d: no se determinó

En la Tabla N° 8 se observa que los kits **Veratox- Neogen** y **R-Biopharm** detectan leche a partir del sistema modelo de 10 ppm de suero lácteo. Con el kit **Veratox-Neogen** los sistemas modelo de 10-500 ppm de suero lácteo y con el kit de **R-Biopharm** los sistemas modelo de 10-25 ppm de suero lácteo, presentan resultados positivos y cuantificables de leche. Dado que la materia prima proteica agregada en los sistemas modelo fue suero lácteo no se puede determinar si la cuantificación de los kits es correcta, ya que los mismos expresan sus resultados como leche en polvo descremada (Veratox-Neogen) y proteína de leche en polvo descremada (R-Biopharm). Con el kit **Veratox-Neogen** los sistemas modelo de 1000 y 2000 ppm de suero lácteo presentan valores que superan el control superior de la curva de calibración (25 ppm de leche en polvo descremada). Con el kit de **R-Biopharm** los sistemas modelo de 100-2000 ppm de suero lácteo también presentan valores que superan el control superior de la curva de calibración (67,5 ppm de proteína de leche en polvo descremada).

Si se comparan los resultados obtenidos con los de los sistemas modelo crudos (ítem 4.1.2.1) se observa que se obtuvieron resultados similares en sistemas modelo con y sin tratamiento térmico. Esto implica que el tratamiento térmico que recibieron las proteínas del suero lácteo no habría modificado ni la solubilidad de las proteínas ni la capacidad de reconocimiento y cuantificación por parte de los anticuerpos de los dos kits ensayados.

4.1.3) Leche y suero lácteo: Muestras provistas por la industria analizadas para la determinación de proteínas lácteas

Se analizaron ocho muestras provistas por industrias. La composición y características de las mismas fueron informadas por el fabricante (ítem 3.1.2.3).

En la Tabla N° 9 se presentan los resultados obtenidos de la determinación de proteínas de leche en productos cárnicos con declaración de ingredientes provista por la industria, utilizando SDS-PAGE, Inmunoblotting y tres kits de ELISA. Estas muestras fueron analizadas con kits de β lactoglobulina y kits de Caseína, todos de R-Biopharm. No fueron analizadas con el kit de Leche Total de R-Biopharm ya que este kit no estaba disponible para la venta cuando se realizaron estos análisis. También se utilizaron kits de leche total de Veratox-Neogen.

Muestras	Denominación	Ingredientes proteicos declarados y almidones	SDS-PAGE	Inmunoblotting	ELISA R-Biopharm β lactoglobulina ppm β lactoglobulina	ELISA R-Biopharm Caseína ppm caseína	ELISA Veratox-Neogen ppm leche en polvo descremada
IJ1	Jamón cocido	Carne de cerdo.	Negativo	Negativo	<0,50	<0,5	n.d.
IJ2	Jamón cocido	Carne de cerdo, plasma < 0,5%.	Negativo	Negativo	<0,50	<0,5	n.d.
IJ4	Jamón cocido natural	Carne de cerdo.	Negativo	Negativo	<0,50	<0,5	< 1,0
IJ5	Jamón cocido natural	Carne de cerdo; posible contenido de proteína de cerdo menor a 1 %.	Negativo	Negativo	<0,50	<0,5	n.d.
IJ6	Jamón cocido natural	Carne de cerdo.	Negativo	Negativo	<0,50	2,5 \pm 0,6	<2,5
IF1	Fiambre pata de cerdo	Carne de cerdo; almidón de trigo 5,3 %; almidón de mandioca 3,2 %; proteína de soja y plasma.	Negativo	Negativo	1,46 \pm 0,06	>13,5	10,6 \pm 2,9
IF2	Fiambre de paleta de cerdo	Carne de cerdo; almidón de trigo 6,9 %; almidón de mandioca 2,1 %; proteína de soja y plasma.	Negativo	Negativo	>13,50	>13,5	10,4 \pm 2,9
IJ3	Jamón cocido natural	Carne de cerdo; 0,5 % proteína aislada de soja y 0,5 % proteína concentrada de suero lácteo (WPC 80) .	Positivo Caseínas β lactoglobulina	Positivo Caseínas β lactoglobulina	>13,50	>13,5	n.d.

Tabla N° 9: Resultados obtenidos de la determinación de proteínas de leche en productos cárnicos con declaración de ingredientes provista por la industria, utilizando SDS-PAGE, Inmunoblotting y tres kits de ELISA (R-Biopharm β lactoglobulina, R-Biopharm Caseína y Veratox-Neogen para leche). n.d.: No se determinó.

En las muestras IJ1, IJ2, IJ4, IJ5 e IJ6 utilizando SDS-PAGE e Inmunoblotting no se detectaron proteínas lácteas. Estas muestras no declaraban materias primas lácteas en su composición. Los métodos de ELISA no detectaron proteínas lácteas en las muestras IJ1, IJ2, IJ4 e IJ5. Estos resultados indicarían que estas cuatro muestras no contienen ingredientes o aditivos lácteos y no sufrieron contacto cruzado. En la muestra IJ6 sólo se detectaron caseínas aunque en muy baja concentración (2,5 ppm) a pesar de que supuestamente no presentaba contacto cruzado de acuerdo con lo declarado por la industria. La baja concentración de caseínas hallada indicaría un muy bajo contacto cruzado.

En las muestras IF1 e IF2 no se detectaron proteínas lácteas utilizando SDS-PAGE e Inmunoblotting. En estas muestras se detectaron proteínas β lactoglobulina, caseínas y de leche total con los tres kits comerciales de ELISA, aunque la concentración hallada de β lactoglobulina fue muy baja (1,46 ppm) en la muestra IF1. Debido a que estas muestras fueron provistas por un frigorífico se consultó sobre la posibilidad de que las mismas tuvieran en su formulación algún ingrediente o aditivo que contuviera proteínas lácteas. La respuesta fue positiva ya que ambas muestras eran elaboradas con un aditivo sabor jamón que declaraba la presencia de alérgenos de leche y productos lácteos derivados en su declaración de alérgenos.

En la muestra IJ3 se detectaron proteínas β lactoglobulina y caseínas con SDS-PAGE e Inmunoblotting. Estos resultados coinciden con los hallados con los kits de ELISA. La muestra IJ3 contenía, de acuerdo con lo manifestado por la industria, proteína concentrada de suero lácteo. Sin embargo la presencia de caseínas detectada por los distintos métodos empleados permite determinar que la muestra contiene suero lácteo y caseínas o caseinatos, o bien leche. No contiene únicamente suero lácteo.

Cabe destacar que si bien se obtuvieron resultados positivos utilizando los kits de ELISA en algunas muestras, esto no implica la presencia del alérgeno como ingrediente o aditivo, sino que dicho resultado positivo puede ser debido a un posible contacto cruzado en el alimento.

Una de las principales ventajas del método de ELISA, destacada por varios investigadores, es la elevada sensibilidad del método que permite la detección de trazas de alérgenos presentes en un alimento dada por contacto cruzado (Gatti M y Ferretti C, 2010).

4.1.4) Leche y suero lácteo: Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas lácteas

Se analizaron siete muestras adquiridas en supermercados de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. La composición de las mismas correspondía al listado de ingredientes presente en cada uno de los rótulos (ítem 3.1.2.4).

En la Tabla N° 10 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de leche de productos cárnicos con declaración de ingredientes en el rótulo de los mismos, utilizando SDS-PAGE, Inmunoblotting y dos kits de ELISA (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

Muestras	Denominación	Ingredientes proteicos declarados y almidones	SDS-PAGE	Inmunoblotting	ELISA Veratox-Neogen ppm leche en polvo descremada	ELISA R-Biopharm ppm proteína de leche en polvo descremada
CF1	Fiambre de cerdo	Carne de cerdo	Negativo	Negativo	< 2,5	<2,5
CJ1	Jamón cocido feteado seleccionado	Pernil de cerdo	Negativo	Negativo	< 2,5	<2,5
CE2	Mortadela	Carne vacuna y carne de cerdo, almidón, aislado de soja	Negativo	Negativo	< 2,5	<2,5
CM1	Medallón de carne vacuna con soja congelado	Carne vacuna, proteínas de soja	Negativo	Negativo	< 2,5	<2,5
CF3	Fiambre de cerdo	Carne de cerdo y leche en polvo descremada	Positivo Cascina	Positivo Cascina	>25,0	>67,5
CF4	Fiambre de cerdo	Carne de cerdo y suero lácteo	Positivo β lactoglobulina	Positivo β lactoglobulina	>25,0	>67,5
CE5	Chorizo	Carne vacuna, carne de cerdo	Positivo β lactoglobulina	Positivo β lactoglobulina	15,8+4,0	>67,5

Tabla N° 10: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de leche de productos cárnicos con declaración de ingredientes en el rótulo de los mismos, utilizando SDS-PAGE, Inmunoblotting y dos kits de ELISA (Veratox-Neogen y R-Biopharm para leche).

Las muestras CF1, CJ1, CE2 y CM1 no declaran productos lácteos y no se detectó leche con ninguno de los métodos utilizados. CF3 declara leche en polvo descremada y CF4 declara suero lácteo y todos los métodos utilizados detectaron proteínas lácteas.

En el caso de la muestra CE5 todos los métodos utilizados detectaron proteínas lácteas. Sin embargo esta muestra no declaraba esta materia prima proteica en su rótulo. Esta muestra fue previamente analizada con los kits de ELISA de R-Biopharm para β lactoglobulina y para caseína. Los resultados fueron positivo para β lactoglobulina y negativo para caseína (resultados no mostrados). Observando los resultados del SDS-PAGE, del Inmunoblotting y de los kits de ELISA se concluye que esta muestra contiene suero lácteo y no leche. Considerando que la muestra CE5 contiene suero lácteo en su composición el valor hallado con el kit Veratox-Neogen (15,8 ppm leche en polvo descremada) resulta inferior a lo esperado. Esto se debe a que SDS-PAGE e Inmunoblotting presentan resultados positivos y sus límites de detección son 2000 ppm de suero lácteo para SDS-PAGE y 1000 ppm de suero lácteo para Inmunoblotting. El resultado obtenido con el kit Veratox-Neogen debería haber superado el valor más alto de la curva de calibración (25 ppm leche en polvo descremada).

Con respecto al kit de R-Biopharm (muestra CF3, CE5, CF4) no se puede concluir si el kit cuantifica bien, ya que los resultados obtenidos en dichas muestras fueron valores que superaron el control superior de la curva de calibración, lo que sí se puede afirmar es que los resultados hallados se corresponden con los resultados positivos obtenidos por SDS-PAGE y por Inmunoblotting.

De acuerdo con los resultados obtenidos una muestra (CE5) contiene suero lácteo no declarado en la lista de ingredientes.

4.2) Detección de proteínas de soja en productos cárnicos

4.2.1) Sistemas modelo crudos con agregado de producto de soja

En la Tabla N° 11 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los sistemas modelo de carne vacuna con 0-5000 ppm de producto de soja, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

SISTEMA MODELO ppm producto de soja	S0 0 ppm	S1 10 ppm	S2 50 ppm	S3 100 ppm	S4 500 ppm	S5 1000 ppm	S6 2000 ppm	S7 3000 ppm	S8 5000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI

Tabla N° 11: Detección de proteínas de soja en sistemas modelo de carne vacuna con 0-5000 ppm de producto de soja, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

En la Tabla N° 11 se observa que **SDS-PAGE** permite la detección de 3000 ppm de producto de soja en mezcla con carne vacuna mientras que **Inmunoblotting** resulta mucho más sensible ya que permite la detección de 100 ppm de producto de soja en mezcla con carne vacuna.

A modo de ejemplo en la Figura N° 4 se presentan los densitogramas correspondientes a proteínas totales de los sistemas modelo (SM) de carne vacuna con agregado de diferentes concentraciones de producto de soja, separadas por **SDS-PAGE**.

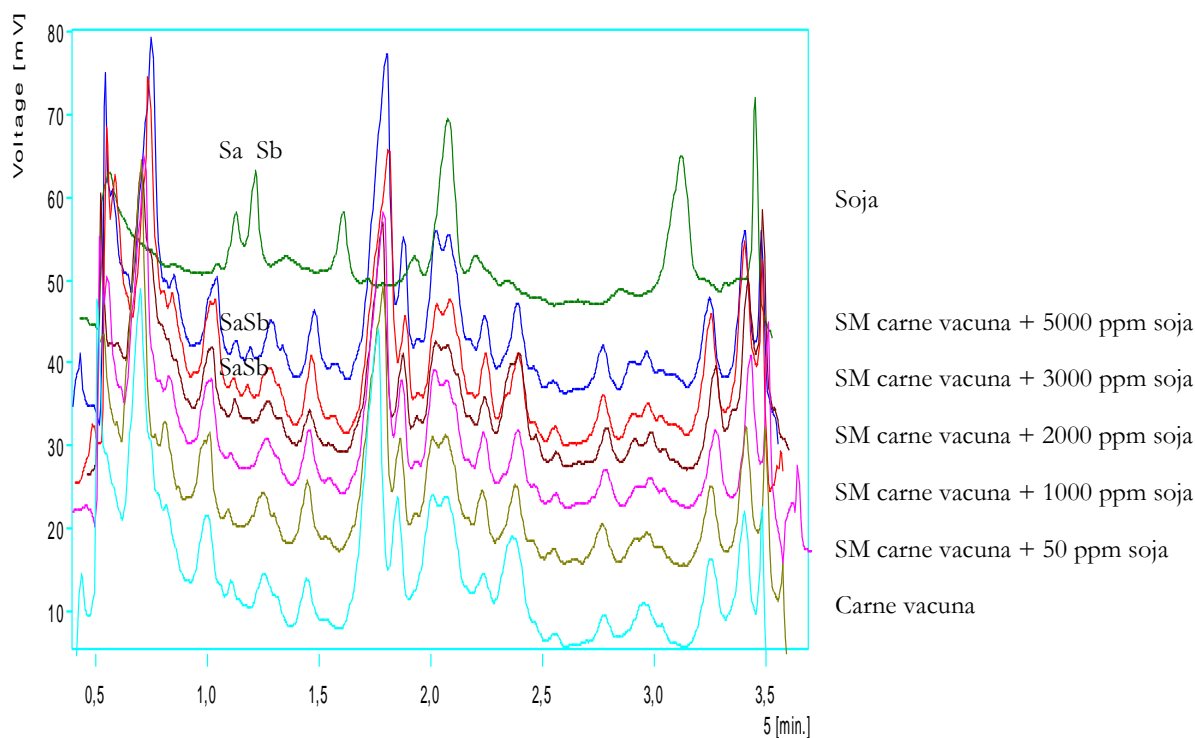


Figura N° 4: Densitogramas correspondientes a proteínas totales de los Sistemas modelo (SM) de carne vacuna con agregado de diferentes concentraciones de producto de soja, separadas por SDS-PAGE. Sa y Sb: picos característicos de proteínas de soja.

Como se observa en la Figura N° 4 los picos característicos de soja (Sa y Sb) comienzan a detectarse a partir del sistema modelo carne vacuna + 3000 ppm de producto de soja. Los picos que se observan corresponden a las proteínas Sa 68500 D y Sb 67000 D.

En la Foto N° 2 se presenta la imagen correspondiente a un **Inmunoblotting** de los sistemas modelo de carne vacuna con agregado de diferentes concentraciones de producto de soja.

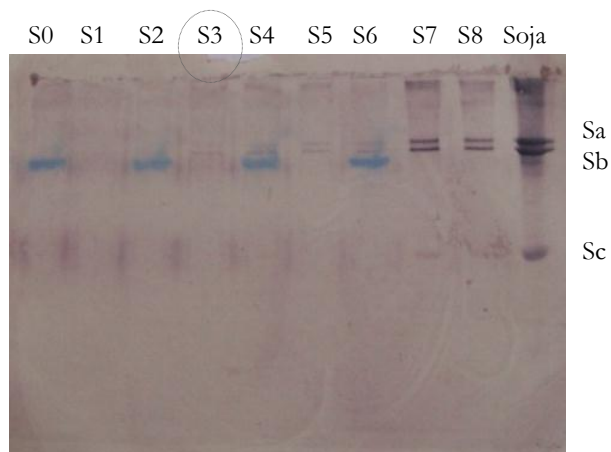


Foto N° 2: Inmunoblotting correspondiente a sistemas modelo. S0: SM 0 ppm ; S1: SM 10 ppm ; S2: SM 50 ppm ; **S3: SM 100 ppm**; S4: SM 500 ppm; S5: SM 1000 ppm; S6: SM 2000 ppm; S7: SM 3000 ppm; S8: SM 5000 ppm de producto de soja; Soja. Sa, Sb, Sc: bandas características de soja.

En la Foto N° 2 se observa que por Inmunoblotting se detectan bandas características de soja (Sa, Sb y Sc) a partir del sistema modelo S3 de carne vacuna con agregado de 100 ppm de producto de soja. Las bandas características de soja detectadas son Sa 68500, Sb 67000 y Sc 52000 D.

Se observa que el Inmunoblotting es un método más sensible que el SDS-PAGE, para la detección de soja en mezcla con carne vacuna.

En la Tabla N° 12 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en Sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de producto de soja, utilizando tres kits comerciales de **ELISA** (Veratox-Neogen, Romer, R-Biopharm para soja).

SISTEMA MODELO ppm producto de soja (ppm proteína de soja)	ELISA Veratox-Neogen ppm aislado proteico de soja	ELISA Romer ppb Inhibidor Tripsina de soja (STI)	ELISA R-Biopharm ppm proteína de soja
0	<10,0	<40,0	<2,5
5 (3,15)	<10,0	<40,0	3,6±1,2
10 (6,30)	<10,0	<40,0	6,8±2,1
50 (31,50)	<10,0	<40,0	>20,0
100 (63,00)	<10,0	64,3±3,2	>20,0
250 (157,50)	21,6±1,8	135,4±27,0	>20,0
500 (315,00)	86,9±3,7	312,1±1,1	>20,0
1000 (630,00)	>100,0	389,7±6,9	>20,0
2000 (1260,00)	>100,0	806,7±48,0	>20,0

Tabla N° 12: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en Sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de producto de soja, utilizando tres kits comerciales de ELISA (Veratox-Neogen, Romer, R-Biopharm para soja).

Se observa que la metodología ELISA utilizando el kit **Veratox-Neogen** detecta soja a partir del sistema modelo de 250 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo de 250 y 500 presentan resultados positivos y cuantificables de soja, aunque muy alejados de los valores reales. Los sistemas modelo de 1000 y 2000 ppm presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (100 ppm de aislado de soja).

Con el kit **Romer** se detectan proteínas de soja a partir del sistema modelo de 100 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo de 100 a 2000 ppm de producto de soja presentan resultados positivos y cuantificables de soja, pero dado que la materia prima proteica agregada en los sistemas modelo fue producto de soja, no se puede determinar si la cuantificación del kit es correcta, ya que el mismo expresa su resultado como ppb de STI.

El kit de **R-Biopharm** resultó ser el más sensible para la detección de soja en estos productos cárnicos, ya que detecta proteínas de soja a partir del sistema modelo de 5 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo de 5 y 10 ppm de producto de soja presentan resultados positivos y cuantificables de soja, cercanos a los valores reales. Los sistemas modelo con 50-2000 ppm de producto de soja presentan valores que superan el control superior de la curva de calibración (20 ppm de proteína de soja).

4.2.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de producto de soja

En la Tabla N° 13 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los Sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-2000 ppm de producto de soja, analizados por **SDS-PAGE** e **Inmunoblotting**.

SISTEMA MODELO ppm producto de soja	S0 0 ppm	S1 10 ppm	S2 50 ppm	S3 100 ppm	S4 250 ppm	S5 500 ppm	S6 1000 ppm	S7 2000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI

Tabla N° 13: Detección de proteínas de soja en Sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-2000 ppm de producto de soja, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

De acuerdo con estos resultados **SDS-PAGE** no permite la detección de producto de soja en mezcla con fiambre de cerdo ni siquiera en la mayor concentración analizada.

Con **Inmunoblotting** se detectaron bandas características de soja a partir del sistema modelo de carne vacuna con agregado de 100 ppm de producto de soja (Tabla N° 13). Las bandas características de soja detectadas son tres y sus pesos moleculares aparentes son: 68500 D, 67000 D y 52000 D (las mismas que se observan en sistemas modelo crudos).

Si se comparan estos resultados con los resultados obtenidos en los sistemas modelo crudos (ítem 4.2.1) **SDS-PAGE** no detecta soja en los sistemas modelo con 2000 ppm de producto de soja, tanto en sistemas modelo crudos como cocidos. **Inmunoblotting** resulta mucho más sensible ya que detecta soja a partir del sistema modelo de 100 ppm de producto de soja en sistemas modelo crudos y cocidos.

En la Tabla N° 14 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-2000 ppm de producto de soja, utilizando tres kits de **ELISA** (Veratox-Neogen, Romer y R-Biopharm para soja).

SISTEMA MODELO ppm producto de soja (ppm proteína de soja)	ELISA Veratox-Neogen ppm aislado proteico de soja	ELISA Romer ppb Inhibidor Tripsina de soja (STI)	ELISA R-Biopharm ppm proteína de soja
0	<10,0	<40,0	<2,5
5 (3,15)	<10,0	<40,0	<2,5
10 (6,30)	<10,0	<40,0	3,6±1,1
50 (31,50)	<10,0	43,2±6,6	>20,0
100 (63,00)	<10,0	90,8±21,7	>20,0
250 (157,50)	13,4±2,6	207,4±20,5	>20,0
500 (315,00)	53,1±17,0	346,2±64,5	>20,0
1000 (630,00)	69,5±12,4	642,7±77,1	>20,0
2000 (1260,00)	>100,0	970,0±97,0	>20,0

Tabla Nº 14: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-2000 ppm de producto de soja, utilizando tres kits de ELISA (Veratox-Neogen, Romer y R-Biopharm para soja).

Se observa que el kit **Veratox-Neogen** detecta soja a partir del sistema modelo de 250 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo de 250, 500 y 1000 presentan resultados positivos y cuantificables de soja, aunque muy alejados de los valores reales. El sistema modelo de 2000 ppm presenta un valor que supera el control superior de la curva de calibración (100 ppm de aislado de soja).

El kit de **Romer** detecta soja a partir del sistema modelo de 50 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo de 50 a 2000 ppm de producto de soja presentan resultados positivos y cuantificables de ppb de STI.

El kit **R-Biopharm** resultó ser el más sensible para la detección de soja en productos cárnicos cocidos ya que detecta soja a partir del sistema modelo de 10 ppm de producto de soja.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en los sistemas modelo crudos (ítem 4.2.1) se observan diferencias en las cantidades de proteínas de soja cuantificadas. Con los kit **Veratox-Neogen** y **R-Biopharm** en los sistemas modelo crudos las cantidades de soja cuantificadas resultan mayores que en los sistemas modelo cocidos. Con el kit de **Romer** en los

sistemas modelo crudos las cantidades de soja cuantificadas resultan menores que en los sistemas modelo cocidos.

Como se detalló en el ítem 4.1.1.2) en los alimentos procesados puede ocurrir que las proteínas se desnaturalicen, que se modifique la solubilidad de las mismas y que se altere la interacción antígeno–anticuerpo (Besler M et al, 2001; Parker C et al, 2015). Todos estos cambios anteriormente descritos producidos en un alimento procesado, tratado térmicamente, explican los diferentes resultados obtenidos entre los sistemas modelo crudos y cocidos. De acuerdo con nuestros resultados el tratamiento térmico produciría modificaciones en las proteínas de soja presentes que afectan de manera positiva en el caso de la detección con el kit de Romer (cantidades cuantificadas de soja mayores en los sistemas modelo cocidos) y de manera negativa en la detección con los kits Veratox-Neogen y R-Biopharm (cantidades cuantificadas de soja menores en los sistemas modelo cocidos).

En cuanto a los resultados obtenidos con los tres kits comerciales para una misma muestra (por ejemplo sistema modelo de fiambre de cerdo con 250 ppm de producto de soja), dado que se expresan con diferentes unidades (ppm aislado proteico de soja o ppb STI o ppm proteína de soja), los mismos no se pueden comparar. Sería importante por parte de los fabricantes de los kits comerciales que unificaran las unidades de expresión para garantizar una correcta evaluación del porcentaje de recuperación y para facilitar la validación y comparación de los mismos (Diaz Amigo C, 2010 b).

4.2.3) Muestras provistas por la industria analizadas para la determinación de proteínas de soja

Se analizaron siete muestras provistas por industrias. La composición y características de las mismas fueron informadas por el fabricante (ítem 3.1.2.3.).

En la Tabla N° 15 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos comerciales, con declaración de ingredientes provista por la industria, utilizando SDS-PAGE, Inmunoblotting y ELISA.

Estas muestras fueron analizadas con el kit ELISA Alert-Neogen (cualitativo) para verificar la utilidad de esta metodología.

Muestras	Denominación	Ingredientes proteicos declarados y almidones	SDS-PAGE	Inmunoblotting	ELISA Alert-Neogen ppm harina de soja
IJ1	Jamón cocido	Carne de cerdo.	Negativo	Negativo	< 5
IJ2	Jamón cocido	Carne de cerdo, plasma < 0,5%.	Negativo	Negativo	< 5
IF1	Fiambre pata de cerdo	Carne de cerdo; almidón de trigo 5,3 %; almidón de mandioca 3,2 %; proteína de soja y plasma.	Positivo	Positivo	Positivo (entre 5 y 10)
IF2	Fiambre de paleta de cerdo	Carne de cerdo; almidón de trigo 6,9 %; almidón de mandioca 2,1 %; proteína de soja y plasma.	Positivo	Positivo	Positivo (> 10)
IJ4	Jamón cocido natural	Carne de cerdo.	Negativo	Negativo	< 5
IJ5	Jamón cocido natural	Carne de cerdo.	Negativo	Negativo	< 5
IJ6	Jamón cocido natural	Carne de cerdo.	Negativo	Negativo	< 5

Tabla N°15: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos comerciales con declaración de ingredientes provista por la industria, utilizando SDS-PAGE, Inmunoblotting y ELISA.

En la Tabla N° 15 se observa que en las dos muestras que declaraban soja en su composición (IF1e IF2) **SDS-PAGE e Inmunoblotting** permitieron la detección de esta materia prima. Con el kit **Alert-Neogen** ambas muestras resultaron positivas (entre 5 – 10 ppm harina de soja IF1 y mayor que 10 ppm harina de soja IF2). Estos resultados confirmaron los obtenidos por SDS-PAGE e Inmunoblotting. Sin embargo el resultado obtenido en la muestra IF1 resulta bajo si consideramos que la proteína de soja fue detectada por SDS-PAGE, esta muestra debería haber dado mayor a 10 ppm.

En el resto de las muestras analizadas (IJ1, IJ2, IJ4, IJ5 e IJ6) no se detectaron proteínas de soja con ninguna de las metodologías utilizadas. En dichas muestras se informó que no se podía descartar contacto cruzado. Esto indicaría que no hubo contacto cruzado.

4.2.4) Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas de soja

Se analizaron siete muestras adquiridas en supermercados de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. La composición de las mismas correspondía al listado de ingredientes presente en cada uno de los rótulos (ítem 3.1.2.4.).

En la Tabla N° 16 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja de productos cárnicos con declaración de ingredientes en el rótulo de los mismos, utilizando SDS-PAGE, Inmunoblotting y dos kits de ELISA (Veratox-Neogen y Romer para soja).

Muestras	Denominación	Ingredientes proteicos declarados y almidones	SDS-PAGE	Inmunoblotting	ELISA Veratox-Neogen ppm aislado proteico de soja	ELISA Romer ppb Inhibidor de tripsina de soja
CF1	Friambre de cerdo	Carne de cerdo	Negativo	Positivo	22,3±4,8	581,0±26,7
CF2	Friambre de cerdo	Carne de cerdo y aislado de soja	Positivo	Positivo	>100,0	970,0±18,2
CJ1	Jamón Cocido feteado seleccionado	Pernil de cerdo	Negativo	Negativo	<10,0	<40,0
CE1	Mortadela	Carne vacuna, carne de cerdo, almidón	Negativo	Positivo	<10,0	448,0±17,0
CE2	Mortadela	Carne vacuna, carne de cerdo, almidón, aislado de soja	Negativo	Negativo	<10,0	<40,0
CE3	Salchicha cocida de pollo	Carne de pollo, almidón.	Positivo	Positivo	67,8±2,04	>1000,0
CE4	Sopressata	Carne vacuna, gluten de trigo	Negativo	Positivo	67,0±1,3	>1000,0

Tabla N° 16: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja de productos cárnicos con declaración de ingredientes en el rótulo de los mismos, utilizando SDS-PAGE, Inmunoblotting y dos kits de ELISA (Veratox-Neogen y Romer para soja).

Se observa que utilizando SDS-PAGE se detectó soja en las muestras CF2 y CE3. La muestra CF2 declaraba soja en su lista de ingredientes y la muestra CE3 no declaraba dicha materia prima en su lista de ingredientes.

De las muestras que no declaraban soja Inmunoblotting la detectó en cuatro de las muestras analizadas (CF1, CE1, CE3, CE4).

Además se observa que con los kits de ELISA el alérgeno soja fue detectado en tres de las muestras analizadas que no declaraban este ingrediente (CF1, CE3, CE4). Estos resultados confirmaron los resultados obtenidos por Inmunoblotting.

Los resultados de la muestra CE1 fueron positivos para Inmunoblotting y con el kit de Romer y negativos con el kit Veratox-Neogen. Esto se debería a la menor sensibilidad que presenta el kit Veratox-Neogen.

La muestra CJ1 no declaraba ingredientes de soja y no se detectaron proteínas de soja con ninguna de las metodologías utilizadas.

En la muestra CF1 se detectaron proteínas de soja utilizando Inmunoblotting y los kits de ELISA para soja de Veratox-Neogen y de Romer detectaron 22,3 ppm de aislado de soja y 581,0 ppb de STI, respectivamente. Debido a estos resultados se consultó al fabricante sobre la posibilidad de que esta muestra tuviera en su formulación algún ingrediente o aditivo que contuviera proteínas de soja. La respuesta fue positiva ya que la muestra era elaborada con un aditivo sabor jamón, que declaraba la presencia de alérgenos de soja en su declaración de alérgenos.

En la muestra CE2, que declaraba aislado de soja en su lista de ingredientes, no se detectaron estas proteínas con ninguna de las metodologías utilizadas. Con este resultado se confirma que no se utilizó una materia prima con soja en la elaboración de este producto. Es posible que algunas muestras presenten en su lista de ingredientes materias primas que no se encuentran en su composición. Esto podría deberse a cambios en la formulación que no se ven reflejados en los rótulos ya que los mismos quedan desactualizados.

Los valores bajos de soja obtenidos con el kit Veratox-Neogen en las muestras CF1, CE3 y CE4 corroboraron los resultados obtenidos en los sistemas modelo cocidos. Si bien este método permitió la detección de soja en cuatro muestras comerciales, los valores obtenidos difieren de los valores reales presentes en dichas muestras. Esto se concluye ya que utilizando SDS-PAGE no se detecta soja ni siquiera en el sistema modelo cocido que contiene la mayor concentración analizada previamente (2000 ppm de producto de soja) y que el límite de detección del Inmunoblotting es 100 ppm. A modo de ejemplo utilizando el kit Veratox-Neogen si la muestra CF1 tuviera realmente 22,3 ppm de aislado de soja, el Inmunoblotting no hubiera dado positivo. Si la muestra CE3 tuviera 67,8 ppm de aislado de soja no hubieran dado positivos SDS-PAGE e Inmunoblotting. Si la muestra CE4 tuviera realmente 67,0 ppm de aislado de soja, el Inmunoblotting no hubiera dado positivo. Estos resultados permiten

confirmar que el kit Veratox-Neogen presenta concentraciones de aislado de soja alejadas de los valores reales.

Con respecto a los resultados hallados con el kit de Romer parecen lógicos cuando se analizan en comparación con los resultados de los sistemas modelo de productos cocidos. Los resultados obtenidos en CF1 y CE1 (581,0 y 448,0 ppb STI, respectivamente) se corresponden con los hallados en sistemas modelo cocidos que contienen entre 500-1000 ppm de producto de soja. Por ende es lógico que el inmunoblotting presente un resultado positivo (su límite de detección es 100 ppm de producto de soja) y que el SDS-PAGE presente un resultado negativo (su límite de detección es mayor a 2000 ppm de producto de soja). El único resultado que llama la atención es el de CF2 ya que el resultado obtenido 970,0 ppb STI se corresponde con el obtenido en el sistema modelo de 2000 ppm de producto de soja, sin embargo SDS-PAGE presentó un resultado positivo y además la muestra contiene aislado de soja en su composición. Se esperaría que dicha muestra presente una concentración mayor cuantificada con el kit de Romer.

De acuerdo con los resultados obtenidos con los distintos métodos una muestra (CE3) contiene soja como ingrediente no declarado, ya que dicha materia prima fue detectada por SDS-PAGE. Estos resultados fueron corroborados con otra metodología ya que esta muestra fue analizada también con un kit de Real Time PCR. Como resultado de dicho análisis también se obtuvo un resultado positivo, Ct: 16,2 siendo el valor de corte Ct: 30 (Cattapan R et al, 2013).

Tres muestras (CF1, CE1, CE4) también contienen soja en una concentración mayor a 100 ppm ya que se obtuvieron resultados positivos por Inmunoblotting (resultados confirmados con los kits de ELISA). En estas tres muestras es posible que exista contacto cruzado por compartir las líneas de producción o bien por la llegada del alérgeno soja a través del agregado de un aditivo que lo contiene (CF1).

4.2.5) Desarrollo del enzoinmunoensayo competitivo para soja en productos cárnicos

4.2.5.1) Cuantificación de proteínas de soja en el extracto

Se utilizó el método de Lowry (Lowry O et al, 1951). La concentración de proteína de soja obtenida en el extracto de solución extractiva de proteínas totales fue 8,9 mg de proteína de soja/mL de solución extractiva. La concentración teórica en dicho extracto era 9,4 mg de proteína de soja/mL de solución extractiva. De manera que el porcentaje de recuperación fue 95%, es decir el 95% de las proteínas de soja resultaron solubles en la solución extractiva de proteínas totales.

4.2.5.2) Puesta a punto del enzoinmunoensayo competitivo

En la figura N° 5 se observan las dos curvas obtenidas en la puesta a punto del enzoinmunoensayo competitivo, para la determinación de la concentración óptima de antígeno soja y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el ensayo final.

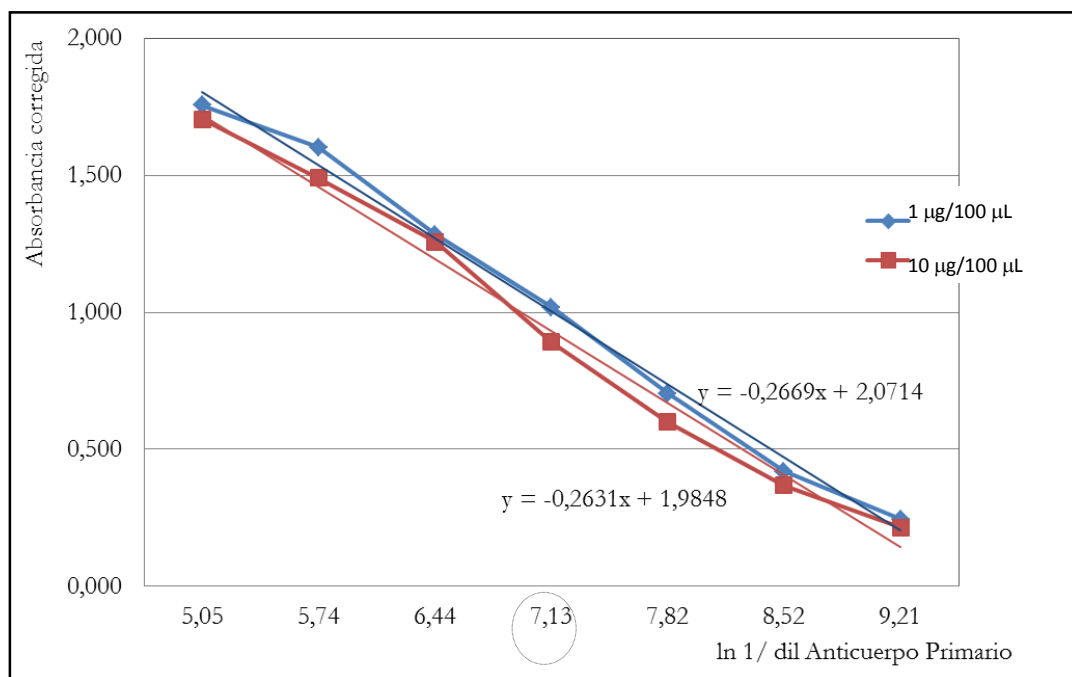


Figura N° 5: Curvas obtenidas para la determinación de la concentración óptima de antígeno soja y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el ensayo inmunoenzimático competitivo final. (Absorbancia corregida versus ln 1/dilución Anticuerpo Primario)

En la Figura N° 5 se observan las curvas correspondientes a 1 µg de proteína de soja /100 µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 y a 10 µg de proteína de soja /100 µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6; que se obtuvieron en la puesta a punto del ensayo.

Para la selección de la concentración óptima de antígeno a utilizar en el ensayo se eligió la curva con mayor pendiente. La concentración de antígeno seleccionada fue 1 µg de proteína de soja /100 µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6.

Para la selección de la dilución óptima de anticuerpo primario a utilizar en la competencia, se seleccionó en la curva previamente elegida (la correspondiente a 1 µg de proteína de soja /100 µL de buffer) la zona más sensible a cambios, obteniendo de esta manera un método con adecuada sensibilidad. La dilución de anticuerpo primario seleccionada para utilizar en la competencia fue de 1/1250 (ln 1/dilución Anticuerpo Primario: 7,13).

4.2.5.3) Validación

4.2.5.3.1) Linealidad

El ME y el SDS son efectivos 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 (Watanabe Y et al, 2005).

Dado que en este ensayo se utiliza un buffer de extracción que contiene agentes reductores y desnaturalizantes (ME y SDS) que interfieren en la reacción antígeno-anticuerpo (Watanabe Y et al, 2005) se evaluó la dilución de la solución extractiva que no afectara la unión antígeno-anticuerpo. Algunos investigadores han observado que generalmente las concentraciones de este buffer suficientemente diluidas, no influyen en la performance del ensayo (Díaz Amigo C y Popping B, 2010; García E et al, 2005).

Se ensayaron tres diluciones de solución extractiva en buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 (1:50, 1:100, 1:175) realizando el ensayo inmunoenzimático competitivo como se describió en 3.2.2.5.1.5.1.1). Se observó que los valores de Absorbancia con la dilución 1:175 eran similares a los obtenidos en los pocillos de “unión máxima” (M). En cambio con las diluciones de 1:50 y 1:100 los valores de Absorbancia eran inferiores a los valores correspondientes a M. Esto implica cuantificación de analito en una solución que no la contiene (ensayo competitivo). Los valores menores de Absorbancia se deben a una interferencia de los componentes de la solución extractiva en la unión antígeno – anticuerpo y no a la presencia de analito. De acuerdo con estos resultados para cada punto de la curva se realizó una dilución del extracto original de soja pero se mantuvo constante la concentración de SDS y de ME. Esas concentraciones son las que corresponden a una dilución de la solución extractiva 1:175.

Para establecer linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de soja/mL (Figura N° 6). 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.

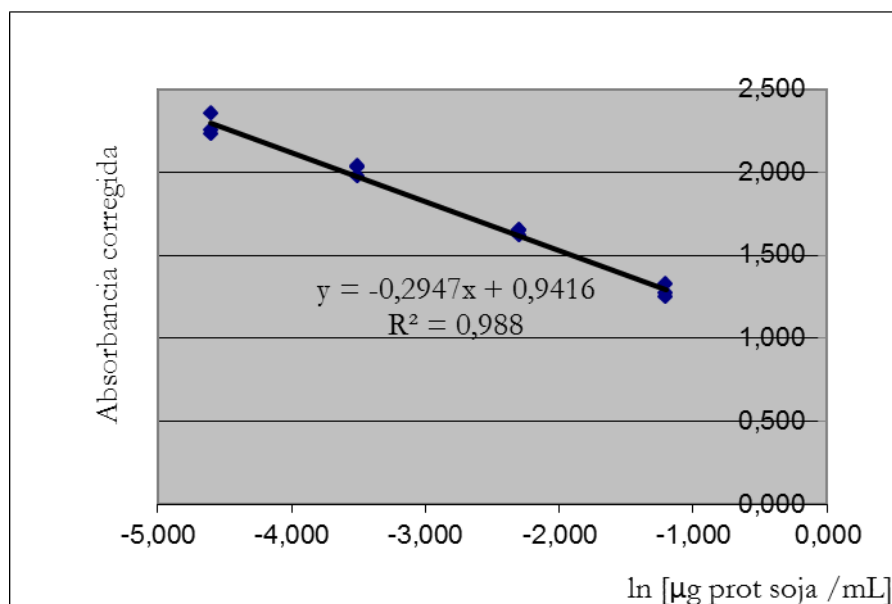


Figura N° 6: Curva de calibración: Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de soja (μg proteína de soja/mL).

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 $F=1,84$ (CM desvío de la linealidad/ CM error puro) y $p=0,2195$ 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 -0,29 con un límite inferior 95% (LI) de -0,32 y un límite superior 95% (LS) de -0,27, ordenada al origen 0,94 con LI: 0,87 y LS: 1,01 y un coeficiente de correlación de 0,988.

A los valores límites de la curva de calibración (0,01 μg proteína de soja/mL y 0,3 μg proteína de soja/mL) se les aplicó el cálculo ^{*1} presentado en ítem 3.2.2.5.1.5.1.2) para calcular el rango de trabajo correspondiente a proteína de soja en producto cárnico. El rango de trabajo obtenido fue 9 ppm-280 ppm de proteína de soja en productos cárnicos.

4.2.5.3.2) Límite de detección y Límite de cuantificación

El valor del límite de detección obtenido fue 9,0 ppm de proteína de soja y el del límite de cuantificación 18,0 ppm de proteína de soja.

4.2.5.3.3) Precisión intradía e interdías

La precisión del método en el día expresada como coeficiente de variación (CV) fue 7,8 (n=3) y la precisión del método entre días fue 12,7 (n=9). Dichos valores son adecuados ya que se adoptó como criterio de aceptación que los CV de la precisión intradía e interdías no superaran el 15% (Huber L, 2010).

4.2.5.3.4) Recuperación

Se analizaron sistemas modelo de carne vacuna con 75 y 20 ppm de proteína de soja. Se obtuvieron resultados inferiores a los esperados (23 y 17 ppm, respectivamente). Esto indica que la recuperación de este ensayo no es adecuada posiblemente por interferencia de la matriz cárnica ya sea en la extracción de las proteínas de soja y/o en la detección de dichas proteínas. De acuerdo con resultados previos, algunos ELISA comerciales también presentan valores muy inferiores a los esperados en los sistemas modelo cárnicos analizados.

El método ELISA es una herramienta importante para detectar alérgenos en alimentos, pero se debe tener en cuenta que diversas matrices alimentarias pueden afectar la recuperación del método, no pudiendo reconocer en la mayoría de los casos el compuesto del alimento que interfiere en el ensayo (Diaz Amigo C, 2010c).

4.2.5.4) Muestras comerciales analizadas con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado

En la Tabla N° 17 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado.

Muestras	Ingredientes	R-Biopharm ppm proteína de soja	Enzimoimmunoensayo desarrollado ppm proteína de soja
CH1	Carne vacuna	>20,0	39,1±3,1
CH2	Carne vacuna	5,2±1,6	29,0±3,5
CH3	Carne vacuna	<2,5	<18,0
CE6	No se conoce la composición de esta muestra	>20,0	>280,0
CS1	No se conoce la composición de esta muestra	>20,0	>280,0

Tabla N° 17: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en productos cárnicos utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado.

Previamente se mencionó que los resultados entre diferentes ensayos de ELISA pueden ser diferentes. Esta variación podría deberse a la falta de estandarización del método, material de calibración utilizado, soluciones de extracción empleadas, especificidad del anticuerpo (Diaz Amigo C, 2010 a). Por lo tanto los resultados cuantitativos entre estos dos métodos no se pueden comparar. Sin embargo lo que sí se puede confirmar es que en general se observó un comportamiento similar en cada muestra utilizando ambos métodos. En la muestra CH1 el valor obtenido con R-Biopharm supera al límite superior de la curva de calibración mientras que en el enzimoimmunoensayo competitivo el valor obtenido se encuentra dentro del rango de trabajo de este método. En la muestra CH2 se obtuvieron valores cuantificables dentro del rango de trabajo de cada método. En la muestra CH3 ambos métodos presentaron valores por debajo del límite de cuantificación. En las muestras CE6 y CS1 los valores obtenidos son mayores al límite superior de la curva de calibración de cada método.

Estos resultados nos indican que si una muestra presenta un resultado positivo con el enzimoimmunoensayo competitivo no resulta necesario recurrir a un kit comercial de ELISA ya que la muestra contiene soja.

Se calculó el costo del enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado en abril del año 2015. El mismo resultó 0,60 dólares por pocillo. En ese momento un kit comercial tenía un valor en el mercado de 6,00 dólares por pocillo. De manera que el enzimoimmunoensayo desarrollado tiene un costo considerablemente menor al de los kits comerciales. Por lo tanto, este se podría utilizar como método de screening, para analizar muestras en las que se sospeche un posible

contacto cruzado con soja. Cuando esta metodología resulte negativa, se debería confirmar con un kit comercial de adecuada sensibilidad, para asegurar la ausencia de proteína de soja con el nivel de detección del kit.

4.3) Detección de proteínas de clara de huevo en productos cárnicos

4.3.1) Sistemas modelo crudos con agregado de clara de huevo

En la Tabla N° 18 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de clara de huevo, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

SISTEMA MODELO ppm clara de huevo	CL0 0 ppm	CL1 10 ppm	CL2 18 ppm	CL3 25 ppm	CL4 100 ppm	CL5 500 ppm	CL6 1000 ppm	CL7 2000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI

Tabla N° 18: Detección de proteínas de clara de huevo en sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de clara de huevo, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

De acuerdo con estos resultados **SDS-PAGE** no detecta clara de huevo en mezcla con carne vacuna ni siquiera en la mayor concentración analizada (2000 ppm clara de huevo).

Inmunoblotting resulta mucho más sensible, ya que permite la detección de 100 ppm de clara de huevo en mezcla con carne vacuna. Se pudo observar la banda característica de huevo que corresponde a ovoalbúmina (45000D).

En la Tabla N° 19 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de clara de huevo en sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de clara de huevo, utilizando un kit comercial de ELISA (R-Biopharm para huevo).

SISTEMA MODELO ppm clara de huevo (ppm proteína de clara de huevo)	ELISA R-Biopharm ppm proteína de clara de huevo
0	<0,13
0,5 (0,39)	0,14 ±0,03
1,0 (0,78)	0,18 ±0,05
2,0 (1,56)	0,24 ±0,05
4,0 (3,12)	0,58 ±0,15
5,0 (3,90)	>3,55
7,5 (5,85)	>3,55
10,0 (7,80)	>3,55
18,0 (14,04)	>3,55
25,0 (19,50)	>3,55
50,0 (39,00)	>3,55
100,0 (78,00)	>3,55
500,0 (390,00)	>3,55
1000,0 (780,00)	>3,55
2000,0 (1560,00)	>3,55

Tabla N° 19: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de clara de huevo en sistemas modelo de carne vacuna con 0-2000 ppm de clara de huevo, utilizando un kit comercial de ELISA (R-Biopharm para huevo).

Se observa que el kit para huevo de **R-Biopharm** detecta clara de huevo a partir del sistema modelo de 0,5 ppm. Los sistemas modelo de 0,5 a 4 ppm presentan resultados positivos y cuantificables de huevo, aunque muy alejados de los valores reales. Los sistemas modelo de 5 a 2000 ppm de clara de huevo presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (3,55 ppm de proteína de clara de huevo).

4.3.2) Sistemas modelo cocidos con agregado de clara de huevo

En la Tabla N° 20 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-2000 ppm de clara de huevo, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

SISTEMA MODELO ppm clara de huevo	CL0 0 ppm	CL1 10 ppm	CL2 18 ppm	CL3 25 ppm	CL4 100 ppm	CL5 500 ppm	CL6 1000 ppm	CL7 2000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI

Tabla N° 20: Detección de proteínas de clara de huevo en sistemas modelo de fiambre de cerdo con 0-2000 ppm de clara de huevo, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

De acuerdo con estos resultados **SDS-PAGE** no detecta clara de huevo en mezcla con fiambre de cerdo ni siquiera en la mayor concentración analizada (2000 ppm clara de huevo).

Inmunoblotting resulta mucho más sensible ya que permite la detección de 500 ppm de clara de huevo. Se pudo observar la banda característica de ovoalbúmina (45000D).

Si se comparan estos resultados con los resultados obtenidos en los sistemas modelo crudos (ítem 4.3.1) **SDS-PAGE** no detecta clara de huevo ni siquiera en la mayor concentración analizada (2000 ppm de clara de huevo). **Inmunoblotting** detecta clara de huevo a partir del sistema modelo de 100 ppm en sistemas modelo crudos y a partir de 500 ppm en sistemas modelo cocidos. Esto implicaría que el tratamiento térmico aplicado al producto puede haber modificado la solubilidad de las proteínas de la clara de huevo, así como también la interacción de las mismas con el anticuerpo primario utilizado en el Inmunoblotting. Por lo tanto en el caso de los sistemas modelo crudos Inmunoblotting resultó más sensible que en el caso de los sistemas modelo cocidos.

En la Tabla N° 21 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de clara de huevo en sistemas modelo de fiambre con 0-2000 ppm de clara de huevo, utilizando un kit comercial de **ELISA** (R-Biopharm para huevo).

SISTEMA MODELO ppm clara de huevo (ppm proteína de clara de huevo)	ELISA R-Biopharm ppm proteína de clara de huevo
0	<0,13
0,5 (0,39)	<0,13
1,0 (0,78)	<0,13
2,0 (1,56)	<0,13
4,0 (3,12)	<0,13
5,0 (3,90)	<0,13
7,5 (5,85)	<0,13
10,0 (7,80)	0,17±0,03
18,0 (14,04)	0,22±0,05
25,0 (19,5)	0,28±0,07
50,0 (39,00)	0,47±0,04
100,0 (78,00)	0,96±0,20
500,0 (390,00)	3,25±0,70
1000,0 (780,00)	>3,55
2000,0 (1560,00)	>3,55

Tabla N° 21: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de clara de huevo en sistemas modelo de fiambre con 0-2000 ppm de clara de huevo, utilizando un kit comercial de ELISA (R-Biopharm para huevo).

Se observa que el kit para huevo de **R-Biopharm** detecta clara de huevo a partir del sistema modelo de 10 ppm. Los sistemas modelo de 10-500 ppm de clara de huevo presentan resultados positivos y cuantificables de huevo, aunque muy alejados de los valores reales. Los sistemas modelo de 1000 y 2000 ppm de clara de huevo presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (3,55 ppm de proteína de clara de huevo).

Si se comparan los resultados con los obtenidos en sistemas modelo crudos (ítem 4.3.1), se observa que el kit de **R-Biopharm** resulta más sensible en la detección de clara de huevo en los sistemas modelo crudos (0,5 ppm de clara de huevo) comparados con los sistemas modelo cocidos (10 ppm clara de huevo). Los resultados de los sistemas modelo crudos fueron siempre mayores con respecto a los sistemas modelo cocidos. Como se mencionó anteriormente esto confirmaría que el tratamiento térmico aplicado en los productos cocidos afectaría la solubilidad de las proteínas de huevo y/o su capacidad para reaccionar con los anticuerpos presentes en el kit de ELISA utilizado (Besler M et al, 2001).

4.3.3) Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas de huevo

Se analizaron seis muestras adquiridas en supermercados de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. La composición de las mismas correspondía al listado de ingredientes presente en cada uno de los rótulos. También se presentan los resultados de tres productos de pescado en los cuales se determinó presencia de alérgeno huevo (ítem 3.1.2.4.).

En la Tabla N° 22 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo de productos con declaración de ingredientes en el rótulo de los mismos, utilizando Inmunoblotting y un kit de ELISA (R-Biopharm para huevo).

Muestras	Denominación	Ingredientes proteicos declarados y almidón	Inmunoblotting	ELISA R-Biopharm ppm huevo entero en polvo
CF1	Fiambre de cerdo	Carne de cerdo	Negativo	<0,5
CF5	Fiambre de cerdo	Carne de cerdo y clara de huevo	Positivo	>13,5
CF6	Fiambre de cerdo	Carne de cerdo	Negativo	>13,5
CP1	Pescaditos de merluza rebozados	Merluza, rebozador, harina de trigo, almidón.	Positivo	>13,5
CP2	Medallones de merluza	Merluza, harina de trigo, almidón.	Positivo	>13,5
CP3	Medallones de merluza rebozados congelados	Merluza, rebozador, harina de trigo, almidón.	Positivo	>13,5

Tabla N°22: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo de productos con declaración de ingredientes en el rótulo de los mismos, utilizando Inmunoblotting y un kit de ELISA (R-Biopharm para huevo).

En la muestra CF1 que no declara huevo, ninguna de las metodologías detectó proteínas de huevo. En la muestra CF5, que declara clara de huevo, los dos métodos utilizados detectaron huevo. En la muestra CF6, que no declara huevo, solamente el método de ELISA detectó proteínas de huevo. Probablemente se trate de un contacto cruzado.

En las muestras CP1, CP2 y CP3, que no declaran huevo, se detectó huevo con los dos métodos utilizados. En estas muestras es posible que se haya utilizado huevo, clara de huevo u ovoalbúmina como ingrediente no declarado en el rótulo o bien que hayan sufrido contacto cruzado con estas proteínas. La detección de proteínas de huevo solo con el kit de ELISA implica que en la muestra hubo un contacto cruzado con el alérgeno huevo. La detección de proteína de huevo tanto con inmunoblotting como con el kit de ELISA no permite definir si la muestra contiene huevo como ingrediente o aditivo o si hubo un contacto cruzado.

4.4) Detección de proteínas de huevo en productos farináceos

4.4.1) Sistemas modelo de pastas secas con agregado de huevo entero en polvo

En la Tabla N° 23 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de siete sistemas modelo de pastas secas con 0-1000 ppm de huevo entero en polvo, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

SISTEMA MODELO ppm huevo entero	H0 0 ppm	H1 10 ppm	H2 25 ppm	H3 50 ppm	H4 100 ppm	H5 500 ppm	H6 1000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

Tabla N° 23: Detección de proteínas de huevo entero en sistemas modelo de pastas secas con 0-1000 ppm de huevo entero en polvo, analizados por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

De acuerdo con estos resultados ni **SDS-PAGE** ni **Inmunoblotting** detectan huevo en pastas secas ni siquiera en la mayor concentración analizada (1000 ppm de huevo entero en polvo).

En la Tabla N°24 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo entero en sistemas modelo de pastas secas con 0-50 ppm de huevo entero, utilizando tres kits comerciales de **ELISA** (Veratox-Neogen, Romer y R-Biopharm para huevo).

SISTEMA MODELO ppm huevo entero en polvo	Veratox-Neogen ppm huevo entero en polvo	Romer ppm proteína de clara de huevo (ppm huevo entero en polvo)*	R- Biopharm ppm huevo entero en polvo
0	<2,5	<0,40	<0,50
5	6,7±1,2	2,70±0,49 (5,40±0,98)	8,10±2,18
10	12,0±0,6	5,30±0,32 (10,60±0,64)	12,40±3,04
25	19,0±1,1	12,30± 1,79 (24,60±3,58)	33,30±3,14
50	55,5±1,3	25,50±1,52 (51,00±3,04)	52,00±2,90

Tabla N°24: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo entero en sistemas modelo de pastas secas con 0-50 ppm de huevo entero en polvo, utilizando tres kits comerciales de ELISA (Veratox-Neogen, Romer y R-Biopharm para huevo). * Factor de conversión de ppm de proteína de clara de huevo a ppm de huevo entero en polvo: 2.

En la Tabla N° 24 se observa que los tres kits utilizados detectan huevo a partir del sistema modelo de 5 ppm de huevo entero en polvo. Con los tres kits los sistemas modelo de 5-50 ppm de huevo entero en polvo, presentan resultados positivos y cuantificables. A diferencia de los resultados obtenidos con los kits de ELISA en productos cárnicos, en el caso de pastas secas las concentraciones obtenidas se encuentran en el orden de los valores reales. Esto podría deberse a la complejidad de la matriz cárnica frente a una matriz más simple como los productos farináceos (pastas secas). Se debe tener en cuenta que algunas matrices alimentarias pueden afectar la detección del alérgeno utilizando el método de ELISA. En Diaz Amigo C, 2010 b para comparar resultados de diferentes kits comerciales se utilizaron sistemas modelo elaborados con harina de trigo. El objetivo de utilizar harina de trigo fue minimizar las interferencias originadas por otros componentes de los alimentos. Esto indicaría que las pastas secas constituyen una matriz más sencilla, frente a los productos cárnicos y la detección/cuantificación de huevo se ve menos afectada.

4.4.2) Muestras provistas por la industria analizadas para la determinación de proteínas de huevo

Se analizaron 19 productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. La composición y características de las mismas fueron informadas por el fabricante (ítem 3.1.3.2.).

En la Tabla N° 25 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo de productos elaborados con harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria, utilizando dos kits de ELISA (R-Biopharm y Veratox-Neogen para huevo). De acuerdo con lo informado por el fabricante los lotes identificados con la letra (a) corresponden a productos elaborados en línea cercana a elaboración de pastas con huevo; los lotes identificados con la letra (b) corresponden a productos elaborados con bajo porcentaje de reproceso con huevo y los identificados con la letra (c) corresponden a productos elaborados

con alto porcentaje de reproceso con huevo. Se entiende por productos elaborados con reproceso con huevo a productos en los que se incorporó en su formulación productos molidos que fueron elaborados con huevo.

Muestras	Lote	R-Biopharm ppm huevo entero en polvo	Veratox-Neogen ppm huevo entero en polvo
Fideos de harina de trigo pan.	1 (a)	<0,50	<2,5
	2 (b)	1,25±0,06	n.d.
	3 (a)	<0,50	n.d.
	4 (a)	<0,50	<2,5
	5 (a)	<0,50	n.d.
	6 (b)	2,64±0,25	4,5±1,3
Fideos elaborados con sémola de trigo candeal	7 (a)	<0,50	n.d.
	8 (a)	<0,50	n.d.
	9 (a)	<0,50	n.d.
	10 (b)	1,05±0,05	2,1±0,6
Producto con harina y sémola 1	11 (c)	>13,50	>25,0
Producto con harina y sémola 2	12 (c)	4,43±1,22	8,7±1,7
	13 (c)	6,18±1,70	>25,0
Producto con harina y sémola 3	14 (c)	6,92±1,90	15,7±2,3
	15 (c)	6,92±2,00	n.d.
Producto con harina y sémola 4	16 (c)	5,89±1,50	n.d.
	17 (c)	7,61±2,05	n.d.
	18 (c)	11,80±3,54	n.d.
	19 (c)	10,72±2,14	>25,0

Tabla N° 25: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo entero en productos elaborados con harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria, utilizando dos kits comerciales de **ELISA** (R-Biopharm y Veratox-Neogen para huevo). n.d.: no se determinó.

Con el kit de **R-Biopharm** los productos elaborados en línea cercana a elaboración de pastas con huevo (a) presentan concentraciones por debajo del límite de detección del kit (<0,5 ppm de huevo entero en polvo). Los productos elaborados con bajo porcentaje de reproceso con huevo (b) presentan muy bajas concentraciones de huevo en polvo (entre 1,05 y 2,64 ppm de huevo en polvo). Los productos elaborados con alto porcentaje de reproceso con huevo (c) presentan mayores concentraciones de huevo en polvo (4,43 y mayor a 13,50 ppm de huevo en polvo).

Con el kit **Veratox-Neogen** los productos elaborados en línea cercana a elaboración de pastas con huevo (a) presentan concentraciones por debajo del límite de detección del kit (<2,5 ppm de huevo en polvo). Los productos elaborados con bajo porcentaje de reproceso con huevo (b) presentan muy bajas concentraciones de huevo en polvo (entre 2,1 y 4,5 ppm de huevo en polvo). Los productos elaborados con alto porcentaje de reproceso con huevo (c) presentan mayores concentraciones de huevo en polvo (8,7 y mayor a 25,0 ppm de huevo en polvo).

En las muestras en las que se cuantificó huevo utilizando ambos kits los resultados fueron diferentes. Como se mencionó anteriormente los resultados con diferentes kits comerciales pueden variar. Esta variación podría deberse a la falta de estandarización de los métodos, material de calibración utilizado y soluciones de extracción empleadas. (Diaz Amigo C, 2010 a)

De acuerdo con los resultados obtenidos la elaboración de fideos en una línea cercana a otra en la que se elaboran fideos con huevo, no produciría contacto cruzado. Sin embargo es posible detectar la presencia de alérgenos de huevo en muestras que contienen bajo o alto porcentaje de reproceso con huevo. El uso de productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo sólo se debería destinar a la elaboración de productos en los que se declare la presencia del alérgeno huevo.

4.4.3) Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas de huevo

Se analizaron 9 muestras comerciales correspondientes a fideos secos (muestras F1 a F9) que presentaban en sus respectivos rótulos frases de advertencia sobre la posible presencia de huevo en su composición como se detalló en 3.1.3.3).

En la Tabla N° 26 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo de muestras comerciales correspondientes a fideos secos, que presentan en sus respectivos rótulos frases de advertencia, utilizando dos kits de ELISA (R-Biopharm y Veratox-Neogen para huevo).

Muestras	Denominación de venta	Declaración de alérgenos	R-Biopharm ppm huevo entero en polvo	Veratox- Neogen ppm huevo entero en polvo
F1 M1	Fideos de sémola de trigo candeal. Spaghetti.	Este producto se elabora en un equipo que procesa pasta al huevo. Contiene gluten	< 0,5	< 2,5
F2 M1	Fideos secos fortificados con hierro, vitamina B1 y ácido fólico. Spaghetti.	Este producto se elabora en un equipo que procesa pasta al huevo. Contiene gluten	<0,5	< 2,5
F3 M1	Fideos semolados fortificados con hierro. Moños	Este producto se elabora en un equipo que procesa pasta al huevo. Contiene gluten.	<0,5	< 2,5
F4 M2	Fideos de sémola de trigo candeal y sémola de trigo pan. Foratini	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo.	12,1 ± 1,9	22,8 + 5,4
F5 M2	Fideos Bavettas.	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo	5,4± 1,0	11,4± 1,1
F6 M2	Fideos de sémola de trigo candeal y sémola de trigo pan. Spaghetti.	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo.	6,5± 0,9	15,9± 4,4
F7 M2	Fideos. Cellentani.	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo.	0,5± 0,1	< 2,5
F8 M3	Fideos secos:Spaghetti	Contiene gluten. Puede contener vestigios de huevo.	<0,5	< 2,5
F9 M3	Fideos secos. Coditos.	Contiene gluten. Puede contener vestigios de huevo.	8,5± 0,5	9,7± 1,5

Tabla N°26: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo de muestras comerciales correspondientes a fideos secos, que presentaban en sus respectivos rótulos frases de advertencia, utilizando dos kits de ELISA (R-Biopharm y Veratox-Neogen para huevo).

Cinco de las muestras comerciales analizadas (F1, F2, F3, F7 y F8) presentaron concentraciones por debajo o igual al límite de cuantificación del kit (0,5 ppm de huevo entero en polvo con el kit de R-Biopharm y 2,5 ppm de huevo entero en polvo con el kit Veratox-Neogen). En cuatro muestras (F4, F5, F6 y F9) se obtuvieron concentraciones entre 5,4 y 12,1 ppm de huevo entero en polvo utilizando el kit de R-Biopharm y entre 9,7 y 22,8 ppm de huevo entero en polvo utilizando el kit Veratox-Neogen.

Si bien no existen valores umbrales establecidos internacionalmente un posible análisis de los resultados obtenidos con los kits de ELISA tanto en las muestras provistas por la industria como en las muestras comerciales sería compararlos con lo establecido en la legislación japonesa y en el sistema VITAL 2.0 (ambos discutidos en la introducción).

De acuerdo con los resultados obtenidos con el kit de R-Biopharm, según la legislación japonesa casi todas las muestras no deberían declarar alérgeno huevo, ya que tienen < de 10 ppm de proteínas de huevo. Cabe aclarar que los valores presentados en las Tablas 25 y 26 están expresados en ppm de huevo entero en polvo. De acuerdo con las especificaciones del kit el contenido de proteínas de huevo en polvo es 49 %. Sólo el Producto 1 con harina y sémola, lote 11, podría sobrepasar este valor. Este producto contiene más de 13,5 ppm de huevo en polvo lo que corresponde a un contenido superior a 6,6 ppm de proteína de huevo.

Como se mencionó en la introducción el sistema Vital 2.0 establece una dosis de referencia para cada alérgeno. Para establecer si se debe declarar en el rótulo una frase de advertencia por contacto cruzado, se calcula un valor límite utilizando la siguiente fórmula:

Valor límite (ppm proteína de huevo)=(dosis de referencia [mg] x 1000)/ porción [g]= 0,375

Dosis de referencia para huevo= 0,03 mg proteína de huevo

Porción pastas secas= 80 g

Por lo tanto si la concentración de alérgeno en la muestra es < a 0,375 ppm de proteína de huevo, no se requiere una frase de advertencia por contacto cruzado. Si la concentración de alérgeno en la muestra es \geq a 0,375 ppm de proteína de huevo se requiere una frase de advertencia por contacto cruzado.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el kit de R-Biopharm 16 de las muestras analizadas deberían tener una frase de advertencia por contacto cruzado. A modo de ejemplo en las muestras F4, F5 y F6, los resultados obtenidos fueron: 6,0; 2,6 y 3,2 ppm de proteína de huevo, respectivamente. Estos valores son superiores al valor límite calculado (0,375 ppm proteína de huevo), por lo tanto sería correcto el uso de una frase de advertencia.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el kit Veratox-Neogen, según la legislación japonesa, casi todas las muestras no deberían declarar alérgeno huevo, ya que tienen <10ppm proteína de huevo. Sólo 4 de las muestras (11,13, 19 y F4) sobrepasan este valor. Tres de estas muestras (11, 13 y 19) contienen más de 25 ppm de huevo en polvo. Como se mencionó anteriormente el contenido de proteínas de huevo en polvo es 49 %, de manera que estas tres

muestras tendrían un contenido superior a 12,25 ppm de proteína de huevo. Por lo tanto en estas muestras se debería declarar al alérgeno huevo como ingrediente según la legislación japonesa. La muestra F4 tiene 11,4 ppm de proteína de huevo, por lo tanto en esta muestra también se debería declarar al alérgeno huevo, como ingrediente según la legislación japonesa.

Si consideramos los resultados obtenidos con el kit Veratox-Neogen no se puede evaluar el uso de una frase de advertencia según el sistema Vital 2.0 en algunas de las muestras analizadas (1, 4, F1, F2, F3, F7 y F8). Esto se debe a que el límite de cuantificación del kit es 2,5 ppm de huevo entero en polvo que corresponde a 1,2 ppm de proteína de huevo; este valor supera ampliamente el valor límite 0,375 ppm de proteína de huevo. En todas las muestras en las que el resultado fue $< 1,2$ ppm de proteína de huevo se desconoce si superan o no el valor límite. En las muestras F4, F5, F6 y F9 los valores de proteína de huevo obtenidos son mayores al valor límite (0,375 ppm de proteína de huevo), por lo tanto sería correcto el uso de una frase de advertencia.

Por todo lo expuesto se observa que existe dificultad para determinar si se debe declarar o no la presencia de huevo o bien una frase de advertencia en el rótulo de los alimentos, ya que según el criterio que se tenga en cuenta y según el kit utilizado, el resultado puede ser diferente. Carmen Diaz Amigo y Bert Popping hacen referencia a que a pesar de que no todos los métodos son perfectos y algunos tienen más inconvenientes que otros, la introducción de valores umbrales o niveles de acción podría ser beneficiosa. Los umbrales son actualmente extraoficialmente usados por agentes de vigilancia e industrias de alimentos. La falta de umbrales está llevando a un enfoque más conservador con tolerancia cero. Las agencias de regulación y los productores de alimentos deberían prestar más atención a la efectividad de las iniciativas regulatorias de la industria (por ejemplo: gobierno de Japón, sistema VITAL) que están implementando niveles umbrales basados en la evaluación de riesgo y están estableciendo un precedente. Ellos recomiendan la introducción de umbrales o niveles de acción, sin embargo el marco regulatorio alrededor de estos niveles necesita ser cuidadosamente definido adaptándose a las incertidumbres que aún existen causadas por las limitaciones de la metodología analítica utilizada para determinar esos valores (Diaz Amigo C y Popping B, 2010).

4.4.4) Desarrollo del enzoinmunoensayo competitivo para huevo en productos farináceos (pastas secas)

4.4.4.1) Cuantificación de proteínas de huevo en el extracto

Se utilizó el método de Lowry (Lowry O et al, 1951). La concentración de proteína de huevo obtenida en el extracto de solución extractiva de proteínas totales fue 12,4 mg de proteína de huevo/mL de solución extractiva. La concentración teórica en dicho extracto era 12,0 mg de proteína de huevo/mL de solución extractiva. De manera que el porcentaje de recuperación fue 103%.

4.4.4.2) Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo

En la figura N° 7 se presentan las dos curvas obtenidas en la puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo, para la determinación de la concentración óptima de antígeno huevo y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el ensayo final.

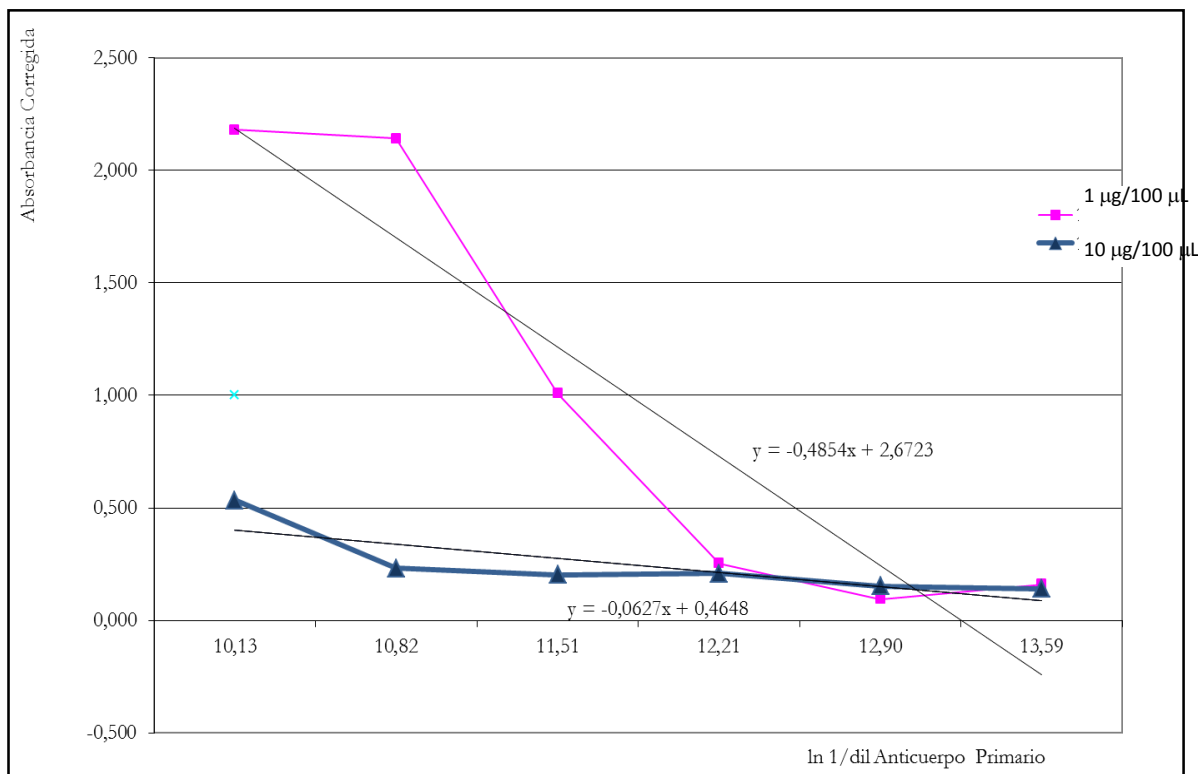


Figura N° 7: Curvas obtenidas para la determinación de la concentración óptima de antígeno huevo y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el enzimoimmunoensayo competitivo final.

En la Figura N° 7 se observan las curvas correspondientes a 1 µg de proteína de huevo /100 µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 y a 10 µg de proteína de huevo /100 µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6; que se obtuvieron en la puesta a punto del ensayo. Para la selección de la concentración óptima de antígeno se eligió la curva con mayor pendiente. La concentración de antígeno seleccionada fue 1 µg de proteína de huevo /100 µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6.

Para la selección de la dilución óptima de anticuerpo primario a utilizar en la competencia, se selecciona en la curva previamente elegida (la correspondiente a 1 µg de proteína de huevo /100 µL de buffer) la zona más sensible a cambios, obteniendo de esta manera un método con adecuada sensibilidad. La dilución de anticuerpo primario seleccionado para utilizar en la competencia fue de 1/60000 (ln 1/dilución anticuerpo primario = 11,0).

4.4.4.3) Validación

4.4.4.3.1) Linealidad

Como se mencionó en el punto 4.2.5.3.1) dado que se utiliza un buffer de extracción que contiene agentes reductores y desnaturalizantes (ME y SDS) que interfieren en la reacción antígeno-anticuerpo, se evaluó la dilución de la solución extractiva que no afectara dicha unión. La dilución utilizada para trabajar en este ensayo fue 1:260. En el caso del extracto de huevo se utiliza una dilución diferente a la dilución utilizada para el extracto de soja (1:175) ya que ambos contienen diferentes cantidades de proteínas. El extracto original de soja contiene 8,9 mg proteína/mL y el extracto original de huevo 12,4 mg de proteína/mL. Al preparar la curva de calibración de huevo la cantidad de extracto original a tomar es diferente.

Para establecer linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de huevo/mL. A los valores de Absorbancias corregidas obtenidas 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 huevo (μg proteína de huevo/mL) utilizando el programa Infostat profesional versión 2004d.1 desarrollado por la Universidad Nacional de Córdoba. Se obtuvo un valor de $F=0,29$ (CM desvío de la linealidad/ CM error puro) y $p=0,7538$ con lo cual se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de huevo/mL se comportó en forma lineal. La recta obtenida presentó una pendiente de -0,31 con un límite inferior 95% (LI) de -0,35 y un límite superior 95% (LS) de -0,26; ordenada al origen 1,20 con LI: 1,05 y LS: 1,35 y un coeficiente de correlación de 0,9564.

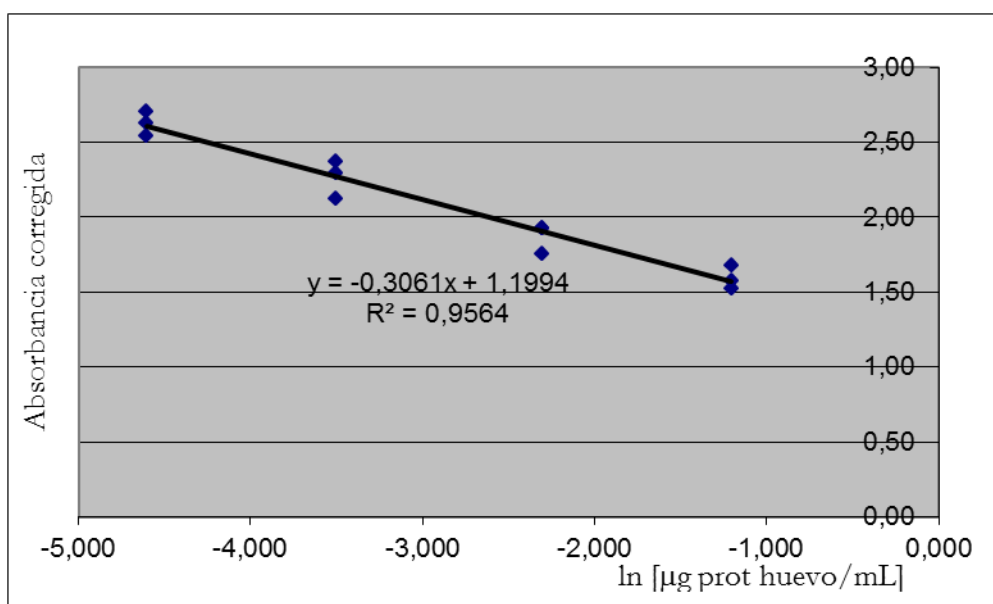


Figura N° 8: Curva de calibración. Absorbancia corregida en función del \ln de la concentración de huevo (μg proteína de huevo/mL).

A los valores límites de la curva de calibración (0,01 µg proteína de huevo/mL y 0,3 µg proteína de huevo/mL) se les aplicó el cálculo *³ presentado en el ítem 3.2.2.5.2.4.2) para calcular el rango de trabajo correspondiente a proteínas de huevo en pastas secas. El rango de trabajo obtenido fue 20-630 ppm de proteína de huevo en pastas secas.

4.4.4.3.2) Límite de detección y Límite de cuantificación

El valor del límite de detección obtenido fue 23,0 ppm de proteína de huevo y el del límite de cuantificación 45,0 ppm de proteína de huevo.

4.4.4.3.3) Precisión intradía e interdías

La precisión del método en el día expresada como coeficiente de variación (CV) fue 2,7 (n=3) y la precisión del método entre días fue 6,8 (n=9), dichos valores son adecuados ya que se adoptó como criterio de aceptación que los CV de la precisión intradía e interdías no superaran el 15%. (Huber L, 2010)

4.4.4.3.4) Recuperación

Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150 ppm de proteína de huevo entero en polvo. Los resultados obtenidos para los sistemas modelo fueron 314 y 157, respectivamente. Se calculó la recuperación del método, siendo la misma 104,7 %. Esta recuperación resultó apropiada ya que se consideran valores adecuados entre 70-130 % (Gatti M y Ferretti C, 2010).

4.4.4.4) Muestras comerciales analizadas con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado

Se analizaron siete muestras comerciales de pastas secas (detalladas en el ítem 3.1.3.4.2) con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado y con un kit comercial de R-Biopharm.

En la Tabla N° 27 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo en pastas secas comerciales, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado.

Muestras	R-Biopharm ppm huevo entero en polvo	Enzimoinmunoensayo desarrollado ppm proteína de huevo
F10	<0,5	<45,0
F11	>13,5	98,0±9,6
F12	>13,5	<45,0
F13	>13,5	<45,0
F14	>13,5	281,0±14,0
F15	>13,5	178,0± 13,0
F16	>13,5	<45,0

Tabla N° 27: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo en pastas secas comerciales, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoinmunoensayo competitivo desarrollado.

En la muestra F10 ambos métodos presentaron valores inferiores a los límites de cuantificación respectivos.

En tres muestras (F11, F14 y F15) fue posible detectar la presencia de trazas de huevo. El enzimoinmunoensayo competitivo desarrollado presentó valores en el rango de trabajo del ensayo mientras que con el kit de R-Biopharm se superó el valor más alto de la curva de calibración. Sin embargo se deben tener en cuenta los resultados obtenidos en las muestras F12, F13 y F16. El enzimoinmunoensayo competitivo desarrollado no permitió la cuantificación del alérgeno huevo y el kit de R-Biopharm superó el valor más alto de la curva de calibración. Esto se debe a la diferencia que hay en los límites de cuantificación de ambos métodos.

De acuerdo con estos resultados si una muestra presenta un resultado positivo con el enzimoinmunoensayo competitivo desarrollado se puede confirmar la presencia de huevo en dicha muestra. Sin embargo si el resultado obtenido resulta negativo (menor al límite de cuantificación de este método) es necesario confirmar el resultado mediante el análisis con un kit comercial de huevo de adecuada sensibilidad.

4.5) Detección de proteínas de soja en productos farináceos

4.5.1) Sistemas modelo de pastas con agregado de producto de soja

En la Tabla N° 28 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de siete sistemas modelo de pastas secas con 0-1000 ppm de producto de soja, analizados por SDS-PAGE e Immunoblotting.

SISTEMA MODELO ppm producto de soja	S0 0 ppm	S1 10 ppm	S2 50 ppm	S3 100 ppm	S4 250 ppm	S5 500 ppm	S6 1000 ppm
SDS-PAGE Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Inmunoblotting Proteínas totales	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI

Tabla N° 28: Detección de proteínas de soja en sistemas modelo de pastas secas con 0-1000 ppm de producto de soja, analizado por medio de SDS-PAGE e Inmunoblotting.

De acuerdo con estos resultados **SDS-PAGE** no detecta soja en mezcla con pastas secas ni siquiera en la mayor concentración analizada (1000 ppm de producto de soja). **Inmunoblotting** detecta soja a partir del sistema modelo de 250 ppm de producto de soja.

En la Tabla N°29 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en sistemas modelo de pastas secas con 0-1000 ppm de producto de soja, utilizando dos kits comerciales de **ELISA** (R-Biopharm y Veratox-Neogen para soja).

SISTEMA MODELO ppm producto de soja (ppm proteína de soja)	ELISA R-Biopharm ppm proteína de soja	ELISA Veratox-Neogen	
		ppm harina de soja	ppm proteína de soja*
0	<2,5	<2,5	<1,2
2,5 (1,6)	2,7±0,7	<2,5	<1,2
5 (3,15)	5,9±1,1	<2,5	<1,2
7,5 (4,7)	6,0±1,2	<2,5	<1,2
10 (6,3)	8,5±0,1	<2,5	<1,2
20 (12,6)	>20,0	4,5±1,3	2,1±0,6
30 (18,9)	>20,0	6,8±1,4	3,2±0,6
50 (31,5)	>20,0	7,6±0,1	3,6±0,1
100 (63)	>20,0	20,0±4,7	9,4±2,2
250 (157,5)	>20,0	>25,0	>11,7
500 (315)	>20,0	>25,0	>11,7
1000 (630)	>20,0	>25,0	>11,7

Tabla N°29: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en sistemas modelo de pastas secas con 0-1000 ppm de producto de soja, utilizando dos kits comerciales de ELISA (R-Biopharm y Veratox-Neogen para soja). *Factor de conversión a proteína de soja: 0,4701.

Se observa que la metodología ELISA utilizando el kit **R-Biopharm** detecta soja a partir del sistema modelo de 2,5 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo de 2,5 – 10 ppm de soja presentan resultados positivos y cuantificables de soja, aunque superan a los valores reales. Los sistemas modelo de 20-1000 ppm presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (20 ppm de proteína de soja).

El kit **Veratox-Neogen** resultó ser menos sensible para la detección de soja en pastas secas, ya que detecta proteínas de soja a partir del sistema modelo de 20 ppm de producto de soja. Los sistemas modelo de 20 a 100 ppm de producto de soja también presentan resultados positivos y

cuantificables de soja pero muy inferiores a los valores reales. Los sistemas modelo de 250 a 1000 ppm de producto de soja presentan un valor que supera el control superior de la curva de calibración (25 ppm de harina de soja). Se observa que los resultados obtenidos con los dos kits para los mismos sistemas modelo son diferentes. Como ya se mencionó anteriormente, según algunos investigadores existen diversas variables que llevan a obtener resultados diferentes entre los distintos kits comerciales. (Diaz Amigo C, 2010 a)

El kit Veratox-Neogen resultó menos sensible para la detección de soja en esta matriz que el de R-Biopharm. Si consideramos estos resultados y los obtenidos en las matrices de carne vacuna con soja y fiambre de cerdo con soja observamos que el kit Veratox-Neogen presenta dificultades para la detección de concentraciones muy bajas de soja en distintas matrices de alimentos. Esto debe ser tenido en cuenta cuando se debe seleccionar un kit de ELISA para establecer un posible contacto cruzado en una muestra.

4.5.2) Muestras provistas por la industria analizadas para la determinación de proteínas de soja

Se analizaron los mismos productos que fueron analizados para el alérgeno huevo descriptos en 3.1.3.2).

En la Tabla N° 30 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja de productos elaborados con harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria, utilizando un kit de ELISA (Veratox-Neogen para soja).

Muestras	Lote	Veratox- Neogen ppm aislado de soja
Fideos de harina de trigo pan.	1	22,9±5,7
	2	21,0±4,6
	3	13,2±3,4
	4	14,8±3,5
	5	<10,0
	6	20,5±4,7
Fideos elaborados con sémola de trigo candeal	7	<10,0
	8	<10,0
	9	<10,0
	10	16,7±4,2
Producto con harina y sémola 1	11	<10,0
Producto con harina y sémola 2	12	64,5±13,4
	13	<10,0
Producto con harina y sémola 3	14	87,9±20,2
	15	72,8±18,9
Producto con harina y sémola 4	16	67,8±16,3
	17	76,6±16,8
	18	96,9±20,3
	19	26,2±6,0

Tabla N°30: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja de productos elaborados con harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria, utilizando un kit de ELISA (Veratox-Neogen para soja).

Si bien la industria que nos facilitó estos 19 productos no brindó ninguna información con respecto al posible contenido de soja de estas muestras, se decidió su análisis para verificar una posible contaminación con soja. Esto puede ocurrir durante la producción y la cosecha o bien en el transporte o almacenamiento de la materia prima (granos de soja), pero también puede ocurrir cuando se comparten las maquinarias de elaboración y de envasado con productos con soja como ingredientes (Cattapan R et al, 2013).

Entre las muestras analizadas seis de ellas presentaron concentraciones por debajo del límite de cuantificación del kit (10 ppm de aislado de soja) mientras que en las trece restantes se obtuvieron concentraciones entre 13,2 y 96,9 ppm de aislado de soja utilizando el kit Veratox-Neogen. Evidentemente en varias muestras analizadas se comprobó la existencia de contacto cruzado con soja.

En particular dos de las muestras que resultaron positivas fueron analizadas además con un kit Real Time PCR (Cattapan R et al, 2013). Esta metodología permitió corroborar los

resultados obtenidos con el kit Veratox-Neogen ya que se obtuvieron los siguientes resultados, muestra Fideos de harina de trigo pan Lote 2 Ct: 27,1 y muestra Producto con harina y sémola 2 Lote 12 Ct: 24,4 (valor de corte Ct: 30).

4.5.3) Muestras comerciales analizadas para la determinación de proteínas de soja

Se analizaron 13 muestras comerciales correspondientes a productos farináceos detalladas en el ítem 3.1.4.3).

En la Tabla N° 31 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja de muestras comerciales correspondientes a productos farináceos, utilizando dos kits de ELISA (Veratox-Neogen y R-Biopharm para soja).

Muestras	Denominación	Veratox-Neogen		R-Biopharm ppm proteína de soja
		ppm harina de soja	ppm proteína de soja*	
PF1	Fideos secos Fortificados con hierro y calcio. Tallarín.	25,0±6,2	11,8±2,9	7,3±1,4
PF2	Fideos de semolín de trigo pan coloreados con cúrcuma. Spaghetti.	>25,0	>11,8	9,3±0,4
PF3	Fideos secos. Penne Rigatte.	14,7±3,8	7,0±1,8	2,7±0,1
PF4	Fideos de sémola de trigo candeal fortificados con vitaminas A, B1, B2, B6, B9, B12, D, hierro y zinc. Tirabuzón.	<2,5	<1,2	<2,5
PF5	Harina de trigo	n.d.	n.d.	>20,0
PF6	Harina de trigo	n.d.	n.d.	>20,0
PF7	Harina de trigo	n.d.	n.d.	>20,0
PF8	Harina de trigo	n.d.	n.d.	3,4±1,1
PF9	Harina de trigo	n.d.	n.d.	6,1±1,3
PF10	Harina de trigo	n.d.	n.d.	11,6±2,0
PF11	Premezcla para preparar tortas fritas	24,4±5,9	11,5±2,7	>20,0
PF12	Premezcla para pizza	11,0±2,4	5,2±1,1	n.d.
PF13	Producto en polvo a base de harina de trigo, cebada, avena, maíz, arroz, vitaminas y minerales, para lactantes a partir de los 6 meses de vida y niños de la primera infancia.	n.d.	n.d.	10,0±1,8

Tabla N° 31: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja de muestras comerciales correspondientes a productos farináceos, utilizando dos kits de ELISA (Veratox-Neogen y R-Biopharm para soja). *Factor de conversión a proteína de soja: 0,4701. n.d.: no se determinó.

De las trece muestras analizadas solo en una no se detectó soja (PF4) con los dos kits utilizados. Todas las demás muestras presentaron resultados positivos utilizando uno o dos kits. Los kits de ELISA detectaron soja no solo en las pastas secas, sino también en harinas y premezclas. Los valores obtenidos con los kits son diferentes como ya se observó con otros analitos y otros kits.

Estos resultados obtenidos con los kits de ELISA se podrían analizar con la legislación japonesa y el sistema VITAL 2.0 para determinar si estos productos requieren declaración de

soja o bien una frase de advertencia. Para este análisis solo se consideran los resultados obtenidos con el kit de R-Biopharm, dado que varias de las muestras no fueron analizadas con el kit Veratox-Neogen.

Cabe aclarar que la legislación japonesa no considera a la soja como uno de los alérgenos de declaración obligatoria. Sin embargo a los fines de este análisis se considera al valor límite 10 ppm de proteína que la legislación contempla para otros alérgenos.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el kit de R-Biopharm, según la legislación japonesa seis de las muestras no deberían declarar alérgeno soja (PF1 a PF4, PF8, PF9), ya que tendrían ≤ 10 ppm de proteína de soja. En otras seis muestras los resultados son mayores a 10 ppm de proteína de soja por lo tanto se debería declarar soja como ingrediente según la legislación japonesa (PF5 a PF7, PF10, PF11, PF13).

El sistema VITAL 2.0 establece una dosis de referencia para cada alérgeno. Para establecer si se debe declarar en el rótulo una frase de advertencia por contacto cruzado, se calculan los valores límites teniendo en cuenta la porción que le corresponde a cada alimento analizado.

Valor límite (ppm proteína de soja) = (dosis de referencia [mg] x 1000)/ porción [g]

Dosis de referencia para soja= 1mg proteína de soja

Porción fideos= 80 g

Porción harina= 50 g

Porción premezclas torta fritas = 27 g

Porción producto en polvo a base de cinco harinas= 25g

Valor límite fideos=12,5 ppm proteína de soja

Valor límite harina= 20, 0 ppm proteína de soja

Valor límite premezclas torta fritas=37,0 ppm proteína de soja

Valor límite producto en polvo a base de cinco harinas= 40,0 ppm proteína de soja

Dado que la concentración de alérgeno soja en las muestras de fideos PF1, PF2, PF3 y PF4 es $< 12,5$ ppm de proteína de soja, las mismas no requieren una frase de advertencia por contacto cruzado.

En las muestras de harinas PF5, PF6 y PF7 se requiere la frase de advertencia por contacto cruzado ya que las tres superan las 20 ppm de proteína de soja. En las muestras PF8, PF9 y PF10 no se requiere la frase de advertencia ya que contienen menos de 20 ppm de proteína de soja

En el caso de la premezcla para preparar torta frita (PF11) no es posible confirmar si se debe agregar o no la frase de advertencia ya que el valor obtenido es > 20 ppm de proteína de soja pero se desconoce si supera el valor límite calculado de 37,0 ppm de proteína de soja. En este caso en particular a los fines de confirmar el uso o no de la frase de advertencia se debería realizar una dilución del extracto para lograr la cuantificación real de proteína de soja en esta muestra.

En el producto en polvo a base de cinco harinas (PF13) el valor límite calculado fue de 40,0 ppm de proteína de soja, por lo tanto en este producto no se requiere la frase de advertencia por contacto cruzado, ya que el resultado obtenido es 10,0 ppm de proteína de soja.

De acuerdo con este análisis se observa que existe dificultad para determinar si se debe declarar o no la presencia de soja o bien una frase de advertencia en el rótulo de los alimentos, ya que según el criterio que se tenga en cuenta, el resultado puede ser diferente.

El origen del probable contacto cruzado de cereales y oleaginosas se ha estudiado a nivel mundial y se ha encontrado que podría originarse en el campo, durante la producción y la cosecha o durante el transporte y manipuleo de los mismos (Boye J et al., 2010; Ward R, 2015). Por esto se debe tener adecuado control de las materias primas utilizadas para la producción de alimentos procesados, asegurándose que estas no estén contaminadas con otras que corresponden a alérgenos alimentarios y que no deben estar presentes en un determinado alimento.

Los resultados hallados demuestran que en nuestro país también existe la contaminación de productos de trigo con proteínas de soja. Esta situación constituye un desafío para la industria de alimentos que deberá resolver este problema, ya sea extremando las medidas de control para evitar la presencia de soja en estos alimentos o bien si esto no fuera posible, utilizando una frase de advertencia dirigida a la población que presenta alergia a las proteínas de soja.

4.5.4) Desarrollo del enzoinmunoensayo competitivo para soja en productos farináceos (pastas secas)

4.5.4.1) Puesta a punto del enzoinmunoensayo competitivo

La puesta a punto del ensayo para detectar soja en pastas secas, fue similar a la puesta a punto del ensayo para detectar soja en productos cárnicos. Como se detalló en el ítem 4.2.5.2) se obtuvieron las curvas correspondientes a 1 µg de proteína de soja /100 µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 y a 10 µg de proteína de soja /100 µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. Para la selección de la concentración óptima de antígeno a utilizar en el ensayo se eligió la curva con mayor pendiente; la concentración de antígeno seleccionada fue 1 µg de proteína de soja /100 µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6. Para la selección de la dilución óptima de anticuerpo primario a utilizar en la competencia, se selecciona en la curva previamente elegida (la correspondiente a 1 µg de proteína de soja /100 µL de buffer) la zona más sensible a cambios, obteniendo de esta manera un método con adecuada sensibilidad. La dilución de anticuerpo primario seleccionado para utilizar en la competencia fue de 1/1250.

4.5.4.2) Validación

4.5.4.2.1) Linealidad

Como se describió en el ítem 4.2.5.3.1), el rango lineal resultó: 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 µg proteína de soja/mL. A los valores límites de la curva de calibración (0,01 µg proteína de soja/mL y 0,3 µg proteína de soja/mL) se les aplicó el cálculo ^{*2} presentado en ítem 3.2.2.5.1.5.2.2) para

calcular el rango de trabajo correspondiente a proteína de soja en pastas secas. El rango de trabajo obtenido fue 15 ppm-420 ppm de proteína de soja en pastas secas.

4.5.4.2.2) Límite de detección y Límite de cuantificación

El valor del límite de detección obtenido fue 47,0 ppm de proteína de soja y el del límite de cuantificación fue 76,0 ppm de proteína de soja.

4.5.4.2.3) Precisión intradía e interdías

La precisión del método en el día expresada como coeficiente de variación (CV) fue 12,7 (n=3) y la precisión del método entre días fue 15,0 (n=9). Dichos valores son adecuados ya que se adoptó como criterio de aceptación que los CV de la precisión intradía e interdías no superaran el 15% (Huber L, 2010).

4.5.4.2.4) Recuperación

Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150 ppm de proteína de producto de soja. Los resultados obtenidos para los sistemas modelo fueron 330 y 154, respectivamente. Se calculó la recuperación del método, siendo la misma 106,3 %. Esta recuperación resultó apropiada ya que se consideran valores adecuados entre 70-130 % (Gatti M y Ferretti C, 2010).

4.5.4.3) Muestras comerciales analizadas con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado

Se analizaron ocho muestras comerciales de pastas secas con un kit comercial de R-Biopharm y con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado.

En la Tabla N° 32 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en pastas secas, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo desarrollado.

Muestras	R-Biopharm ppm proteína de soja	Enzimoimmunoensayo desarrollado ppm proteína de soja
F17	>20,0	<76
F18	>20,0	>420
F19	>20,0	367±55
F20	>20,0	>420
F21	14,3±1,1	<76
F22	9,7±1,4	<76
F23	<2,5	<76
F24	<2,5	<76

Tabla N° 32: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en pastas secas, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado.

En las muestras F23 y F24 no se detectó soja con ninguno de los dos métodos. En las muestras F18 y F20 los valores obtenidos son mayores al límite superior de la curva de calibración de cada método. En la muestra F19 con el enzimoimmunoensayo desarrollado se detectaron y cuantificaron proteínas de soja mientras que utilizando el kit de R-Biopharm se obtuvo un valor mayor al límite superior de la curva de calibración (>20 ppm de proteína de soja). En las muestras F17, F21 y F22 no se detectó soja con el enzimoimmunoensayo desarrollado y sí se detectó soja con el kit de R-Biopharm. Esto se debe a que la sensibilidad del enzimoimmunoensayo desarrollado es menor que la del kit comercial.

De acuerdo con estos resultados si una muestra presenta un resultado positivo con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado se puede confirmar la presencia de soja en dicha muestra. Sin embargo si el resultado obtenido resulta negativo (menor al límite de cuantificación de este método) es necesario confirmar el resultado mediante el análisis con un kit comercial de soja de adecuada sensibilidad.

5) CONCLUSIONES

5.1) Detección de proteínas lácteas en productos cárnicos

Para la detección de proteínas de **leche** trabajando con **sistemas modelo crudos** el límite de detección del Inmunoblotting fue de 1000 ppm de leche en polvo descremada en mezcla con carne con los dos solventes de extracción estudiados. Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE por medio del cual, si se utiliza ISO 55 ° + 2-ME, el límite de detección es 2000 ppm y no es posible detectar la presencia de proteínas de leche, ni siquiera en la mayor concentración analizada (5000 ppm), cuando se utiliza solución extractiva de proteínas totales.

Cuando se analizaron los sistemas modelo con la metodología ELISA utilizando los kits de R-Biopharm y Veratox-Neogen, ambos kits detectaron proteínas de leche a partir del sistema modelo de 10 ppm de leche en polvo descremada.

Para la detección de proteínas de **leche** trabajando con **sistemas modelo cocidos** el límite de detección del Inmunoblotting fue de 1000 ppm de leche en polvo descremada. Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE por medio del cual no fue posible detectar la presencia de proteínas de leche ni siquiera en la mayor concentración analizada (5000 ppm). Estos resultados corresponden a los sistemas modelo extraídos con solución extractiva de proteínas totales. No se utilizó el solvente ISO 55° +2ME, dado que cuando se analizaron sistemas modelo crudos de leche en polvo descremada en mezcla con carne, resultó más eficiente la extracción de proteínas totales.

Con la metodología ELISA, utilizando el kit de R-Biopharm, se detectaron proteínas de leche a partir del sistema modelo de 10 ppm de leche en polvo descremada y utilizando el kit Veratox-Neogen, se detectaron proteínas de leche a partir del sistema modelo de 100 ppm de leche en polvo descremada.

Si se comparan los resultados obtenidos en los sistemas modelo crudos con los obtenidos en los sistemas modelo cocidos Inmunoblotting presenta igual sensibilidad, 1000 ppm de leche en polvo. SDS-PAGE no permite detectar la presencia de proteínas de leche ni siquiera en la mayor concentración analizada (5000 ppm) en ambos sistemas modelo.

Con respecto a los kits comerciales R-Biopharm y Veratox-Neogen presentaron igual sensibilidad en sistemas modelos crudos (10 ppm de leche en polvo descremada). R-Biopharm resultó más sensible que Veratox-Neogen en sistemas modelo cocidos; 10 ppm y 100 ppm de leche descremada en polvo, respectivamente. Además utilizando el kit Veratox-Neogen los resultados de los sistemas modelo crudos fueron siempre mayores con respecto a los sistemas modelo cocidos. Estas diferencias no se observaron utilizando el kit de R-Biopharm, ya que con este se obtuvieron resultados similares en sistemas modelo con y sin tratamiento térmico. Los valores obtenidos resultaron muy alejados de los valores reales con ambos kits tanto en sistemas modelo crudos como cocidos.

Para la detección de proteínas de **suero lácteo** trabajando con **sistemas modelo crudos** el límite de detección del Inmunoblotting fue de 1000 ppm de suero lácteo en mezcla con carne.

Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE (2000 ppm de suero lácteo).

Cuando se analizaron los sistemas modelo con la metodología ELISA se observó que utilizando los kits de R-Biopharm y Veratox-Neogen, se detectaron proteínas de leche a partir del sistema modelo de 10 ppm de suero lácteo. Dado que la materia prima proteica agregada en los sistemas modelo fue suero lácteo, no se puede determinar si la cuantificación de los kits es correcta, ya que los mismos expresan sus resultados como leche en polvo descremada (Veratox-Neogen) y proteína de leche en polvo descremada (R-Biopharm).

Para la detección de proteínas de **suero lácteo** trabajando con **sistemas modelo cocidos** el límite de detección del Inmunoblotting fue de 1000 ppm de suero lácteo. Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE (2000 ppm de leche en polvo descremada).

La metodología ELISA utilizando los kits de R-Biopharm y Veratox-Neogen detectó proteínas de leche a partir del sistema modelo de 10 ppm de suero lácteo. Como se mencionó anteriormente no se puede determinar si la cuantificación de los kits es correcta.

Por lo tanto SDS-PAGE e Inmunoblotting presentan igual sensibilidad tanto en sistemas modelo crudos como cocidos (2000 ppm y 1000 ppm de suero lácteo, respectivamente). Con respecto a los kits comerciales R-Biopharm y Veratox-Neogen, también presentan la misma sensibilidad en sistemas modelo con y sin tratamiento térmico (10 ppm de suero lácteo).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de muestras provistas por la industria y muestras comerciales se observa que SDS-PAGE e Inmunoblotting permitieron la detección de proteínas lácteas en las muestras que declaraban leche en polvo descremada o suero lácteo en su lista de ingredientes. Estas metodologías permiten determinar la presencia de caseínas y/o β lactoglobulina. También ambas metodologías permitieron la detección de proteínas lácteas (β lactoglobulina) en una muestra que no declaraba ingredientes lácteos. Todos los kits de ELISA comerciales utilizados presentaron resultados positivos en dichas muestras.

En varias muestras que no declaraban proteínas lácteas en su lista de ingredientes todas las metodologías presentaron resultados negativos.

En tres muestras que no declaraban proteínas lácteas en su lista de ingredientes se obtuvieron resultados positivos con uno o varios de los kits comerciales utilizados.

Con estos resultados se corrobora que existen en el mercado muestras comerciales que contienen materias primas lácteas en su composición y que las mismas no se encuentran declaradas en la lista de ingredientes. Dicha presencia de proteínas lácteas puede deberse a que las mismas fueron agregadas como ingredientes (muestra en que β lactoglobulina fue detectada por todos los métodos incluyendo SDS-PAGE) o bien por existir un contacto cruzado (muestras en que las proteínas lácteas fueron detectadas con distintos kits de ELISA).

Cabe aclarar que las metodologías SDS-PAGE e Inmunoblotting permiten identificar qué tipo de ingrediente lácteo está presente en el alimento y por lo tanto permiten confirmar la presencia de suero lácteo, caseínas o caseinatos o bien, leche o mezcla de suero lácteo y caseínas o caseinatos. Con respecto a los kits de ELISA para determinar el origen de la proteína láctea con

la cual se produjo el contacto cruzado, se debería recurrir a un kit de β lactoglobulina y otro de caseína. Si uno utiliza el kit de leche total el resultado va a ser positivo independientemente del origen del producto lácteo que ocasionó el contacto cruzado.

5.2) Detección de proteínas de soja en productos cárnicos

Para la detección de proteínas de soja trabajando con **sistemas modelo crudos** el límite de detección del Inmunoblotting fue de 100 ppm de producto de soja en mezcla con carne. Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE (3000 ppm de producto de soja en mezcla con carne).

Cuando se analizaron estos sistemas modelo con la metodología ELISA utilizando el kit de R-Biopharm se detectaron proteínas de soja a partir del sistema modelo de 5 ppm de producto de soja, utilizando el kit de Romer se detectaron a partir de 100 ppm de producto de soja y utilizando el kit Veratox-Neogen se detectaron a partir de 250 ppm de producto de soja. En conclusión de los métodos empleados el más sensible resultó ser el kit de R-Biopharm.

Para la detección de proteínas de **soja** trabajando con **sistemas modelo cocidos** el límite de detección del Inmunoblotting fue de 100 ppm de producto de soja. Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE por medio del cual no fue posible detectar la presencia de proteínas de soja ni siquiera en la mayor concentración analizada (2000 ppm).

La metodología ELISA utilizando el kit de R-Biopharm detectó proteínas de soja a partir del sistema modelo de 10 ppm de producto de soja, el kit de ELISA Romer detectó a partir de 50 ppm de producto de soja y el ELISA Veratox-Neogen detectó a partir de 250 ppm de producto de soja en sistemas modelo cocidos. En conclusión de los métodos empleados el más sensible resultó ser el kit de R-Biopharm.

Si se comparan los resultados obtenidos en los sistemas modelo crudos con los obtenidos en los sistemas modelo cocidos Inmunoblotting resultó mucho más sensible que SDS-PAGE ya que detectó soja a partir del sistema modelo de 100 ppm de producto de soja en ambos sistemas modelo. Con respecto a los kits comerciales R-Biopharm presentó mayor sensibilidad en sistemas modelos crudos con respecto a cocidos. Romer presentó menor sensibilidad en sistemas modelos crudos con respecto a cocidos. Veratox-Neogen presentó igual sensibilidad en sistemas modelos crudos y cocidos pero esta sensibilidad es mucho menor que la presentada por los otros dos kits comerciales.

Los kits comerciales además de tener diferente sensibilidad presentaron diferente comportamiento frente a los sistemas modelo crudos y cocidos en cuanto a las cantidades de proteínas de soja cuantificadas. Con los kit Veratox-Neogen y R-Biopharm en los sistemas modelo crudos las cantidades de soja cuantificadas resultaron mayores que en los sistemas modelo cocidos. Con el kit de Romer en los sistemas modelo crudos las cantidades de soja cuantificadas resultaron menores que en los sistemas modelo cocidos. Además los valores obtenidos resultaron muy alejados de los valores reales en particular con los kits Veratox-Neogen para ambos sistemas modelo y con R-Biopharm para los sistemas modelo cocidos.

Cabe aclarar que este análisis no se puede realizar con los resultados del kit Romer dado la forma en que dicho kit expresa sus resultados finales.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de muestras provistas por la industria y muestras comerciales se observa que SDS-PAGE e Inmunoblotting permitieron la detección de soja en las muestras que declaraban algún producto de soja en su lista de ingredientes. Estas metodologías además permitieron corroborar la ausencia de soja en otra muestra que declaraba aislado de soja en su lista de ingredientes y la presencia de soja en una muestra que no la declaraba. Inmunoblotting además permitió la detección de soja en tres muestras que no declaraban soja y que presentaron resultado negativo con SDS-PAGE, esto se debe a su mayor sensibilidad. Los kits comerciales de ELISA confirmaron los resultados hallados por Inmunoblotting. Con el kit Alert-Neogen no se detectó soja en las muestras que presentaron resultados negativos con Inmunoblotting y SDS-PAGE. Sí permitió la detección de soja en las muestras que contenían soja en su composición. Sin embargo el bajo resultado obtenido en una de las muestras analizadas permite corroborar las dificultades que los kits de Neogen presentan para la cuantificación de proteínas de soja en esta matriz alimentaria. Cabe aclarar que dicho kit es producido de la misma manera que el kit Veratox-Neogen, la única diferencia es que no presenta curva de calibración sino controles positivos.

Con estos resultados se corrobora que existen en el mercado muestras comerciales que contienen soja en su composición y que la misma no se encuentra declarada en la lista de ingredientes. Dicha presencia de soja puede deberse a que la misma fue agregada como ingrediente (muestras en que soja fue detectada por todos los métodos incluyendo SDS-PAGE) o bien por existir un contacto cruzado (muestras en que soja fue detectada por Inmunoblotting y kits de ELISA pero no por SDS-PAGE).

El enzimoinmunoensayo competitivo desarrollado presentó un rango de trabajo de 9–280 ppm de proteína de soja con una adecuada linealidad ($R^2=0,988$). Entre los parámetros de validación el límite de detección fue 9,0 ppm de proteína de soja, el límite de cuantificación fue 18,0 ppm de proteína de soja, la precisión en el día fue 7,8 (n=3) y entre días fue 12,7 (n=9). Si bien la recuperación obtenida no fue adecuada, posiblemente por interferencia de la matriz cárnica ya sea en la extracción de las proteínas de soja y/o en la detección de dichas proteínas, esto es similar a lo que ocurre con algunos kits de ELISA comerciales que también presentan valores muy inferiores a los esperados en los sistemas modelo cárnicos analizados. El análisis de algunas muestras comerciales con esta metodología y con un kit comercial de ELISA permitió verificar que si una muestra presenta un resultado positivo con el enzimoimmunoensayo competitivo no resulta necesario recurrir a un kit comercial de ELISA ya que la muestra contiene soja. Sin embargo un resultado negativo con el enzimoimmunoensayo competitivo, dada su menor sensibilidad, requiere de una confirmación mediante el análisis con un kit comercial de soja de adecuada sensibilidad.

5.3) Detección de proteínas de huevo en productos cárnicos

Para la detección de proteínas de huevo trabajando con **sistemas modelo crudos** el límite de detección del Inmunoblotting fue de 100 ppm de clara de huevo en mezcla con carne. Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE por medio del cual

no fue posible detectar la presencia de proteínas de huevo ni siquiera en la mayor concentración analizada (2000 ppm).

Cuando se analizaron los sistemas modelo con la metodología ELISA se observó que utilizando el kit de R-Biopharm, se detectaron proteínas de huevo a partir del sistema modelo de 0,5 ppm de clara de huevo.

Para la detección de proteínas de **huevo** trabajando con **sistemas modelo cocidos** el límite de detección del Inmunoblotting fue de 500 ppm de clara de huevo. Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE por medio del cual no fue posible detectar la presencia de proteínas de huevo ni siquiera en la mayor concentración analizada (2000 ppm).

La metodología ELISA utilizando el kit de R-Biopharm detectó proteínas de huevo a partir del sistema modelo de 10 ppm de clara de huevo.

Si se comparan los resultados obtenidos en los sistemas modelo crudos con los obtenidos en los sistemas modelo cocidos Inmunoblotting resultó más sensible que SDS-PAGE ya que detectó clara de huevo a partir del sistema modelo de 100 ppm en sistemas modelo crudos y 500 ppm en sistemas modelo cocidos. SDS-PAGE no detectó la presencia de clara de huevo en la mayor concentración analizada en ambos sistemas modelo.

Con respecto al kit comercial de R-Biopharm el mismo presentó una excelente sensibilidad en los sistemas modelo crudos (0,5 ppm de clara de huevo). En los sistemas modelos cocidos también presentó una buena sensibilidad (10 ppm de clara de huevo) pero no tan alta como en los sistemas modelo crudos. Sin embargo los valores cuantitativos obtenidos tanto en los sistemas modelo crudos como cocidos resultaron muy alejados de los valores reales.

Con respecto a las muestras comerciales en una muestra, que no declaraba ningún derivado de huevo, tanto Inmunoblotting como el kit comercial de ELISA presentaron resultados negativos. En las otras cuatro muestras, que no declaraban ningún derivado de huevo, se observó que solo una presentó resultado negativo en el Inmunoblotting y positivo con el kit de ELISA. Las otras tres presentaron resultados positivos con ambos métodos. En la muestra que declaraba clara de huevo ambos métodos presentaron resultados positivos.

Con estos resultados se corrobora que existen muestras comerciales que contienen proteínas de huevo no declaradas. Sin embargo, en estas muestras en particular, no es posible confirmar si las mismas fueron agregadas como ingredientes o bien si se trató de un contacto cruzado.

Para la detección de proteínas de huevo en productos cárnicos se puede utilizar Inmunoblotting como método de screening y en caso de obtener un resultado negativo se debe recurrir a un método más sensible (kit comercial de ELISA) para asegurar la ausencia de huevo por encima del límite de detección del método.

5.4) Detección de proteínas de huevo en productos farináceos

Para la detección de proteínas de **huevo** trabajando con sistemas modelo de **pastas secas** ni SDS-PAGE ni Inmunoblotting detectan huevo ni siquiera en la mayor concentración analizada (1000 ppm de huevo entero en polvo).

Con la metodología ELISA se observa que los tres kits utilizados (Veratox-Neogen, R-Biopharm y Romer) detectan huevo a partir del sistema modelo de 5 ppm de huevo entero en polvo. Las concentraciones obtenidas con los tres kits en los sistemas modelo se encuentran en el orden de los valores reales.

En las muestras provistas por la industria se observó que tanto con el kit de R-Biopharm como con el kit Veratox-Neogen los productos elaborados en línea cercana a elaboración de pastas con huevo presentaron concentraciones de huevo por debajo del límite de detección de cada kit. Los productos elaborados con bajo porcentaje de reproceso con huevo presentaron muy bajas concentraciones de huevo en polvo. Los productos elaborados con alto porcentaje de reproceso con huevo presentaron mayores concentraciones de huevo en polvo. Sin embargo se observó que en las muestras en las que se cuantificó huevo utilizando ambos kits los resultados fueron diferentes.

Por lo tanto como conclusión de acuerdo con los resultados obtenidos, fue posible detectar la presencia de alérgenos de huevo en muestras que contienen bajo o alto porcentaje de reproceso con huevo. El uso de productos molidos, que pudieron haberse elaborado con huevo, sólo se debería destinar a la elaboración de productos en los que se declare la presencia del alérgeno huevo.

En las muestras comerciales analizadas, que presentan en sus respectivos rótulos frases de advertencia sobre la posible presencia de huevo, cinco de ellas presentaron concentraciones de huevo por debajo o igual al límite de cuantificación de cada kit. En otras cuatro muestras se detectó huevo en polvo utilizando el kit de R-Biopharm y el kit Veratox-Neogen.

El análisis de la posible declaración de huevo o bien del correcto uso de las frases de advertencia, considerando los valores obtenidos con los diferentes kits y la legislación japonesa o el sistema VITAL 2.0, demuestra que es muy difícil poder concluir que tipo de declaración se debe realizar. Esto se debe a que según el criterio considerado las conclusiones son diferentes. A esto se suma que al ser distintos los resultados obtenidos con los diferentes kits también se llega a conclusiones diferentes según el resultado considerado.

Esta situación constituye un desafío para los organismos de control para definir valores umbrales. Claramente son numerosas las dificultades que existen para poder establecerlos para cada uno de los alérgenos en cuestión.

El enzimoinmunoensayo competitivo desarrollado presentó un rango de trabajo de 20–630 ppm de proteína de huevo con una adecuada linealidad ($R^2=0,9564$). Entre los parámetros de validación el límite de detección fue 23,0 ppm de proteína de huevo, el límite de cuantificación fue 45,0 ppm de proteína de huevo, la precisión en el día fue 2,7 (n=3) y entre días fue 6,8 (n=9). La recuperación obtenida en sistemas modelo fue 104,7 %.

El análisis de algunas muestras comerciales con esta metodología y con un kit comercial de ELISA nos permite concluir que si una muestra presenta un resultado positivo con el ensayo inmunoenzimático competitivo desarrollado se puede confirmar la presencia de huevo en dicha muestra. Sin embargo si el resultado obtenido resulta negativo (menor al límite de cuantificación de este método) es necesario confirmar el resultado con el análisis con un kit comercial de ELISA de adecuada sensibilidad.

5.5) Detección de proteínas de soja en productos farináceos

Para la detección de proteínas de soja trabajando con sistemas modelo de **pastas secas** el límite de detección del Inmunoblotting es de 250 ppm de producto de soja en mezcla con pasta secas. Esta metodología resulta más sensible que el método electroforético SDS-PAGE que no detecta soja en mezcla con pastas secas ni siquiera en la mayor concentración analizada (1000 ppm de producto de soja).

La metodología ELISA utilizando el kit de R-Biopharm detectó proteínas de soja a partir del sistema modelo de 2,5 ppm de producto de soja, el kit de ELISA Veratox- Neogen detectó proteínas de soja a partir de 20 ppm de producto de soja en sistemas modelo. Por lo tanto el kit de R-Biopharm resultó el más sensible.

Con respecto a la cuantificación de cada uno de los kits, en los sistemas modelo que presentaron resultados positivos y cuantificables de soja, los valores resultaron muy alejados de los valores reales. En el caso del kit R-Biopharm se observó una sobrecuantificación de soja mientras que con el kit Veratox-Neogen los valores obtenidos fueron inferiores a los reales.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las muestras provistas por la industria y en las muestras comerciales es posible verificar la existencia de contacto cruzado no solo en fideos sino también en otros productos farináceos.

Cuando se analizan los resultados obtenidos según se considere la legislación japonesa o el sistema VITAL 2.0 en algunos casos resultaría necesario declarar soja según la legislación japonesa y no resultaría necesario incluir una frase de advertencia según VITAL 2.0.

Con estos resultados nuevamente se verifica las dificultades a las que se enfrentan los organismos de control para poder definir valores umbrales. Sin embargo es un tema pendiente y las autoridades regulatorias deberán definir valores umbrales o bien niveles de acción que permitan a los elaboradores de alimentos utilizar algún criterio para la correcta declaración de los alimentos alergénicos en los rótulos.

El hallazgo de muestras a base de cereales contaminadas con soja, constituye un desafío para la industria de alimentos que deberá resolver esta situación. Deberán extremar las medidas de control para evitar la presencia de soja en estos alimentos o bien, si esto no fuera posible, deberán utilizar una frase de advertencia dirigida a la población que presenta alergia a las proteínas de soja.

El ensayo inmunoenzimático competitivo desarrollado presentó un rango de trabajo de 15 ppm-420 ppm de proteína de soja en pastas secas, con una adecuada linealidad ($R^2=0,988$). Entre los parámetros de validación el límite de detección fue 47,0 ppm de proteína de soja, el límite de

cuantificación fue 76,0 ppm de proteína de soja, la precisión en el día fue 12,7 (n=3) y entre días fue 15,0 (n=9). La recuperación obtenida en sistemas modelo fue 106,3 %

El análisis de algunas muestras comerciales con esta metodología y con un kit comercial de ELISA nos permite concluir que si una muestra presenta un resultado positivo con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado se puede confirmar la presencia de soja en dicha muestra. Sin embargo si el resultado obtenido resulta negativo (menor al límite de cuantificación de este método) es necesario confirmar el resultado con el análisis con un kit comercial de ELISA de adecuada sensibilidad.

5.6) Conclusiones generales

En el análisis de **productos cárnicos** si se deben detectar **proteínas lácteas** presentes en baja concentración se puede utilizar Inmunoblotting como método de screening. El Inmunoblotting permitiría determinar la presencia de caseínas y/o β lactoglobulina, por lo tanto podríamos determinar si la muestra contiene caseínas o caseinatos; suero lácteo; o bien leche o mezcla de suero lácteo con caseínas o caseinatos. Cuando el Inmunoblotting resulte negativo se debería confirmar con un método más sensible (kit comercial de ELISA) para asegurar la ausencia de alérgenos de leche por encima del límite de detección del método.

En el caso en que se quiera detectar proteínas de **soja** en baja concentración (contacto cruzado) en **productos cárnicos**, dado el bajo costo del enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado, este se podría utilizar como método de screening. Este método presenta dos ventajas con respecto al inmunoblotting, es más sensible y además permite obtener resultados cuantitativos. Si con el enzimoimmunoensayo desarrollado el resultado es positivo se puede confirmar la presencia de soja, si el resultado es negativo se debería confirmar con un kit comercial de ELISA para soja de adecuada sensibilidad para asegurar la ausencia de proteína de soja con el nivel de detección del kit.

Si se quiere detectar proteínas de **huevo** en baja concentración en **productos cárnicos**, se puede utilizar Inmunoblotting. Si este método resulta positivo se puede confirmar la presencia de proteínas de huevo. Si resulta negativo se debería confirmar con un método más sensible (kit comercial de ELISA) para asegurar la ausencia de alérgenos de huevo por encima del límite de detección del método.

Tanto para la detección de proteínas de leche como la de proteínas de huevo es posible adaptar el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado para el análisis de soja en productos cárnicos, utilizando antisuero policlonal específico de leche o de huevo, respectivamente. Mediante un adecuado proceso de validación se deberá establecer el desempeño de cada uno de ellos en el análisis de productos cárnicos.

Para la detección de muy bajas concentraciones de **huevo** en **pastas secas** se descarta el uso de SDS-PAGE e Inmunoblotting. En esta matriz y para este alérgeno se podría utilizar el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado como método de screening ya que como se mencionó anteriormente, resulta menos costoso que los kits comerciales. Si el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado presenta un resultado positivo la muestra contiene huevo, pero en el caso de que este enzimoimmunoensayo no detecte la presencia de

huevo se debe recurrir a un kit comercial de ELISA. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede utilizar cualquiera de los tres kits comerciales (R-Biopharm, Veratox-Neogen y Romer) ya que todos presentaron un comportamiento similar al analizar los sistemas modelo de pastas secas con huevo entero en polvo.

En el análisis de **productos farináceos** para la detección de muy bajas concentraciones de **soja** se descarta el uso de SDS-PAGE ya que este método no detectó soja ni siquiera en la mayor concentración analizada (1000 ppm). Si se sospecha que las proteínas alergénicas de soja pueden estar presentes por contacto cruzado resultaría útil realizar el ensayo inmunoenzimático competitivo desarrollado como método de screening. Este método es más sensible que el inmunoblotting y además permite obtener resultados cuantitativos. Si con el ensayo inmunoenzimático desarrollado el resultado es positivo se puede confirmar la presencia de soja, pero si el resultado es negativo se debe confirmar con un kit comercial de ELISA de adecuada sensibilidad para asegurar la ausencia de soja con el nivel de detección del kit.

En el caso de los kits comerciales de ELISA, para la detección de diferentes alérgenos debe tenerse en cuenta el desempeño de cada kit para cada alérgeno y para cada matriz en particular. Se ha comprobado que para que un kit de ELISA sea eficiente en la detección de alérgenos en alimentos, no solo depende de la capacidad del buffer de extracción para extraer las proteínas de interés de la matriz en la que se encuentran, sino también en la habilidad de los anticuerpos de unirse al antígeno de interés. Esta unión antígeno anticuerpo va a depender de las características de la matriz en cuanto a su composición y en cuanto a si ha sufrido o no tratamiento térmico. Además los resultados cuantitativos obtenidos se deben considerar solo como orientativos y no como valores absolutos ya que difieren de los valores reales.

Con respecto a los ensayos inmunoenzimáticos desarrollados en este trabajo de tesis se considera que se podrían modificar diferentes aspectos relacionados al anticuerpo primario a utilizar con el fin de que los mismos resulten más eficientes. Uno de ellos, que ha sido estudiado por otros investigadores, es utilizar anticuerpos primarios obtenidos a partir de conejos inmunizados con una materia prima tratada con SDS y ME. De acuerdo con trabajos realizados en Japón esto permite mejorar notablemente la performance de los ensayos inmunoenzimáticos particularmente para el análisis de muestras tratadas térmicamente. También se podría tener en cuenta la combinación con anticuerpos monoclonales. Varios investigadores plantearon que los anticuerpos policlonales a diferencia de los monoclonales, además de detectar diferentes proteínas alergénicas, dada su elevada capacidad de reconocer diferentes epítopes, pueden detectar un amplio espectro de proteínas alergénicas modificadas por tratamientos térmicos. Sin embargo dada la elevada especificidad de los anticuerpos monoclonales, una opción para mejorar los ensayos inmunoenzimáticos competitivos desarrollados sería utilizar una combinación de anticuerpos monoclonales con anticuerpos policlonales obtenidos en conejos inmunizados con materias primas con y sin tratamiento térmico tratadas con SDS y ME. De este modo se obtendría un ensayo inmunoenzimático altamente específico y adecuadamente sensible.

El análisis de los diferentes resultados permite concluir que el método a utilizar para la detección de los diferentes alérgenos en los alimentos, depende del alérgeno que se quiere detectar y/o cuantificar, de la matriz del alimento que contiene al alérgeno y del tratamiento que haya sufrido el alimento. Por lo tanto para cada alérgeno y para cada matriz en particular resulta

necesario realizar un estudio de las diferentes metodologías disponibles para establecer los alcances de cada una de ellas y determinar cuáles son las que resultan más adecuadas en cada caso en particular.

6) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acta N° 84 CONAL. 2014. ANEXO I.

Disponible en: http://www.conal.gob.ar/actas/Acta_84_Anexo01.pdf. Acceso: Febrero 2016.

Acta N° 102 CONAL. 2014. Disponible en:

http://www.conal.gob.ar/actas/Acta_102_AnexoI.pdf. Acceso: Febrero 2016.

Acta N° 103 CONAL. 2014. Disponible en:

http://www.conal.gob.ar/actas/Acta_103_AnexoI.pdf. Acceso: Febrero 2016.

Akiyama H, Imai T, Ebisawa M. 2011. Capítulo 4: Japan Food Allergen Labeling Regulation- History and Evaluation, en Taylor S. Adv Food Nutr Res. Academic Press Vol. 62, Burlington, USA.

Baumgartner S. 2010. Capítulo 18: Milk Allergen Detection, en Popping B, Diaz Amigo C, Hoenicke K, Molecular Biological and immunological techniques and applications for food chemists. John Wiley & Sons, Inc., Canada.

Benhamou A, Schächli M, Belli D, Eigenmann P. 2009. An overview of cow's milk allergy in children. Swiss Med Wkly. 139(21-22):300-307.

Besler M, Steinhart H, Paschke A. 2001. Stability of food allergens and allergenicity of processed food. J cromatogr B: Biomed Sci Appl.756 (1-2): 207-228.

Box G, Hunter W, Stuart Hunter J. 1999. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Editorial Reverté S.A., México D.F.

Boye J, L'Hocine L, Rajamohamed S. 2010. Processing foods without soybean ingredients. Capítulo 13 en Boye J, Godefroy S, Allergen Management in the food industry. John Wiley & Sons, Inc., Canada.

Careri M, Elviri L, Maffini M, Mangia A, Mucchino C, Terenghi M. 2008. Determination of peanut allergens in cereal-chocolate-based snacks: metal-tag inductively coupled plasma mass spectrometry immunoassay versus liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 22(6):807-811

Cattapan R, Cellerino K, Binaghi M, Cinalli M, Cetrangolo M, Hostench M, Alvarez M, López M y López L. 2013. Detección de presencia de soja por contaminación cruzada en alimentos comerciales por método real time PCR y métodos de ELISA. Aliment Latinoam. 303:48-53.

Chassaigne H; Nørgaard J, Van Hengel A. 2007. Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). *J Agric Food Chem.* 55: 4461-4473.

CODEX, Codex Stan 1-1985. 2010. Disponible en:
www.fao.org/input/download/standards/32/CXS_001s.pdf. Acceso: Marzo 2016.

Código Alimentario Argentino, Capítulo V. 2016. Artículos: 220 al 246 - Normas para la Rotulación y Publicidad de los Alimentos. Actualizado al 6/2013. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/capitulo_v.pdf. Acceso: Febrero 2016.

Código Alimentario Argentino, Capítulo VI. 2016. Artículos 247 al 519 - Alimentos cárneos y afines. Actualizado 10/2014. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/webanmat/codigoa/Capitulo_VI_Carneos_actualiz_2007-08.pdf. Acceso: Febrero 2016.

Código Alimentario Argentino, Capítulo IX. 2016. Artículo 713 -Alimentos Farináceos-Cereales, harinas y derivados. Actualizado al 10/2014. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_IX.pdf. Acceso: Febrero 2016.

Código Alimentario Argentino, Capítulo XIX. 2016. Artículos: 1407 al 1412 - Harinas, Concentrados, Aislados y Derivados Proteínicos. Actualizado al 9/2010. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XIX.pdf. Acceso: Febrero 2016.

Curciarello R. 2010. Análisis de la alergenicidad de componentes proteicos de soja que presentan reactividad cruzada con caseínas bovinas. Tesis Doctoral. LISIN y CIDCA Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Diaz Amigo C. 2010a. Towards a Comprehensive Validation of ELISA Kits for Food Allergens. Case 2- Milk. *Food Analytical Methods.* 3: 351-356.

Diaz Amigo C. 2010b. Towards a Comprehensive Validation of ELISA Kits for Food Allergens. Case 1- Egg. *Food Analytical Methods.* 3: 344-350.

Diaz Amigo C. 2010c. Capítulo 12: Antibody-Based Detection Methods: From Theory to Practice, en Popping B, Diaz-Amigo C, Hoenicke K, *Molecular Biological and immunological techniques and applications for food chemists.* John Wiley & Sons, Inc., Canada.

Diaz Amigo C y Popping B. 2010. Analytical Testing as a Tool for the Enforcement of future Regulatory Thresholds for Food Allergens. *Journal of AOAC International.* 93(2): 434-441.

Directiva 2007/68/CE. 2007. Disponible en:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:310:0011:0014:ES:PDF>. Acceso: Febrero 2016.

FALCPA. 2006. Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM179394.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

Garcia E, Llorente M, Hernando A, Kieffer R, Wieser H, Mendez E. 2005. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 17(5):529–539.

García Pérez H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG.* 1(2):31-41. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.pdf . Acceso: Marzo 2016.

Gatti M y Ferretti C. 2010. Capítulo 17: Soy Allergen Detection, en Popping B, Diaz Amigo C, Hoenicke K, *Molecular Biological and immunological techniques and applications for food chemists.* John Wiley & Sons, Inc., Canada.

Gell P y Coombs R. 1963. *Clinical Aspects of Immunology.* 1st ed. Blackwell Scientific Publications, Philadelphia.

Giese J. 1994. Proteins as ingredientes: Types, functions, applications. *Food Technol.* 48(10): 49-60.

Godefroy S y Popping B. 2010. Capítulo14: International Regulatory Environment for Food Allergen Labeling, en Popping B, Diaz Amigo C, Hoenicke K, *Molecular Biological and immunological techniques and applications for food chemists.* John Wiley & Sons, Inc., Canada.

Heick J, Fischer M, Popping B. 2011. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by chromatography mass spectrometry. *J chromatogr A.* 1218 (7):938–943.

Hoffmann E y Stroobantohn V. 2007. *Mass spectrometry: principles and applications.* 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England.

Holzhauser T, Stephan O, Vieths S. 2006. Capítulo 7: Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods, en Koppelman S, Hefle S, *Detecting allergens in food.* Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England.

Huber L. 2010. *Validation of Analytical Methods.* Agilent Technologies, Germany.

Jiménez C y León D. 2009. Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *VITAE.* 16 (1): 144-154.

Kneepkens C y Meijer Y. 2009. Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy. *Eur J Pediatr.* 168(8): 891-896.

Laemmli U. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lehrer S, Ayuso R, Reese G. 2002. Current Understanding of Food Allergens. *Ann N.Y. Acad Sci*. 964: 69-85.

Lezcano E. 2011. Alimentos Argentinos. Productos batidos. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/farinaceos/Productos/ProductosBatidos_2011_08Ago.pdf. Acceso: Marzo 2016.

López L, Sánchez S, Valencia M. 1996. Identificación de proteínas presentes en cereales para desayuno por electroforesis. *Rev Chil Nutr*. 24(2): 140-150.

López L y Valencia M. 1999. Identificación de proteínas presentes en materias primas proteicas y en alimentos procesados, mediante SDS-PAGE. *Rev Int Inf Tecnol*. 10(2).

López L. 2000. Separación, identificación y cuantificación de proteínas en alimentos procesados. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

López L y Valencia M. 2000. Identificación de proteínas en alimentos: utilización de SDS-PAGE como método de screening. *ALIMENTARIA Tecnol Hig alim*. 317: 83 – 88.

López L y Valencia M. 2001a. Detección de proteínas extrínsecas en productos cárnicos comerciales por SDS-PAGE. *Rev Chil Nutr*. 28 (3): 447-456.

López L y Valencia M. 2001b. Identificación de proteínas por SDS-PAGE en alimentos farináceos: nivel de detección en sistemas modelo. *ALIMENTARIA Tecnol Hig alim*. 326: 89-102.

López L, Samillán Becerra S, Valencia M. 2005. Detección y cuantificación de *triticum aestivum* L. (trigo pan) en fideos comerciales de *triticum durum* Desf. (trigo candeal) por SDS-PAGE. *ALIMENTARIA Tecnol Hig alim*. AO 363(4): 76-83.

López L, Greco C, Ronayne de Ferrer P, Valencia M. 2006. Identificación de proteínas extrínsecas en jamones cocidos por SDS-PAGE: Nivel de detección en sistemas modelo. *ALAN*. 56 (3): 282-287.

López L, Binaghi M, Greco C, Mambrín M, Cellerino K, Valencia M. 2010. Salazones y chacinados embutidos secos: detección por electroforesis de especies cárnicas y de proteínas extrínsecas agregadas. *DIAETA*. 28 (131): 7-13.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265–275.

MERCOSUR/SGT N° 3/ACTA N° 04/15. 2015. LVII Reunión ordinaria del subgrupo de trabajo N°3 “Reglamentos técnicos y evaluación de la conformidad”. Disponible en: http://www.puntofocal.gov.ar/doc/lvii_ac_04-15_acta.pdf. Acceso: Marzo 2016.

Mohammed I, Mullett W, Lai E, Yeung J. 2001. Is biosensor a viable method for food allergen detection. *Anal Chim Acta*. 444(1):97-102.

Neogen ELISA Alert® for Soy. 2009. Disponible en: <http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/A-Soy.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

Neogen Veratox® for Egg Allergen. 2013. Disponible en: <http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/V-Egg.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

Neogen Veratox® for Total milk allergen. 2011. Disponible en: <http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/V-TotalMilk.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

Neogen Veratox® quantitative Soy Allergen test. 2014. Disponible en: <http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/V-Soy.pdf>. Acceso Febrero 2016.

Normativa Canadá. 2012. Regulations Amending the Food and Drug Regulations (1220 - Enhanced Labelling for Food Allergen and Gluten Sources and Added Sulphites). Disponible en: <http://gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2011/2011-02-16/html/sor-dors28-eng.html>. Acceso: Marzo 2016.

Olivera Carrión M. 1988. Separación de proteínas alimenticias por electroforesis: Estudio de los cambios inducidos por el procesado, identificación de especies y detección de proteínas en mezclas. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Olivera Carrión M y Valencia M. 1990a. Detección y cuantificación de soja en productos cárnicos por electroforesis. I. Estudio en sistema modelo. *Rev Agroquím Tecnol Aliment*. 30 (4): 509-517.

Olivera Carrión M y Valencia M. 1990b. Detección y cuantificación de soja en productos cárnicos por electroforesis. II. Identificación e interferencias de otras proteínas diferentes de soja. *Rev Agroquím Tecnol Aliment*. 30(4): 518-528.

Olivera Carrión M y Valencia M. 1991. Estudio de la detección de proteínas de huevo y de plasma bovino en fideos al huevo por electroforesis. *Aliment Latinoam*. 182 (3): 38-41.

Ordenanza N°817.022.21, Suiza. 2005. Le Département fédéral de l'intérieur (DFI). Ordonnance du DFI sur l'étiquetage et la publicité des denrées alimentaires. Disponible en: <http://www.admin.ch/ch/f/rs/8/817.022.21.fr.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

Parker C, Khuda S, Pereira M, Ross M, Fu T, Fan X, Wu Y, Williams K, DeVries J, Pulvermacher B, Bedford B, Zhang X, Jackson L. 2015. Multi-allergen Quantitation and the

Impact of Thermal Treatment in Industry-Processed Baked Goods by ELISA and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Agric food chem.* 63: 10669-10680.

Pilolli R, Monaci L, Visconti A. 2013. Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. *TrAC.* 47:12-26.

Poms R, Klein C, Anklam E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam.* 21(1): 1-31.

Publicación FARRP/University of Nebraska. 2008. Componentes de un plan eficaz de control de alérgenos. Una estructura para los procesadores de alimentos. Disponible en: http://farrp.unl.edu/c/document_library/get_file?uuid=fcbf5345-2ad6-40d4-8dfc-d74b5a7f11bb&groupId=2103626. Acceso: Febrero 2016.

R-Biopharm RIDASCREEN® FAST β -Lactoglobulin. 2011. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4572/R4902-FAST-%C3%9F-Lactoglobulin-15-07-10.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein. 2012. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4487/R6402-FAST-Ei-Egg-12-04-24.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Casein. 2011. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4474/R4612-FAST-Casein-15-07-09.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Milk. 2011. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4551/R4652-FAST-Milk-15-07-09.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Soya. 2011. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/16632/R7102-FAST-Soya-15-09-09.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

Reglamento (UE) N°1169/2011. 2011. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&from=es>. Acceso: Febrero 2016.

Resolución Conjunta N° 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2010. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/Legislacion/Alimentos/Resolucion_Conjunta_57-2010-548-2010.pdf. Acceso: Marzo 2016.

Resolución Conjunta N° 106/2011 y N° 297/2011 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2011. Disponible en:

<http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/180000-184999/183157/norma.htm>.
Acceso: Febrero 2016

Resolución N° 395/03 SENASA. 2003. Disponible en:
<https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1033&io=5371>. Acceso: Marzo 2016.

Resolución RDC N°26. 2015. RESOLUÇÃO RDC N° 26, DE 02 DE JULHO DE 2015.
Disponible en:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9f73ec80490b18caa3e6bb05df47c43c/RDC+26_2015+Rotulagem+de+alimentos+alergenicos.pdf?MOD=AJPERES. Acceso: Febrero 2016.

Romer AgraQuant® Egg white Assay. 2011. Disponible en:
<http://shop.romerlabs.com/en/AgraQuant-ELISA/AgraQuant-Allergens/AgraQuant-ELISA-Egg-White>. Acceso: Febrero 2016.

Romer AgraQuant® Soy Assay. 2011. Disponible en:
<http://shop.romerlabs.com/en/AgraQuant-ELISA/AgraQuant-Allergens/AgraQuant-ELISA-Soy>. Acceso: Febrero 2016.

Rona R, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir S, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C. 2007. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *JACI*. 120(3): 638-646.

Rozenfeld P, Docena G, Añón M, Fossati C. 2002. Detection and identification of a soy protein component that cross reacts with caseins from cow milk. *Clin Exp Immunol*. 130(1): 49-58.

Sicherer S y Sampson H. 2009. Food allergy. *JACI*. 125(2): 116-125.

Taylor S. 2006. Capítulo 1: The nature of food allergy, en Koppelman S, Hefle S, Detecting allergens in food. Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*. 76(9): 4350-4354.

Turner A y Newman J. 1998. An introduction to biosensor, en Biosensor for Food Analysis. T. W. Gateshead, Ed. London, Athaenaem, U.K, London.

Van Herwijnen R y Baumgartner S. 2006. Capítulo 10: The Use of Lateral Flow Devices to Detect Food, en Koppelman S, Hefle S, Detecting allergens in food. Woodhead Publishing Limited. Abington, Cambridge, England.

Van Ree R, Akkerdaas J, Zuidmeer L. 2006. Capítulo 5: Immunoblotting in Allergen Detection, en Koppelman Stef J., Hefle Sue L., Detecting allergens in food. Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England.

VITAL 2.0. 2012. Food Industry Guide to the Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling (VITAL) Program version 2.0. Disponible en: <http://allergenbureau.net/wp-content/uploads/2013/11/VITAL-Guidance-document-15-May-2012.pdf>. Acceso: Febrero 2016.

Ward R. 2015. Capítulo 1: Introduction to food allergy, en Flanagan S, Handbook of Food Allergen Detection and Control. Woodhead Publishing, Cambridge, UK.

Watanabe Y, Aburatani K, Mizumurz T, Sakai M, Muraoka S, Mamegosi S, Honjoh T. 2005. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and reducing agent. J Immunol Methods. 300: 115-123.

Yeung J. 2006. Capítulo 6: Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) for detecting allergens in foods en Koppelman S, Hefle S, Detecting allergens in food. Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England.

Yman I, Eriksson A, Johansson M, Hellenas K. 2006. Food allergen detection with biosensor immunoassays. J AOAC Int. 89(3):856-861.

7) Resumen

En Argentina la declaración obligatoria de los alérgenos en las etiquetas de alimentos se encuentra en revisión. Existe la necesidad de disponer de metodologías que permitan la detección de proteínas alergénicas en los alimentos.

El objetivo de este estudio fue evaluar y desarrollar metodologías que permitan la detección de las proteínas alergénicas más importantes en nuestro país. Se trabajó en la detección de proteínas lácteas, de soja y de huevo en productos cárnicos y en la detección de proteínas de soja y de huevo en productos farináceos. Dentro de los objetivos particulares se propuso:

-Evaluar los alcances de SDS-PAGE y de Inmunoblotting para la detección de proteínas lácteas, de soja y de clara de huevo en sistemas modelo cárnicos crudos y cocidos de composición conocida con agregado de leche, suero lácteo, soja o clara de huevo.

-Analizar productos cárnicos comerciales crudos y cocidos con SDS-PAGE y con Inmunoblotting a los fines de detectar la posible presencia de proteínas de leche, de suero lácteo, de soja y de clara de huevo declaradas o no en los respectivos rótulos.

-Determinar con kits comerciales de ELISA la presencia de proteínas de leche, de suero lácteo, de soja y de clara de huevo en sistemas modelo crudos y cocidos de composición conocida con agregado de leche, de suero lácteo, de soja o clara de huevo y en productos cárnicos comerciales, con el fin de evaluar la correcta cuantificación de cada uno de ellos y de comparar los resultados hallados con los obtenidos por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

-Desarrollar un enzimoimmunoensayo competitivo utilizando antisueros policlonales de conejo específicos contra proteínas de soja para la detección y/o cuantificación de dichas proteínas en productos cárnicos crudos.

-Evaluar los alcances de SDS-PAGE e Inmunoblotting para la detección de proteína de huevo y de soja en sistemas modelo de fideos secos de composición conocida con agregado de huevo y de soja.

-Analizar muestras provistas por la industria de composición conocida y fideos secos comerciales con SDS-PAGE y con Inmunoblotting, a los fines de detectar la posible presencia de proteínas de huevo y de soja.

-Determinar con kits comerciales de ELISA la presencia de proteínas de huevo y de soja en sistemas modelo de fideos secos de composición conocida con agregado de huevo y de soja, en muestras provistas por la industria de composición conocida y en fideos secos comerciales, con el fin de evaluar la correcta cuantificación de cada uno de ellos y de comparar los resultados hallados con los obtenidos por SDS-PAGE e Inmunoblotting.

-Desarrollar enzimoimmunoensayos competitivos utilizando antisueros policlonales de conejo específicos contra proteínas de soja y de huevo para la detección y/o cuantificación de dichas proteínas en fideos secos comerciales.

Como principal solvente de extracción para SDS-PAGE, Inmunoblotting y los enzimoimmunoensayos competitivos desarrollados se utilizó solución extractiva de proteínas totales: buffer Tris-ClH 0,0625 M, pH: 6,8 con 3 % de SDS y 2 % de 2-mercaptoetanol. En el caso del Inmunoblotting y del enzimoimmunoensayo desarrollado se utilizaron antisueros policlonales obtenidos en conejos específicos de proteínas de soja o de huevo. Las determinaciones con los kits de ELISA comerciales se realizaron siguiendo el protocolo de trabajo de cada kit.

Los resultados obtenidos indican que en el análisis de productos cárnicos si se deben detectar proteínas lácteas presentes en baja concentración se puede utilizar Inmunoblotting como método de screening. Cuando el Inmunoblotting resulte negativo se debería confirmar con un método más sensible (kit comercial de ELISA) para asegurar la ausencia de alérgenos de leche por encima del límite de detección del método.

En el caso en que se quiera detectar proteínas de soja en baja concentración en productos cárnicos, dado el bajo costo del enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado, este se podría utilizar como método de screening. Si el resultado es positivo se puede confirmar la presencia de soja, si el resultado es negativo se debería confirmar con un kit comercial de ELISA de adecuada sensibilidad.

Si se quiere detectar proteínas de huevo en baja concentración en productos cárnicos, se puede utilizar Inmunoblotting como método de screening. Si este método resulta negativo se debería confirmar con un método más sensible (kit comercial de ELISA).

Para la detección de muy bajas concentraciones de huevo en pastas secas se podría utilizar el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado como método de screening. En el análisis de productos farináceos, si se sospecha que las proteínas alergénicas de soja pueden estar presentes por contacto cruzado, resultaría útil realizar el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado como método de screening. En ambos casos si con los enzimoimmunoensayos competitivos desarrollados los resultados son positivos se puede confirmar la presencia de proteínas de huevo o de soja, respectivamente. En cambio si los resultados son negativos, estos se deben confirmar con un kit comercial de ELISA de adecuada sensibilidad.

El análisis de los diferentes resultados permite concluir que el método a utilizar para la detección de los diferentes alérgenos en los alimentos, depende del alérgeno que se quiere detectar y/o cuantificar, de la matriz del alimento que contiene al alérgeno y del tratamiento que haya sufrido el alimento. Por lo tanto para cada alérgeno y para cada matriz en particular resulta necesario realizar un estudio de las diferentes metodologías disponibles para establecer los alcances de cada una de ellas y determinar cuáles son las que resultan más adecuadas en cada caso en particular.

TÍTULO DE LA TESIS: “Metodología de control para el análisis de alérgenos de leche, soja y huevo en productos cárnicos y farináceos”

TESISTA: LIC. KARINA CELLERINO

DIRECTORA DE TESIS: Prof. Dra. LAURA BEATRIZ LÓPEZ

RESUMEN

En Argentina la declaración obligatoria de los alérgenos en las etiquetas de alimentos se encuentra en revisión. Existe la necesidad de disponer de metodologías que permitan la detección de proteínas alergénicas en los alimentos. El objetivo de este estudio fue evaluar y desarrollar metodologías que permitan la detección de las proteínas alergénicas más importantes en nuestro país. Se estudiaron y desarrollaron diferentes metodologías para la detección de proteínas lácteas, de soja y de huevo en productos cárnicos y de soja y de huevo en productos farináceos. Se evaluaron SDS-PAGE, inmunoblotting, diferentes kits de ELISA comerciales y se desarrollaron y validaron enzimoimmunoensayos competitivos. De acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó que el método a utilizar depende del alérgeno que se quiere detectar y/o cuantificar, de la matriz del alimento que contiene al alérgeno y del tratamiento que fue aplicado al alimento. Algunos de los métodos estudiados resultaron útiles como métodos de screening (inmunoblotting o enzimoimmunoensayos competitivos). Resultados positivos de estos ensayos permiten confirmar la presencia de la sustancia alergénica, sin embargo cuando estos métodos presentan un resultado negativo es necesario recurrir a un kit de ELISA comercial de adecuada sensibilidad para el alérgeno y la matriz analizada.

"Control Methodology for the analysis of milk, soy and egg allergens in meat and farinaceous products"

AUTHOR: LIC. KARINA CELLERINO

THESIS DIRECTOR: Prof. Dra. LAURA BEATRIZ LÓPEZ

ABSTRACT

In Argentina the mandatory declaration of allergens in food labels is under revision. There is a need of methodologies that enables the detection of allergenic proteins in food. The aim of this study was to evaluate and develop methodologies that allow the detection of most important allergenic proteins in our country. Different methodologies for the detection of milk, soy and egg proteins in meat products and soy and egg protein in farinaceous products were evaluated and developed. SDS-PAGE, immunoblotting and different commercial ELISA kits were evaluated and competitive enzyme immunoassays were developed and validated. According to the results obtained it is concluded that the method to be used depends on the allergen to be detected and/or quantified, the food matrix and the treatment that was applied to the food. Some of the methods that have been studied are useful as screening methods (immunoblotting or competitive enzyme immunoassays). Positive results of these tests confirm the presence of the allergenic substance, however when the results of these methods are negative it is necessary to use a commercial ELISA kit of proper sensitivity for the allergen and the matrix to be analyzed.