

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ALERGÉNICAS EN ALIMENTOS ENVASADOS: ESTUDIO PRELIMINAR

CONTROL OF FOOD ALLERGENS IN PREPACKAGED FOODS: A PRELIMINARY STUDY

LAURA BEATRÍZ LÓPEZ *, MARÍA JULIETA BINAGHI *, KARINA CELLERINO *, MARIANA
CINALLI **, MERCEDES CETRÁNGOLO **, MARÍA CRISTINA LÓPEZ **.

*Cátedra de Bromatología. Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956. C.P. 1113. Buenos Aires. Argentina. FAX: 541149648243.
e-mail: laulop@ffybu.uba.ar

** Centro de Cereales y Oleaginosas, Instituto Nacional de Tecnología Industrial. General Paz 5445. San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

La declaración de alérgenos en los rótulos de alimentos envasados se encuentra en una etapa de transición. Algunas industrias declaran los alérgenos presentes como también recurren a frases de advertencia sobre la posible presencia de algunos de ellos. Treinta y seis alimentos envasados (incluyendo diferentes lotes de un mismo producto) fueron analizados para verificar la presencia o ausencia de algunos de los posibles alérgenos declarados y en caso de contenerlos establecer en qué concentración se encontraban. Los alimentos envasados analizados fueron: polvos para diferentes preparaciones; galletitas; obleas rellenas; caramelos; caldos y sopas deshidratados; palitos salados y fideos secos. Los alérgenos analizados fueron huevo, β lactoglobulina, caseínas y soja, utilizando kits de ELISA comerciales. Las proteínas de huevo fueron detectadas en 1 muestra que contenía 4.5 ppm de huevo en polvo; β lactoglobulina fue detectada en 10 muestras que contenían entre 0,2 y 32,8 ppm; caseína fue detectada en 7 muestras que contenían entre 0,8 y 17,2 ppm y proteínas de soja fueron detectadas en 16 muestras que contenían entre 2,4 y 27,11 ppm. Si bien en la mayoría de las muestras se detectaron algunos de los posibles alérgenos declarados en los rótulos, varios de los alérgenos declarados no fueron detectados. A nivel industrial sería importante realizar un control de los alérgenos que realmente pueden estar presentes y de aquellos que no lo están a los fines de incorporar en la declaración de alérgenos sólo los que podrían estar presentes. Esto resultaría de gran utilidad para las personas alérgicas que verían aumentada la oferta de alimentos que pueden consumir.

Palabras clave: alérgenos, ELISA, alimentos envasados, huevo, leche, soja.

English

Português

CONTROL OF FOOD ALLERGENS IN PREPACKAGED FOODS: A PRELIMINARY STUDY

SUMMARY

The declaration of the presence of allergens on the labels of prepackaged foods is in a transitional stage. Some manufacturers declare allergens and also use precautionary phrases related to the possible presence of some of them in their products. Thirty six prepackaged foods (including different batches of the same product) were analysed to

DETECÇÃO DE PROTEÍNAS ALERGÉNICAS EM ALIMENTOS EMBALADOS: ESTUDO PRELIMINAR.

RESUMO

A declaração de alérgenos nos rótulos de alimentos embalados se encontra em uma etapa de transição. Algumas indústrias declaram os alérgenos presentes como também recorrem a frases de advertência sobre a possível presença de alguns deles. Trinta e seis alimentos embalados (incluindo diferentes lotes do mesmo produ-

see whether the statements were truthful and which was the allergen concentration. The prepackaged foods analysed were: dry mixes for different preparations, cookies, crackers, candies, vegetable stock cubes, snacks and pasta. The analysed allergens were egg, β lactoglobulin, casein and soya, using Commercial ELISA kits. Egg was detected in one product (concentration 4.50 ppm of whole egg powder); β lactoglobulin was detected in 10 products (concentrations between 0.20 and 32.80 ppm); casein was detected in 7 products (concentration between 0.80 and 17.20 ppm); and soya proteins were detected in 16 products (concentrations between 2.40 and 27.11 ppm). Some declared allergens were detected in several samples, but others were not detected. It would be important that the industry controls those allergens that may or may not be present in their products, so that the label informs which allergens may actually be present. This would be very useful for allergic patients, who would see the supply of foods that they can consume increased.

Keywords: allergens, ELISA, prepackaged foods, egg, milk, soya.

to) foram analisados para verificar a presença ou ausência de alguns dos possíveis alérgenos declarados e se os mesmos estivessem presentes estabelecer qual a sua concentração. Os alimentos embalados analisados foram: pós para diferentes preparos; bolachas; bolachas recheias, balas, caldos e sopas desidratados, palitinhos salgados e pastas secas. Os alérgenos analisados foram ovo, β ετα-lactoglobulina, caseínas e soja, utilizando kits da ELISA comerciais.

Nas proteínas de ovo foram detectadas em 1 amostra que continha 4.5 ppm de ovo em pó; beta-lactoglobulina foi detectada em 10 amostras que continham entre 0,2 X 32,8 ppm; caseína foi detectada em 7 amostras que continham entre 0,8 e 17,2 ppm e proteínas de soja foram detectadas em 16 amostras que continham entre 2,4 e 27,11 ppm.

Ainda que na maioria das amostras tenham sido detectados alguns dos possíveis alérgenos declarados nos rótulos, vários dos alérgenos declarados não foram detectados. A nível industrial seria importante realizar um controle dos alérgenos que realmente possam estar presentes e daqueles que não estão com o objetivo de incorporar na declaração de alérgenos somente os que poderiam estar presentes. Isto seria de grande utilidade para as pessoas alérgicas que passariam a ter uma maior oferta de alimentos para o seu consumo.

Palavras-chave: alérgenos, ELISA, alimentos embalados, ovo, leite, soja.

INTRODUCCIÓN

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

Las alergias alimentarias constituyen un problema creciente en los países desarrollados y también en los países emergentes como el nuestro. En las últimas décadas, la prevalencia de las alergias a alimentos ha aumentado considerablemente, y este tema constituye un desafío tanto desde el punto de vista clínico como para la industria de alimentos.⁴

Si bien en nuestro país no existen estudios que permi-

tan determinar la incidencia de las alergias alimentarias, se calcula que el 6% de los niños menores de 3 años y el 3% de la población general padece una verdadera alergia alimentaria.

Existen 8 grupos de alimentos que son responsables del 90 % de las alergias alimentarias. Estos alimentos son: leche, huevo, soja, trigo, maní, frutos secos, pescado y mariscos.^{3,5,6}

Respecto de la reglamentación para la declaración de alérgenos en los rótulos de los alimentos, el Codex Alimentarius contempla la necesidad de declarar en el rótulo la presencia de los alimentos e ingredientes que causan hipersensibilidad, y existen legislaciones que exigen la declaración de alérgenos presentes en los alimentos en la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, Japón, Colombia y otros países.^{7,8,9,10,11,12,13}

En Argentina, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) 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 (ANMAT). El mismo se presentó a una consulta pública. En la reunión de CONAL realiza-

da 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 éstas, 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.¹⁴

En el documento aprobado se considera que: "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: Cereales que contienen gluten; Crustáceos y productos derivados; Huevos y productos de los huevos; Pescado y productos de la pesca; Maní, y productos derivados; Soja, y productos derivados; Lácteos y productos lácteos; Frutas secas; Dióxido de azufre y sulfitos; semillas de mostaza y derivados". Establece además que 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 con la lista antes mencionada. Además, establece que no se admite ninguna frase de advertencia que exprese o sugiera el posible o probable contenido de un alérgeno. Se otorga a las empresas un plazo de ciento ochenta (180) días desde su publicación en el Boletín Oficial a los efectos de su adecuación.¹⁴

La metodología utilizada internacionalmente para la detección de alérgenos en alimentos comprende: SDS-PAGE y/o IEF-PAGE *immunoblotting*; inmunodifusión doble (*Ouchterlony*); dot blot; métodos ELISA sándwich y ELISA competitivo con anticuerpos poli o monoclonales y PCR.^{3,4,15-23} A nivel internacional, hay desarrollados kits comerciales que, mediante ensayos (ELISA), permiten la detección / cuantificación de diferentes alérgenos: soja, huevo, β lactoglobulina, caseínas, gluten, maní, almendras, etcétera. También se comercializan *kits real time* PCR para la determinación de algunos alérgenos. Además se comercializan test inmunocromatográficos que permiten la detección rápida de alérgenos en las plantas industriales e incluso en los hogares.²⁴ Una importante limitación para el uso masivo de estos *kits* comerciales es su costo, ya que resulta muy elevado en nuestro país. A pesar de que aún la declaración de alérgenos no ha

entrado en vigencia completamente, se puede observar que muchos fabricantes de alimentos utilizan en el rotulado leyendas como Contiene ..., Contiene trazas de ..., Este producto se elabora en un equipo que procesa ..., entre otras leyendas.

El objetivo de este trabajo fue realizar un relevamiento de productos que contienen este tipo de leyendas y analizar con *kits* de ELISA comerciales diferentes productos para verificar la presencia o ausencia de los alérgenos de mayor importancia en nuestro medio (huevo, leche y soja) y, en caso de contenerlos, establecer en que concentración se encuentran.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Se realizó un relevamiento a través de la lectura de los rótulos de 30 productos comerciales que presentaban diferentes expresiones de declaración de alérgenos. En la figura 1 se resumen ejemplos de las leyendas utilizadas por la industria.

En el análisis de alimentos envasados en una primera etapa se analizaron 15 productos correspondientes a un único lote (Lote 1) de: polvo para preparar bizcochuelo; polvo para preparar postre sabor chocolate blanco; galletitas con salvado sin sal agregada; galletitas / crackers; caldo de verduras deshidratado; galletitas dulces sabor chocolate; galletitas con salvado; polvo para preparar gelatina; obleas con relleno sabor a limón con baño de repostería; sopa de gallina con fideos cabello de ángel- deshidratada; caramelos masticables frutales surtidos; palitos fritos con sabor a panceta; fideos secos fortificados con hierro, tirabuzón; fideos de sémola de trigo candeal, tirabuzón y pasta de sémola de trigo duro, origen Italia. En el cuadro 1 se presentan las denominaciones de venta y los ingredientes de los 15 productos analizados.

En una segunda etapa se analizaron otros 2 lotes de polvo para preparar bizcochuelo (Lotes 2 y 3), otros 3 lotes de galletitas con salvado, sin sal agregada (Lotes 2, 3 y 4) y otros 4 lotes de galletitas dulces sabor chocolate, de obleas con relleno sabor a limón con baño de repostería, de caramelos masticables frutales surtidos y de pasta de sémola de trigo duro, origen Italia (Lotes 2, 3, 4, y 5). En el cuadro 2 se presentan las denominaciones de los productos y los ingredientes de las muestras analizadas.

En total se analizaron 36 muestras comerciales en el período comprendido entre agosto de 2009 y septiembre de 2010.

Muestreo

Para los alimentos en polvo se realizó un muestreo de tipo estratificado (polvo para preparar bizcochuelo, polvo para preparar postre sabor chocolate blanco y polvo para preparar gelatina). En los productos que se expendían con varias unidades dentro de su envase

FIGURA N°1

Ejemplos de declaraciones de alérgenos presentes en los rótulos de alimentos comercializados en Argentina

original se efectuó un muestreo aleatorio (galletitas con salvado sin sal agregada; galletitas / crackers; caldo de verduras deshidratado; galletitas dulces sabor chocolate; galletitas con salvado; obleas con relleno sabor a limón con baño de repostería; caramelos masticables frutales surtidos; palitos fritos con sabor a panceta; fideos secos fortificados con hierro, tirabuzón; fideos de sémola de trigo candéal, tirabuzón y pasta de sémola de trigo duro, origen Italia). Se tomó la totalidad del contenido del paquete para su procesamiento en aquellas muestras donde el envase contenía material heterogéneo (sopa de gallina con fideos cabello de ángel- deshidratada).

Procesamiento de las muestras

La totalidad de las muestras fueron homogeneizadas en molino de cuchillas marca Retsch® modelo Grindomix GM200 hasta una granulometría de 35 mesh.

Método de enzimoimmunoensayo

Los alérgenos analizados fueron huevo, β lactoglobulina, caseína y soja. Los kits utilizados fueron RIDASCREEN® FAST Ei / *Egg Protein de r-biopharm* (Art N° R 6402), RIDASCREEN® β -Lactoglobulin de *r-biopharm* (Art N° R4901), RIDASCREEN® FAST casein de *r-biopharm* (Art N° R4602) y BLOKITS *Soya Allergen Assay Kit de Gen-Probe* (Cat N° 902112 J).

La extracción de cada uno de los alérgenos analizados así como el procedimiento del enzimoimmunoensayo,

se realizaron de acuerdo con los protocolos de trabajo de cada uno de los kits comerciales.²⁵⁻²⁸ Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

RESULTADOS

Como resultado del relevamiento de las posibles declaraciones de alérgenos y de frases de advertencia en diferentes productos comerciales se diseñó la figura 1 en la que constan diferentes ejemplos de declaraciones de alérgenos presentes en los rótulos de alimentos comercializados en nuestro país. Se pueden observar cuatro tipos de declaraciones, contiene . . . (con el listado de alérgenos presentes en la lista de ingredientes); contiene trazas de . . . (listado de alérgenos que no se encuentran en la lista de ingredientes); este producto se elabora en un equipo, línea o fábrica que procesa . . . (detalle de los alérgenos que comparten el equipo, línea o fábrica) y por último en la lista de ingredientes resaltados en negrita aquellos ingredientes que son alérgenos alimentarios.

A continuación, en una primera etapa, se seleccionaron 15 productos comerciales que presentaban diferentes leyendas referidas a declaración de alérgenos, para ser analizados en su contenido de cuatro alérgenos de importancia en nuestro medio. En el cuadro 1 se presentan las denominaciones de venta, la lista de ingredientes y los resultados obtenidos en el análisis de contenido de huevo, β lactoglobulina, caseína y soja de los 15 productos comerciales analizados (resultados correspondientes a un único lote por producto; Lote 1).

CUADRO N°1

Detección por ELISA de proteínas de huevo, lácteas y de soja en quince productos comerciales

Denominación de producto	Ingredientes	Declaración de alérgenos	ELISA huevo ppm	ELISA β lactoglobulina ppm	ELISA caseína ppm	ELISA Soja ppm
Polvo para preparar bizcochuelo	Harina, azúcar, aceite hidrogenado, almidón, sal, aromatizante/saborizante, leudantes químicos: INS 500ii y 541i, emulsionante INS 477.	Este producto se elabora en un equipo que procesa derivados de huevo, leche y soja . Contiene gluten	<0,50	<0,20	<0,50	5,00
Polvo para preparar postre sabor chocolate blanco	Azúcar, almidón, sal, gelificante carragenina, colorantes: tartrazina, amarillo ocaso y aromatizante	Contiene trazas de trigo, gluten, leche, soja , cebada, huevo , maní	<0,50	<0,20	<0,50	<0,30
Galletitas con Salvado, sin sal agregada	Harina enriquecida de trigo, aceite de girasol alto oleico, salvado de trigo (6%), jarabe de maíz/elote de alta fructosa, azúcar, fibra de avena, sal, leudantes químicos: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, emulsionante:	Contiene trigo, gluten, soja , trazas de almendras, huevo, leche y maní	<0,50	0,23	<0,12	10,65
Galletitas / crackers	Harina de trigo enriquecida, grasa bovina, sal, extracto de malta, jarabe de glucosa, levadura, emulsionante: lecitina de soja, aromatizante.	Contiene trigo, gluten, cebada, soja, trazas de almendras, huevo, leche, maní	<0,27	<0,20	<0,50	15,22
Caldo de verduras deshidratado	Sal, grasa vegetal, almidón de maíz, extracto de levadura, azúcar, perejil, apio, pimentón rojo, pimienta negra, puerro, resaltadores de sabor (glutamato monosódico e inosinato disódico), aromatizantes, colorantes (cúrcuma y caramelo), acidulantes (ácido cítrico)	Contiene gluten. Contiene soja. Contiene trazas de huevo, leche y mostaza.	<0,50	0,70	<0,12	<0,30
Galletitas dulces sabor chocolate	Harina enriquecida, azúcar, grasa bovina, cacao en polvo, jarabe de glucosa, sal, leudantes químicos: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, colorante caramelo (E 150d), emulsionante: lecitina de soja y aromatizante	Contiene trigo, gluten, soja, trazas de almendras, huevo, leche , maní y nuez	<0,27	<0,40	<0,80	5,25
Galletitas con salvado	Harina enriquecida de trigo, aceite de girasol alto oleico, jarabe de glucosa, salvado de maíz/elote (3%), salvado de trigo (2%), extracto de malta, sal, leudantes químicos: bicarbonato de amonio. bicarbonato de sodio: emulsionante: lecitina de soja, mejorador de harina: metabisulfito de sodio, aromatizante.	Contiene trigo, gluten, cebada, soja, trazas de huevo, leche, maní y sésamo	<0,27	<0,20	<0,50	4,20
Polvo para preparar gelatina	Azúcar, gelatina, sal, vitamina C, acidulante: INS 297, aromatizante/saborizante de frambuesa, edulcorante: INS 950 y 951, colorante INS: 123 y 132.	Sin declaración de alérgeno	<0,27	<0,20	<0,12	0,30
Obleas con relleno sabor a limón con baño de repostería	Azúcar, aceite vegetal, aceite vegetal hidrogenado, cacao en polvo, harina de trigo enriquecida, sal, emulsionante: lecitina de soja, polirricinoleato de poliglicerol, leudantes químicos: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, aromatizante natural: limón, aromatizante idéntico al natural: vainillina acidulantes: ácido cítrico.	Contiene Gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa leche , maní, almendras y avellanas.	---	12,90	17,20	<0,30
Sopa de gallina con fideos cabello de ángel deshidratada	Fideos cabellos de ángel (con harina enriquecida de trigo), sal, almidón de maíz, vegetales deshidratados (cebolla, zanahoria, perejil y puerro), carne y grasa de gallina (con antioxidante BHT), azúcar, extracto de levadura, resaltadores de sabor (INS 621, INS 631, INS 627), especia (cúrcuma), colorante (caramelo), aromatizante.	Puede contener trazas de apio, leche y huevo .	---	1,00	9,90	--

LAURA BEATRÍZ LÓPEZ, MARÍA JULIETA BINAGHI, KARINA CELLERINO, MARIANA CINALLI, MERCEDES CETRÁNGOLO, MARÍA CRISTINA LÓPEZ

CUADRO N°1

Detección por ELISA de proteínas de huevo, lácteos y de soja en quince productos comerciales

Denominación de producto	Ingredientes	Declaración de alergen	ELISA huevo ppm	ELISA β lactoglobulina ppm	ELISA caseína ppm	ELISA Soja ppm
Caramelos masticables frutales surtidos	Glucosa, azúcar, aceite vegetal hidrogenado, maltodextrina, ACI (ac cítrico), EMU (lecitina), aromatizantes y colorantes: rojo allura, amarillo ocaso y azul brillante.	INFORMACION PARA ALERGICOS: producido en una fábrica que utiliza productos lácteos, de soja , de maní y almendras	—	<0,20	<0,12	<1,25
Palitos fritos con sabor a panceta	Harina de trigo enriquecida según ley 25630, aceite vegetal, almidón de maíz, sal, levadura, leudante químico: INS500ii, saborizante (sal, resaltador de sabor INS621)	Este producto puede contener trazas de productos lácteos	—	<0,20	<0,50	—
Fideos secos fortificados con hierro, tirabuzón	Harina de trigo enriquecida según ley 25630	Este producto se elabora en un equipo que procesa pastas al huevo . Contiene gluten.	<0,50	—	—	—
Fideos de sémola de trigo candeal, tirabuzón	Sémola de trigo candeal	Este producto se elabora en un equipo que procesa pastas al huevo. Contiene gluten.	<0,50	—	—	—
Pasta de sémola de trigo duro, origen Italia	Sémola de trigo duro	Sin declaración de alergen	4,50	—	—	—

Se puede observar en el cuadro 1 que muchos de los productos analizados presentan valores de alergen huevo, β lactoglobulina, caseína y soja por debajo de los límites de detección (LD) o de cuantificación (LC) de cada uno de los kits utilizados (huevo LD: 0,27 ppm / LC: 0,5 ppm -como huevo entero en polvo; β lactoglobulina LD: 0,2 ppm ; caseína LD: 0,12 ppm / LC: 0,5 ppm y soja: LD:0,3 ppm LC: 1,25ppm -como proteína de soja). Esto se observa en algunas muestras que declaran "contiene trazas de . . . (los alergen estudiados)" como por ejemplo el polvo para preparar postre sabor chocolate blanco (contiene trazas de soja y huevo) y galletitas con salvado (contiene trazas de huevo y leche). Otra muestra presentó también concentraciones por debajo del límite de detección para soja y sin embargo declaraba contiene soja. Esto se observa en la muestra caldo de verdura deshidratado. En este caso en particular no se entiende por qué declara soja ya que ninguno de los ingredientes es soja o proviene de soja.

En otras muestras analizadas se hallaron valores de los alergen mencionados por encima de los límites de cuantificación de los respectivos kits.

En una segunda etapa se procedió a analizar diferentes lotes de algunos de los productos comerciales con la finalidad de verificar si había diferente contenido de alergen entre los diferentes lotes. En el cuadro 2 se presentan las denominaciones de venta, la lista de ingredientes y los resultados obtenidos en el análisis de contenido de huevo, β lactoglobulina, caseína y soja de diferentes lotes de polvo para preparar bizcochuelo (Lotes 1, 2 y 3: L1, L2 y L3, respectivamente); de galletitas con salvado, sin sal agregada (Lotes 1, 2, 3 y

4: L1, L2, L3 y L4, respectivamente); de galletitas dulces sabor chocolate (Lotes 1, 2, 3, 4 y 5: L1, L2, L3, L4 y L5, respectivamente); de obleas con relleno sabor a limón con baño de repostería (Lotes 1, 2, 3, 4 y 5: L1, L2, L3, L4 y L5, respectivamente); de caramelos masticables frutales surtidos (Lotes 1, 2, 3, 4 y 5: L1, L2, L3, L4 y L5, respectivamente) y de pasta de sémola de trigo duro, origen Italia (Lotes 1, 2, 3, 4 y 5: L1, L2, L3, L4 y L5, respectivamente).

Se observa que en general las muestras que contenían alergen por debajo de los límites de detección o de cuantificación se mantuvieron en esos valores, esto se observa por ejemplo para huevo, β lactoglobulina y caseína en polvo para preparar bizcochuelo; en galletitas con salvado, sin sal agregada; en galletitas dulces sabor chocolate y en caramelos masticables frutales surtidos. Las proteínas lácteas caseínas encontradas en las obleas con relleno sabor a limón con baño de repostería oscilaron en los 5 lotes analizados en valores desde 9,67 hasta 17,20 ppm. Mientras que el alergen β lactoglobulina en este mismo producto presentó una amplia variación en los 5 lotes analizados (valores desde 0,90 hasta 32,80 ppm).

En el caso del alergen soja se observó que, en las muestras que tenían valores superiores al límite de cuantificación, analizando diferentes lotes, se obtuvieron valores en el mismo orden de magnitud en galletitas con salvado, sin sal agregada y en galletitas dulces sabor chocolate. En el polvo para preparar bizcochuelo se observó una mayor fluctuación en los valores obtenidos (entre 5,00 y 27,11 ppm).

En las pastas italianas sólo se detectó un valor cuantificable de huevo en un lote, mientras que en los otros

CUADRO N°2

Detección por ELISA de proteínas de huevo, lácteas y de soja en diferentes lotes de seis productos comerciales

Denominación de producto	Ingredientes	Declaración de alérgenos	ELISA huevo ppm	ELISA β lactoglobulina ppm	ELISA caseína ppm	ELISA Soja ppm
Polvo para preparar bizcochuelo	Harina, azúcar, aceite hidrogenado, almidón, sal, aromatizante/saborizante, leudantes químicos: INS 500ii y 541i, emulsionante INS 477.	Este producto se elabora en un equipo que procesa derivados de huevo, leche y soja. Contiene gluten.	L1 < 0,50 L2 < 0,27 L3 < 0,27	L1 < 0,20 L2 < 0,20 L3 < 0,20	L1 < 0,50 L2 < 0,50 L3 < 0,50	L1 5,00 L2 18,25 L3 27,11
Galletitas con Salvado, sin sal agregada	Harina de trigo enriquecida, aceite de girasol alto oleico, salvado de trigo (6%), jarabe de maíz/elote de alta fructosa, azúcar, fibra de avena, sal, leudantes químicos: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, emulsionante: <i>lecitina de soja</i> .	Contiene trigo, gluten, avena, soja, trazas de almendras, cebada, huevo, leche y maní	L1 < 0,50 L2 < 0,27 L3 < 0,27 L4 < 0,27	L1 0,23 L2 < 0,20 L3 < 0,20 L4 < 0,20	L1 < 0,12 L2 < 0,50 L3 < 0,50 L4 < 0,50	L1 10,65 L2 6,58 L3 7,19 L4 10,86
Galletitas dulces sabor chocolate	Harina enriquecida, azúcar, grasa bovina, cacao en polvo, jarabe de glucosa, sal, leudantes químicos: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, colorante caramelo (E 150d), emulsionante: <i>lecitina de soja</i> y aromatizante.	Contiene trigo, gluten, soja, trazas de almendras, huevo, leche , maní y nuez.	L1 < 0,27 L2 < 0,27 L3 < 0,27 L4 < 0,50 L5 < 0,27	L1 0,40 L2 < 0,20 L3 < 0,20 L4 < 0,20 L5 < 0,20	L1 0,80 L2 < 0,50 L3 < 0,50 L4 < 0,50 L5 < 0,50	L1 5,25 L2 7,10 L3 4,26 L4 3,13 L5 2,40
Obleas con relleno sabor a limón con baño de repostería	Azúcar, aceite vegetal, aceite vegetal hidrogenado, cacao en polvo, harina de trigo enriquecida, sal, emulsionante: <i>lecitina de soja</i> , polirricinoleato de poliglicerol, leudantes químicos: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, aromatizante natural: limón, aromatizante idéntico al natural: vainillina acidulantes: ácido cítrico	Contiene Gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa leche , maní, almendras y avellanas.	---	L1 12,90 L2 1,50 L3 32,80 L4 0,90 L5 18,90	L1 17,20 L2 12,00 L3 14,00 L4 9,67 L5 15,10	L1 < 0,30 L2 < 0,30 L3 < 0,30 L4 2,75 L5 < 0,30
Caramelos masticables frutales surtidos	Glucosa, azúcar, aceite vegetal hidrogenado, maltodextrina, ACI (ac cítrico), EMU (<i>lecitina</i>), aromatizantes y colorantes: rojo allura, amarillo ocazo y azul brillante.	INFORMACION PARA ALERGICOS: producido en una fábrica que utiliza productos lácteos, de soja , de maní y almendras	---	L1 < 0,20 L2 < 0,20 L3 < 0,20 L4 < 0,20 L5 < 0,20	L1 < 0,12 L2 < 0,50 L3 < 0,50 L4 < 0,50 L5 < 0,50	L1 < 1,25 L2 < 0,30 L3 < 1,25 L4 3,55 L5 < 0,30
Pasta de sémola de trigo duro, origen Italia	Sémola de trigo duro	Sin declaración de alérgenos	L1 4,50 L2 < 0,27 L3 < 0,27 L4 < 0,27 L5 < 0,27	---	---	---

cuatro lotes los valores hallados estuvieron por debajo del límite de detección.

Del análisis de todos los resultados obtenidos (36 muestras en total) se observa que las proteínas de huevo fueron detectadas en 1 muestra que contenía 4,5 ppm de huevo en polvo; βlactoglobulina fue detectada en 10 muestras que contenían entre 0,2 y 32,8 ppm; caseína fue detectada en 7 muestras que contenían entre 0,8 y 17,2 ppm y proteínas de soja fueron detectadas en 16 muestras que contenían entre 2,40 y 27,11 ppm (13 de estas muestras declaraban *lecitina de soja*). En 8 muestras que declaraban *lecitina de soja* el resultado fue: < 1,25 ppm o < 0,30 ppm. De acuerdo con estos resultados la declaración de *lecitina de soja* como ingrediente no asegura la presencia de alérgeno soja en el alimento, sin embargo la tendencia internacional es declarar la presencia de alérgeno soja cuando se utiliza *lecitina de soja* en la elaboración de un alimento.

Conociendo la concentración de alérgeno presente en el alimento y considerando la porción de alimento de acuerdo con las tablas de porciones del capítulo V del CAA se calculó el aporte de alérgenos en una porción de alimento.¹ Así, por ejemplo, una porción de fideos secos de 80 g aportaría aproximadamente 360 µg de huevo en polvo o 176 µg de proteínas de huevo en

polvo; 1 oblea rellena de 22 gramos aportaría aproximadamente 722 µg de βlactoglobulina y 378 µg de caseínas (se consideró para el cálculo por porción la mayor concentración determinada de βlactoglobulina y de caseína); 1 porción de galletitas crackers de 30 g aportaría aproximadamente 457 µg de proteínas de soja y 1 porción de polvo para preparar bizcochuelo de 40 g aportaría aproximadamente 1084 µg de proteínas de soja (se consideró para el cálculo por porción la mayor concentración de soja determinada).

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, muchas de las muestras analizadas presentan concentraciones de los alérgenos analizados por debajo de los límites de detección o de cuantificación de los kits. Sin embargo, es posible realizar la cuantificación de algunos de los alérgenos en algunas de las muestras comerciales analizadas. De acuerdo con los resultados en el análisis de diferentes lotes resultaría importante que las industrias realicen un control de alérgenos en diferentes lotes de producción a los fines de poder establecer si se produce o no contaminación cruzada en sus líneas de producción. Esto permitiría establecer si cuando se da una contaminación cruzada esta ocurre de manera constante o sólo esporádicamente lo que contribuiría

en la búsqueda de soluciones para eliminar la contaminación cruzada o bien sería de utilidad para definir de qué manera se va a rotular ese alérgeno.

Respecto de los valores de alérgenos encontrados en las muestras analizadas debemos mencionar que a nivel internacional no existe consenso en cuanto a la mínima concentración por debajo de la cual un alimento puede ser considerado libre de alérgeno. Sólo Japón establece en su legislación un límite de 10 ppm para alérgenos (10 µg de proteínas / g de alimento) considerando que si el alérgeno se encuentra en una concentración > 10 ppm se debe declarar como ingrediente y que si es < 10 ppm no se declara.^{29,30} Esto lo establece para los alérgenos de mayor importancia en ese país que son huevo, leche, trigo, maní y trigo sarraceno. En Australia y en Nueva Zelanda, el sistema VITAL (*Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling*) fija tres niveles de acción para la declaración de la presencia de alérgenos en los rótulos de los alimentos considerando mg de sustancia alérgica / Kg de alimento (ppm). En el nivel más bajo (nivel 1) considera que no es necesario declarar la presencia del alérgeno, en el nivel intermedio (nivel 2) se debe rotular puede estar presente y en el nivel más alto (nivel 3) al alérgeno se lo debe rotular como ingrediente. Los alérgenos huevo, leche y soja no deben ser declarados si se encuentran en concentraciones inferiores a 2 ppm, 5 ppm y 10 ppm, respectivamente. Se deben rotular "puede estar presente" si se encuentran en concentraciones entre 2 – 20 ppm para huevo, entre 5 – 50 ppm para leche y entre 10 – 100 ppm para soja. Se los debe rotular como ingredientes si superan 20 ppm para huevo, 50 ppm para leche y 100 ppm para soja.^{31,32}

Más recientemente, la comunidad europea ha elaborado una iniciativa para mejorar y armonizar la declaración de alérgenos en alimentos. Este sistema EU-VITAL también propone tres niveles de acción equivalentes a los de VITAL pero difiere en las concentraciones para los distintos alérgenos. Para el alérgeno huevo, el nivel 1 es < 20 ppm, el nivel 2 entre 20 – 200 ppm y el nivel 3 > 200ppm. Para el alérgeno leche el nivel 1 es <50ppm, el nivel 2 entre 50 – 500 ppm y el nivel 3 > 500ppm. Por último, para el alérgeno soja el nivel 1 es < 25ppm, el nivel 2 es entre 25 - 250 ppm y el nivel 3 es > 250 ppm.³³

Por otro lado, otro posible valor umbral podría ser el límite de cuantificación del kit comercial empleado. Este, en la mayoría de los casos, está muy por debajo de los valores umbrales que se manejan internacionalmente por lo que consideramos que no sería una buena opción fijar este valor como umbral.

En las muestras comerciales analizadas en el presente trabajo se obtuvieron diferentes concentraciones de alérgenos en los diferentes alimentos, así por ejemplo se detectaron 4,5 ppm expresado como huevo en

polvo en fideos secos; valores que oscilaron entre 0,2 y 32,8 ppm de βlactoglobulina, concentraciones de caseína entre 0,8 y 17,2 ppm y valores de proteínas de soja entre 2,40 y 27,11 ppm. Según la legislación o el sistema internacional que consideremos algunas de las muestras pueden ser consideradas libres de alérgenos en un caso y en otro no. Por ejemplo en las galletitas/crackers (15,22 ppm de soja) según la legislación japonesa se debe rotular soja como ingrediente, mientras que para el sistema VITAL se debería rotular puede estar presente y para el sistema EU- VITAL no sería necesario declarar la presencia de soja como alérgeno. Con el cálculo del aporte de alérgenos a través de una porción de alimento encontramos que diferentes alimentos estarían aportando a los posibles pacientes alérgicos concentraciones de alérgenos del orden de 100 a 1000 µg de proteínas alérgicas por porción. No existe un consenso general en cuanto a la dosis umbral que un paciente alérgico puede recibir del alérgeno en cuestión. A nivel internacional diferentes autores plantean distintos valores de LOAELs (nivel mínimo de efecto adverso observable) en mg de proteína total, así por ejemplo para leche los valores oscilan entre 0,36 y 3,6; para huevo entre 0,13 y 1 y para soja entre 88 y 522.^{32,33}

Los valores hallados en las muestras analizadas estarían en el orden de los µg (en general valores inferiores a 1 mg), sin embargo debido a que los umbrales en humanos no están aún definidos, el efecto de estas cantidades de alérgeno producido sobre las personas alérgicas va a depender del grado de sensibilidad de cada una de ellas.

Por todo lo expuesto resulta necesario que las autoridades nacionales establezcan valores umbrales para cada uno de los alérgenos de declaración obligatoria de manera de que la industria y los organismos de control puedan recurrir a ellos a los fines de determinar si en el rótulo del alimento se debe declarar o no un determinado alérgeno.

CONCLUSIONES

Si bien en la mayoría de las muestras se detectaron algunos de los posibles alérgenos declarados en los rótulos, varios de los alérgenos declarados no fueron detectados.

A nivel industrial, sería importante realizar un adecuado control de los alérgenos que realmente pueden estar presentes y de aquellos que no lo están a los fines de incorporar en la declaración de alérgenos sólo los que podrían estar presentes. Esto resultaría de gran utilidad para las personas alérgicas que verían aumentada la oferta de alimentos que pueden consumir. Para esto resulta imprescindible contar con valores umbrales para cada uno de los alérgenos, establecidos por la autoridad sanitaria nacional.

Bibliografía

- 1- Código Alimentario Argentino, actualizado 2011. Disponible en : http://www.anmat.gov.ar/webanmat/codigoa/Capitulo_V_Rotulacion_actualiz%202008-05.pdf, visitada febrero 2011.
- 2- Taylor S. Nordlee J. Chemistry and detection of food allergens. *Food Technol.* 1995; 46 (5): 146-152.
- 3- Poms RE. Klein CL. Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants.* 2004; 21 (1): 1-31.
- 4- Besler M. Determination of allergens in foods. *Trends in analytical chemistry.* 2001; 20 (11): 662-672.
- 5- Tsuji H. Kimoto M. Natori Y. Allergens in major crops. *Nutrition Research.* 2001; 21: 925-934.
- 6- Lehrer SB. Ayuso R. Reese G. Current Understanding of Food Allergens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 964: 69-85.
- 7- Diario oficial de la Unión Europea, 2006. Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:368:0110:0111:ES:PDF>, visitada febrero 2011.
- 8- Diario oficial de la Unión Europea, 2007. Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/Notice.do?mode=dbl&lang=es&ihmlang=es&lng1=es,en&lng2=bg,cs,da,de,el,en,es,et,fi,fr,hu,it,lt,lv,mt,nl,pl,pt,ro,sk,sl,sv,&val=460213:cs&page=>, visitada febrero 2011.
- 9- US Food and Drugs Administration, 2004. Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004. Disponible en: <http://www.alergialimentaria.org/documentos/03.pdf>, visitada febrero 2011.
- 10- Regulations Amending the Food and Drug Regulations (1220 — Enhanced Labelling for Food Allergen and Gluten Sources and Added Sulphites), *Canadian Gazette*, 2011. Disponible en: <http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2011/2011-02-16/html/sor-dors28-eng.html>, visitada febrero 2011.
- 11- Foods Standard Australia y Nueva Zelanda, 2011. Disponible en: http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/Standard_1_2_3_Warning_Statements_v103.pdf, visitada febrero 2011.
- 12- Ministry of Health, Labour and Welfare, Food allergens, Japón. 2002. Disponible en: <http://www.mhlw.go.jp/english/index.html>, visitada febrero 2011.
- 13- Resolución Número 005109 DE 2005, Ministerio de la Protección Social, Colombia, 2005. Disponible en: http://www.invima.gov.co/Invima/normatividad/docs_alimentos/resolucion_005109_2005.htm, visitada febrero 2011.
- 14- Boletín Oficial, Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/Legislacion/Alimentos/Resolucion_Conjunta_57-2010-548-2010.pdf, visitada febrero 2011.
- 15- Chirido F. Añón MC. Fossati CA. Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food Agric. Immunol.* 1995; 7: 333-343.
- 16- Chirido F. Añón MC. Fossati CA. Desarrollo de un ELISA de alta detectabilidad y especificidad para la cuantificación de gliadinas en alimentos destinados a enfermos celíacos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 1996; XXX (4). 389-399.
- 17- Docena G. Fernandez R. Chirido F. Fossati C. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow milk. *Allergy.* 1996; 51 (6): 412-416.
- 18- Belitz H. Grosch W. Química de los Alimentos. 2ª Edición. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A. 1997.
- 19- González-Córdova A. Calderón de la Barca A. Cota M. Vallejo-Córdoba B. Detección inmunoquímica de la adulteración de chorizo de cerdo con proteína de soja. *Food Sci. Tech. Int.* 1998; 4: 257-262.
- 20- Rozenfeld P. Docena GH. Añón MC. Fossati CA. Detection and identification of a soy protein component that cross reacts with caseins from cow milk. *Clinical and Experimental Immunology.* 2002; 130 (1): 49-58.
- 21- Poms RE. Anklam E. Effects of Chemical, Physical, and Technological Processes on the Nature of Food Allergens. *Journal of AOAC International.* 2004; 87 (6): 1466 -1474.
- 22- Torp AM. Olesen E. Sten P. Stahl Skov U. Bindslev-Jensen LK. Poulsen C. Et al. Specific semi-quantitative detection of the soybean allergen Gly m Bd 30 K DNA by PCR. *Food Control.* 2006; 17 (1): 30-36.
- 23- Polenta G. Godefroy-Benrejeb S. Delahaut P. Dorcas W. Abbot M. Development of a Competitive ELISA for the detection of Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.)K. Koch) traces in food. *Food Analytical Methods.* 2010; 3 (4): 375-381.
- 24- Duxbury D. Testing for food allergens. *Food Technology.* 2006; 60 (1): 62- 64.
- 25- Ridascreen® FAST EI/egg protein. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of egg white proteins. Disponible en: http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=369&product_class_one=QWxsZXJnZW5z&pro

- [duct_class_two=RWdn&product_class_three=&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis&PHPSESSID=e3c7a7c36404842c89ee30064e1b882a](http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=273&product_class_one=QWxsZXJnZW5z&product_class_two=3y1MYWN0b2dsb2J1bGlu&product_class_three=&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis&PHPSESSID=e3c7a7c36404842c89ee30064e1b882a), visitada septiembre 2010.
- 26- RIDASCREEN® β -Lactoglobulin de r-biopharm. Enzyme immunoassay for analysis of β -lactoglobulin. Disponible en: http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=273&product_class_one=QWxsZXJnZW5z&product_class_two=3y1MYWN0b2dsb2J1bGlu&product_class_three=&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis&PHPSESSID=e3c7a7c36404842c89ee30064e1b882a, visitada septiembre 2010.
- 27- RIDASCREEN® FAST casein. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of casein. Disponible en: http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=1568&product_class_one=QWxsZXJnZW5z&product_class_two=Q2FzZWlu&product_class_three=&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis&PHPSESSID=e3c7a7c36404842c89ee30064e1b882a, visitada septiembre 2010.
- 28- BIODIAGNOSTICS Soya Allergen Assay Kit de Gen-Probe. Disponible en: <http://www.tepnelportal.com/TEPNEL/DistributorHome/tabid/131/ctl/Login/Default.aspx>, visitada septiembre 2010.
- 29- Consumer Affairs Agency, Government of Japan. Disponible en: <http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin26.pdf>, visitada febrero 2011.
- 30- EU VITAL, Models for allergen declaration. Initiative to improve and harmonize declaration of food allergens. Disponible en: <http://www.eu-vital.org/en/declaration.html>, visitada febrero 2011.
- 31- Allergen Bureau informing the food industry. VITAL Allergen Risk Assessment. 23/9/2008 Fiona Fleming. Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/28914325/VITAL-Allergen-Risk-Assessment>, visitada febrero de 2011.
- 32- Development of VITAL Allergen Actions Levels Grid Explanatory notes (Prepared by Dr Simon Brooke-Taylor) 12 June 2007 Disponible en : http://www.allergenbureau.net/downloads/vital/VITAL_Explanatory_Notes_12_06_07.pdf, visitada febrero 2011.
- 33- EU VITAL, action levels. Initiative to improve and harmonize declaration of food allergens. Disponible en: <http://www.eu-vital.org/en/actionlevels.html>, visitada febrero 2011.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por UBACyT B418, UBACyT 20020090100184 e INTI.
