



**Universidad
Zaragoza**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso 2012-2013

Desarrollo de una técnica de ELISA en placa, basada en la determinación de las proteínas alergénicas Ara h1 y Ara h2, y su optimización para la detección de cacahuete en chocolate

Autora: Elia Lucea Ojeda

Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza

Directora: Dra. M^a Dolores Pérez Cabrejas

Datos personales

Lucea Ojeda, Elia

17767079-Q

Paseo de la Ribera nº 6 8ºA

Teléfono: 685388258

Elia_zgz2001@hotmail.es

ÍNDICE

Resumen	4
Summary.....	5
Introducción.....	6
Objetivos.....	14
Materiales y Métodos	15
Resultados y discusión	21
Conclusiones.....	35
Conclusions	36
Identificación de las aportaciones que, en materia de aprendizaje, han supuesto la realización de esta asignatura	37
Evaluación de la asignatura y sugerencias de mejora	38
Bibliografía.....	39

Resumen

El cacahuete es un alimento que se consume entero, tostado o frito, o se usa como ingrediente en la elaboración de numerosos alimentos tales como chocolates, turrone, galletas, golosinas, etc. El cacahuete también es el causante de un 15-20% de las alergias alimentarias en los países europeos, que pueden tener consecuencias graves, ya que en un 20% de los casos da lugar a una reacción anafiláctica. El consumidor puede estar expuesto de forma inadvertida a los alérgenos del cacahuete cuando consume alimentos que han sufrido una contaminación cruzada durante su procesado. Por todo ello, es necesario disponer de técnicas específicas y sensibles para su detección en los alimentos. Es un hecho conocido que los taninos y otros polifenoles presentes en el chocolate enmascaran la detección de las proteínas alergénicas del cacahuete al interaccionar con las proteínas diana y/o con los anticuerpos usados en los inmunoensayos. En este trabajo, se ha estudiado el efecto que diferentes bloqueantes tales como leche en polvo, gelatina y polivinilpolipirrolidona, adicionados al medio de extracción en distintas proporciones, tienen en la detección de las proteínas alergénicas del cacahuete en muestras de chocolate. Para ello, previamente se han desarrollado técnicas de ELISA de tipo competitivo indirecto basadas en la determinación de las proteínas alergénicas Ara h1 y Ara h2, que han mostrado ser lineales en un rango de concentración entre 50 ng/ml y 10 µg/ml. Los resultados obtenidos indican que la adición de gelatina y de leche en polvo disminuye las interferencias producidas por el chocolate, obteniéndose los mejores resultados con porcentajes del 5% y del 1%, respectivamente. En esas condiciones, las técnicas de ELISA desarrolladas permiten detectar la adición de un 0,05% de cacahuete en chocolate, obteniéndose mayores diferencias de concentración entre las muestras con un menor contenido de cacahuete y el blanco al usar la gelatina como bloqueante.

Summary

Peanut is consumed raw, roasted or fried, or used as an ingredient in the preparation of many foods such as chocolates, candies, cookies, etc. Peanut is also responsible for 15-20% of food allergies in European countries, which may have serious consequences as around 20% of cases result in an anaphylactic reaction. The consumer may inadvertently be exposed to peanut allergens when consuming foods that have been cross-contaminated during processing. Therefore, it is necessary to develop sensitive and specific techniques to detect peanut in food. It is known that the tannins and other polyphenols present in chocolate could mask the target proteins and/or the antibodies used in immunoassays. In this work, we have studied the effect of different blocking agents such as milk powder, gelatin and polyvinylpolypyrrolidone, added to the extraction medium in different proportions, in the detection of allergenic peanut proteins in chocolate. For this purpose, previously we developed indirect competitive ELISA techniques based on the determination of the allergenic proteins Ara h1 and Ara h2, which have shown to be linear over a range of concentrations between 50 ng/ml and 10 µg/ml. Results obtained indicated that the addition of gelatin or milk powder to the extraction buffer decreases interferences of chocolate samples in the immunoassays, obtaining the best results when using percentages of 5% and 1%, respectively. Under those conditions, ELISA techniques developed could detect the addition of 0.05% peanut in chocolate, obtaining higher differences in the concentration between the sample with a lower content of peanut and the blank when using gelatin as the blocking agent.

INTRODUCCIÓN

1. Alergia alimentaria

La alergia alimentaria se define como el conjunto de reacciones adversas, de patogenia inmunológica comprobada, debidas a la ingesta, contacto o inhalación de alimentos (Bush y Hefle, 1996).

Las reacciones alérgicas a los alimentos se deben diferenciar de las reacciones de intolerancia y de las intoxicaciones. Estas dos últimas se caracterizan por ser dependientes de la dosis, es decir, a mayor cantidad de alimento ingerido, mayor es la intensidad de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, esta relación dosis-respuesta no existe en las reacciones alérgicas, en las que una cantidad muy pequeña, puede desencadenar una respuesta clínica severa. Además, las intoxicaciones pueden afectar a cualquier individuo si ingiere el alimento en cantidad suficiente. Sin embargo, las reacciones de alergia e intolerancia tras la ingestión de un alimento están exclusivamente relacionadas con las peculiaridades de cada individuo, de tal forma que esa misma dosis puede ser perfectamente tolerada por otro individuo (Esteban y Polanco, 2002).

La alergia alimentaria incluye las reacciones mediadas por IgE, en las que el individuo presenta un título alto de anticuerpos de la clase IgE frente al alimento y las reacciones no mediadas por IgE, en las que existe un aumento de anticuerpos específicos de otras clases de inmunoglobulinas, complejos inmunes o respuestas de inmunidad mediada por células. En algunos casos, puede darse una participación mixta, mediada por IgE y por células (Strobel *et al.*, 2001).

La reacción alérgica más conocida es la mediada por IgE, en la que estas inmunoglobulinas se fijan sobre la superficie de determinadas células, como mastocitos y basófilos. Cuando el alérgeno se une a las IgE fijadas a dichas células, se producen una serie de reacciones celulares que conducen a la liberación de sustancias activas, como la histamina, las prostaglandinas y los leucotrienos. La acción fundamental de estas sustancias tiene lugar a nivel de los vasos sanguíneos, la musculatura lisa y algunas glándulas, produciendo vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, espasmo de la musculatura lisa e hipersecreción glandular (Martín Esteban y Polanco, 2002).

En la actualidad, se estima que las alergias a alimentos afectan a un 3-4% de la población adulta y a un 7-8% de la infantil, por lo que están consideradas un serio problema de seguridad alimentaria (Sampson, 2004). Estas cifras equivalen a unos dos millones de individuos afectados en España, datos que ponen de manifiesto la

importancia del problema en nuestra sociedad actual. La prevalencia de las alergias alimentarias está experimentando un gran aumento en los últimos años, y se estima que lo hará aún más en las próximas décadas (Sicherer *et al.*, 2003). Este aumento se asocia en parte a los cambios en los hábitos alimentarios de la población y a la mayor complejidad de los ingredientes y de los procesos tecnológicos utilizados en la industria alimentaria (Monaci *et al.*, 2006).

En las alergias mediadas por IgE, la aparición de los síntomas clínicos suelen tener lugar tras una o dos horas de la ingesta del alimento, por lo que se denominan alergias de tipo inmediato. Los síntomas que suelen aparecer incluyen alteraciones de la piel, del tracto gastrointestinal y de las vías respiratorias. Los síntomas cutáneos más comunes son urticaria aguda, angiodema, o una erupción eritematosa pruriginosa. Los síntomas gastrointestinales incluyen vómitos, dolor abdominal y diarrea. Los síntomas respiratorios pueden afectar tanto a las vías respiratorias superiores como inferiores siendo el edema laríngeo y la tos repetitiva los más comunes. En los pacientes que presentan una elevada sensibilidad a los alimentos (1-2% de los individuos alérgicos), la alergia puede llegar a provocar una reacción anafiláctica, que sin un tratamiento sintomático adecuado, puede conducir a la muerte. Las alergias no mediadas por IgE suelen aparecer tras varias horas desde la ingesta del alimento y dan lugar a síntomas gastrointestinales como enteropatías, colitis y lesiones de la mucosa intestinal (Boussoii, 1999).

El diagnóstico de la alergia de tipo inmediato se puede realizar de dos maneras, mediante un diagnóstico clínico, que incluye un historial clínico y un ensayo de provocación, o mediante un diagnóstico patogénico determinando la presencia de IgE específicas para el alimento seleccionado (Esteban *et al.*, 1999).

El único tratamiento eficaz comprobado de la alergia alimentaria es evitar la ingesta del alimento sensibilizante, mediante una dieta de eliminación estricta. En las alergias a determinados alimentos, como la soja, la leche o los huevos, las dietas de eliminación seguidas durante uno o dos años, suelen conducir al desarrollo de una tolerancia clínica en aproximadamente un tercio de los casos. Sin embargo, en las alergias a los frutos secos, al pescado o al marisco, la intolerancia clínica suele persistir durante muchos años, o incluso, para siempre (Sampson y McCaskill, 1985; Bock y Atkins, 1990). En situaciones de riesgo, se utilizan fármacos, fundamentalmente

antihistamínicos, β -adrenérgicos y corticoesteroides, como tratamiento para paliar los síntomas, pero éstos nunca deben sustituir a las medidas preventivas (Taylor, 1986).

2. Alérgenos alimentarios

Los alimentos capaces de producir una alergia alimentaria ascienden a un número mayor de 160, si bien más del 95% de las reacciones alérgicas son producidas por ocho alimentos: huevo, cacahuete, leche, frutos secos, soja, pescados, mariscos y trigo (FAO, 1995).

Los alérgenos alimentarios son proteínas o glicoproteínas con un peso molecular entre 10 y 70 kDa. La mayoría de los alérgenos son estables al calor, en medio ácido y a la acción de las proteasas por lo que suelen ser resistentes al procesado habitual que se lleva a cabo en la industria alimentaria (Taylor y Lehrer, 1996).

Los alérgenos alimentarios pueden ser de origen vegetal o animal. La mayor parte de los alérgenos vegetales están incluidos en tres superfamilias; cupinas, prolaminas y papaínas y se encuentran en frutos secos, leguminosas y frutas, entre otras. Los alérgenos de origen animal pertenecen a un número más limitado de familias y se encuentran principalmente en pescados, crustáceos y moluscos, en el huevo y en la leche (Taylor y Lehrer, 1996).

En general, los alimentos suelen contener varias proteínas alergénicas y según su prevalencia se diferencian en alérgenos mayores, cuando un 50% o más de los pacientes alérgicos a ese alimento elaboran IgE específicas, y en alérgenos menores cuando menos del 50% de los pacientes alérgicos elaboran IgE específicas frente al mismo (King *et al.*, 1994).

La nomenclatura para denominar a los alérgenos incluye cuatro letras, correspondiendo las tres primeras al género y la cuarta a la especie, y un número que indica el orden en el que se ha identificado cada alérgeno dentro de una especie (Hoffman *et al.*, 1994).

La legislación actual sobre etiquetado de alimentos alergénicos tiene como finalidad obligar a mencionar en la etiqueta todos los ingredientes utilizados en su elaboración, y de forma concreta y sin excepción, de aquellos que provocan alergias e intolerancias y que constituyen un riesgo para la salud de las personas sensibilizadas. En el año 2003, se publicó la primera Directiva sobre alimentos alergénicos (Directiva

2003/89/CE del Parlamento y del Consejo Europeos (Real Decreto 2220/2004). Posteriormente, se han hecho diversas modificaciones (Directiva 2005/26/CE, Directiva 2006/142/CE, Directiva 2007/68/CE, 65.) en base a las nuevas aportaciones científicas introducidas en los últimos años. Los alérgenos alimentarios reconocidos en la última normativa son:

1. Cereales que contengan gluten (es decir, trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas) y productos derivados.
2. Crustáceos y productos a base de crustáceos.
3. Huevos y productos a base de huevo.
4. Pescado y productos a base de pescado.
5. Cacahuets y productos a base de cacahuets.
6. Soja y productos a base de soja.
7. Leche y sus derivados (incluida la lactosa).
8. Frutos de cáscara, es decir, almendras, avellanas, nueces, anacardos pacanas castañas de Pará, alféncigos, macadamias o nueces de Australia y productos derivados.
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/l expresado como SO₂.
13. Altramuces y productos a base de altramuces.
14. Moluscos y productos a base de moluscos.

Sin embargo, aunque en la etiqueta de un alimento se incluyan de forma adecuada todos los ingredientes, existe la posibilidad de que contenga una pequeña cantidad de un componente alérgénico sin estar incluido, debido a la presencia de los denominados “alérgenos ocultos”. Se consideran “alérgenos ocultos” aquellos presentes en un producto alimentario, normalmente en muy baja concentración, que pasan de forma desapercibida para el consumidor e incluso para el productor, y cuya presencia puede deberse a errores en la formulación, a deficiencias en la limpieza de las líneas de producción o a problemas de contaminación cruzada durante el transporte o el procesado, entre otros. Por ello, algunos fabricantes utilizan un etiquetado preventivo

indicando en el alimento “puede contener”, lo que supone una restricción de la cantidad de productos a elegir por el consumidor alérgico (Deibel *et al.*, 1997).

La reciente normativa impuesta por la legislación europea en relación al etiquetado de alimentos, así como la necesidad de controlar los ingredientes, los procesos y los sistemas de limpieza en la industria alimentaria, para el establecimiento de un plan de prevención de alérgenos, hacen que sea necesario disponer de técnicas específicas y sensibles para la detección de los alérgenos en alimentos (Deibel *et al.*, 1997).

3. Alergia al cacahuete

El cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) pertenece junto con los guisantes, las lentejas, la soja, las alubias y los garbanzos a la familia botánica de las leguminosas, si bien está también incluido dentro del grupo de los frutos secos de cáscara dura. El cacahuete es un alimento consumido en muchos países y se puede tomar entero, tostado o frito, como aperitivo, o ser usado troceado o triturado como un ingrediente en la elaboración de muchos alimentos como galletas, chocolate, turrones, pralinés, salsas, etc.

El cacahuete es el causante de un importante porcentaje de los casos de alergias alimentarias en la actualidad. Se estima que un 0,8% (13% del total de alergias en niños) de los niños menores de tres años son alérgicos a cacahuetes, y que la incidencia en adultos es de un 0,6% (16.2% del total de alergias en adultos) (Wen *et al.*, 2007). Asimismo, datos publicados indican que la alergia a los cacahuetes se ha duplicado en niños de menos de 5 años en la última década en los Estados Unidos y en el Reino Unido (Sicherer *et al.*, 2003). En España, los datos recogidos actualmente revelan que el 23.9% de los adultos alérgicos y el 20.2% de los niños alérgicos lo son a cacahuetes o frutos de cáscara (Alvarado y Pérez, 2006). En estudios llevados a cabo recientemente en Francia, se ha indicado que la población alérgica a cacahuetes se situaría en torno al 1% y que casi un 30% de las alergias alimentarias en este país son causadas por cacahuetes (Kanny *et al.*, 2001). Globalmente, estos datos indican que en torno a 1 de cada 150-200 individuos en países occidentales sufren alergia al cacahuete (Wen *et al.*, 2007).

Un aspecto importante de la alergia al cacahuete es que el consumo de una cantidad muy pequeña, incluso de 100 µg, pueden desencadenar un cuadro clínico (Wensing *et al.*, 2002). Además, cabe resaltar que la alergia a cacahuete suele persistir de por vida.

La reacción alérgica inducida por el cacahuete es mediada por IgE. Los síntomas clínicos aparecen a los pocos minutos y siempre en un tiempo menor de dos horas tras su ingesta. La sintomatología que produce la alergia al cacahuete puede afectar a diversos órganos como la piel (89%), el tracto respiratorio (42%), el aparato digestivo (26%) o el sistema cardiovascular (4%) (Sicherer *et al.*, 2001). Además, en muchas ocasiones, esta alergia puede llegar a desencadenar un choque anafiláctico, llegando incluso a comprometer la vida del individuo. En USA, se ha estimado que la anafilaxia por ingestión de cacahuete afecta a 1.5 millones de personas y causa alrededor de unas 50-100 muertes cada año (Wen *et al.*, 2007).

En el cacahuete, se han identificado, clonado y expresado hasta ocho proteínas alergénicas denominadas según la nomenclatura de alérgenos, Ara h1 a Ara h8 (Tabla 1). Las proteínas Ara h1 y Ara h2 son consideradas como los alérgenos mayores, ya que se estima que más del 95% de los individuos alérgicos al cacahuete poseen IgE específicas frente a ellas. El resto de las proteínas alergénicas (Ara h3-Ara h8) son consideradas alérgenos menores dada su baja tasa de sensibilización, menor del 50% (Bush y Hefle, 1996).

Las proteínas Ara h1 y la Ara h2 son cuantitativamente importantes en la semilla ya que representan un 12-16 % y un 5.9-9.3 %, respectivamente, del contenido total de proteína en el cacahuete (Wen *et al.*, 2007).

La Ara h1 es una glicoproteína que pertenece a la familia de las vicilinas, que son proteínas de almacenamiento de la semilla. Esta familia está incluida en la superfamilia de las cupinas con las que comparte una estructura común de barril beta. Tiene un peso molecular de 63,5 kDa y un punto isoeléctrico de 4,5 y en la semilla se encuentra en forma trímera en la que los monómeros están unidos principalmente por interacciones hidrofóbicas (Saiz *et al.*, 2013).

La proteína Ara h2 es una glicoproteína que pertenece a la familia de las conglutinas, que son también proteínas de almacenamiento de la semilla, y está relacionada con las albúminas 2S de la superfamilia de las prolaminas. Tiene un peso molecular de 17 kDa y un punto isoeléctrico de 5,2. Contiene 8 cisteínas, por lo que su estructura tridimensional está mantenida por varios puentes disulfuro, lo que le confiere una elevada estabilidad (Maleki *et al.*, 2003; Saiz *et al.*, 2013).

Las proteínas Ara h1 y Ara h2 mantienen su poder alergénico tras la aplicación de tratamientos térmicos al cacahuete o tras una digestión con pepsina, tripsina o quimotripsina (Maleki *et al.*, 2003).

Tabla 1. Alérgenos contenidos en el cacahuete

Alérgeno	Peso molecular (KDa)	Punto isoeléctrico	Familia	Sensibilización (%)
Ara h1	63,5	4,55	Vicilinas	65 - 100
Ara h2	17	5,2	Conglutinas	71 – 100
Ara h3	57	5,5	Glicinas	44 – 53
Ara h4	35,9	5,5	Glicinas	44 – 53
Ara h5	14	4,6	Profilinas	13
Ara h6	14,5	5,2	Conglutinas	38
Ara h7	15,8	5,6	Conglutinas	43
Ara h8	16,9	5,03	No disponible	No disponible

4. Métodos de detección de cacahuete en alimentos.

En los últimos años, se han desarrollado diversas técnicas específicas para detectar la presencia de cacahuete en los alimentos. Estas técnicas se pueden clasificar en dos grupos. El primero incluye aquellas técnicas que se basan en la detección de las proteínas de cacahuete mediante técnicas inmunoquímicas (Malmheden Yman *et al.*, 1994; Holzhauser y Vieths 1999; Kiening *et al.*, 2005), cromatográficas y espectrometría de masas (Shefcheck *et al.*, 2004). El segundo grupo está constituido por técnicas indirectas, que están basadas en el reconocimiento de fragmentos de ADN, generalmente de los que codifican la proteína Ara h2, mediante la técnica convencional de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) o de la PCR en tiempo real (Hird *et al.*, 2003; Stephan y Vieths 2004). Sin embargo, la aplicación de estas técnicas en el análisis rutinario de alimentos se ha encontrado con un problema de falta de estandarización de los reactivos lo que ha limitado su expansión. Además, las interferencias debidas a la inhibición de la polimerasa por los componentes de la matriz no han sido convenientemente resueltas hasta la fecha, lo que obliga a incluir controles internos para cada muestra, con el gasto y esfuerzo que esto supone para el laboratorio.

Actualmente, las técnicas de elección para la detección de cacahuete son las técnicas inmunoquímicas. En estas técnicas se utilizan anticuerpos específicos que reaccionan con proteínas solubles de cacahuete, o con una proteína alergénica específica, generalmente la proteína Ara h1 o la Ara2. Los formatos más usados son la técnica de ELISA en placa de tipo sándwich o competitivo (Holzhauser *et al.*, 1999; Pomes *et al.*, 2003, 2004; Stephan *et al.*, 2004; Kiening *et al.*, 2005), y la técnica de

inmunocromatografía (Wen *et al.*, 2005a). Las principales ventajas que presentan estas técnicas inmunoquímicas son su elevada sensibilidad y especificidad, además de su sencillez operativa, rapidez y bajo coste. Estas ventajas han hecho que estas técnicas sean las más usadas tanto por la industria alimentaria como por los organismos oficiales para controlar la presencia de alérgenos en alimentos (Poms *et al.*, 2004). Algunos de los tests inmunoquímicos desarrollados han sido comercializados y validados por la AOAC, y han mostrado ser herramientas eficaces para medir con precisión la presencia de cacahuete en distintas matrices alimentarias (Poms *et al.*, 2005).

La aplicación de las técnicas inmunoquímicas en la determinación de alérgenos en alimentos puede presentar diversos problemas debido a la compleja naturaleza y composición de los mismos, así como a los tratamientos tecnológicos a los que se han sometido durante su procesado, ya que pueden dificultar la extracción de las proteínas diana usadas en los ensayos, así como dificultar la interacción de la misma con sus anticuerpos específicos (Poms *et al.*, 2004).

El chocolate es una de las matrices alimentarias más problemáticas en el análisis de alimentos en general y de alérgenos en particular. Este hecho se debe a que los taninos y otros compuestos fenólicos presentes en el mismo, muestran una gran afinidad para interactuar con las proteínas del alimento durante la etapa de extracción. Si estos compuestos reaccionan con las proteínas diana, pueden enmascarar epítomos que son reconocidos por los anticuerpos. Además, estos compuestos pueden interferir durante la realización de los análisis al interactuar con los propios anticuerpos que se usan en el inmunoensayo (Pomés *et al.*, 2004). Al respecto, Newsome y Abbott (1999) han mostrado que la utilización de una columna de inmunoafinidad para recuperar las proteínas del cacahuete en muestras de chocolate, antes de su determinación por una técnica de ELISA mejoraba la sensibilidad del ensayo. Sin embargo, este proceso es largo y laborioso, por lo que no resulta adecuado cuando se va a realizar el screening de un elevado número de muestras de chocolate. Por otra parte, en algunos trabajos de detección de cacahuete en chocolate se ha indicado que este problema se puede solventar en parte mediante la adición de agentes bloqueantes ricos en proteínas al tampón de extracción. Estos agentes interactúan con los taninos, previniendo así la interacción de éstos con las proteínas del cacahuete o los anticuerpos. Sin embargo, los resultados obtenidos en los diversos trabajos no son concluyentes (Pomés *et al.*, 2004; Hurst *et al.*, 2002; Poms *et al.*, 2004; Kiening *et al.*, 2005; Holzhauser *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

El objetivo principal que se presenta en este trabajo ha sido desarrollar una técnica de ELISA en placa, para la determinación de proteínas alergénicas de cacahuete, y de su optimización para la detección de cacahuete en chocolate.

Para ello se han planteado una serie de objetivos parciales:

- Obtener antisueros frente a las proteínas alergénicas del cacahuete Ara h1 y Ara h2 mediante inoculación en conejos.
- Desarrollar técnicas de ELISA de tipo competitivo indirecto para determinar las proteínas Ara h1 y Ara h2.
- Aplicar las técnicas desarrolladas en la detección de cacahuete en muestras de chocolate.
- Optimizar las condiciones de extracción de muestras de chocolate mediante el uso de diferentes agentes bloqueantes, para la detección de cacahuete en las mismas usando las técnicas de ELISA para la determinación de las proteínas Ara h1 y Ara h2.

Materiales y Métodos

1. Materiales

Los cacahuetes tostados y las muestras de chocolate negro puro en polvo se obtuvieron en tiendas locales. Las placas de ELISA F96 Maxisorp se obtuvieron de Nunc (Roskilde, Dinamarca). El test del ácido bicinonínico (BCA assay) y el reactivo Guardian proceden de Pierce (Rockford, IL, EEUU). El conjugado de IgG anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa fueron suministrados por Sigma. El sustrato de la peroxidasa que contiene tetrametilbencidina (TMB) procede de ZEU-Inmunotec (Zaragoza, España). EL reactivo polivinilpolipirrolidona (PVPP) y la gelatina fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Canada). La leche en polvo procede de Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England) y la nitrocelulosa de Bio-Rad (Alemania).

El resto de productos utilizados a los que no se hace referencia fueron reactivos de tipo analítico obtenidos de diversas fuentes.

2. Métodos

2.1. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína en las muestras de cacahuete se determinó usando el test del ácido bicinonínico. Para ello, se prepararon previamente estándares de albúmina sérica bovina (BSA) en tampón fosfato potásico 1,5 mM, fosfato sódico 8 mM, cloruro potásico 3 mM, cloruro de sodio 0,14 M pH 7,4 (PBS) en un rango de concentraciones entre 125 µg/ml a 2 mg/ml y varias diluciones de las muestras a analizar. Después, se añadieron en pocillos de una microplaca 25µL de los estándares o las muestras, por triplicado, y 200 µl del reactivo de trabajo BCA diluido 1/50. Tras agitar, la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y se leyó la absorbancia de los pocillos a 570 nm en un lector de placas. Se preparó una curva estándar representando la absorbancia de los estándares frente a su concentración y la concentración de proteína en las muestras problema se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia en dicha curva.

2.2. Obtención de antisueros

En este trabajo se han obtenido antisueros en conejos frente a las proteínas Ara h1 y Ara h2, según el siguiente protocolo. A cada conejo se le inyectó por vía subcutánea 1 mg de proteína disuelta en 0,5 ml de tampón fosfato potásico 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4 (SSF), y emulsionados con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Transcurrido un mes, se repitió la misma inoculación, pero utilizando adyuvante incompleto de Freund. A los 15 días se extrajo una pequeña cantidad de sangre mediante punción en la vena auricular externa y se determinó la presencia de anticuerpos por inmunodotting y western-blotting como se describe en los apartados 2.3 y 2.5. Si resultaba positiva, se extraía sangre y si era negativa se repetía la inoculación de la proteína con adyuvante incompleto. Para las extracciones de sangre sucesivas, se dejó recuperar a los animales durante 30 días, repitiendo las inoculaciones con adyuvante incompleto a los 15 días de cada extracción. La sangre obtenida se dejó coagular espontáneamente a temperatura ambiente y se mantuvo una noche a 4 °C, tras lo cual se centrifugó a 500 g durante 15 minutos, y posteriormente se congeló en alícuotas a -20°C hasta su uso.

2.3. Inmunodotting

Las muestras (1 µL) se aplicaron sobre una hoja de nitrocelulosa y se dejaron secar. Posteriormente, la hoja de nitrocelulosa se incubó con una solución de ovoalbúmina al 5% (p/v) en SSF, a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas de la nitrocelulosa. A continuación, la hoja de nitrocelulosa se incubó con una dilución apropiada del antisero correspondiente en ovoalbúmina al 3% (p/v) en SSF, a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación suave. La hoja se lavó 5 veces con SSF y se incubó con IgG anti-IgG de conejo conjugadas con peroxidasa, diluidas en ovoalbúmina al 3% (p/v), en SSF a temperatura ambiente durante 2 horas. La hoja se lavó como en la etapa anterior, y para el revelado se incubó con 6 mg de 4-cloro-1-naftol disuelto en 2 ml de metanol, 8 ml de SSF y 10 µl de H₂O₂ al 30%.

2.4. SDS-Electroforesis

Las muestras a analizar se diluyeron hasta una concentración de 1-2 mg/ml con tampón Tris 10 mM, pH 8 que contenía EDTA 1mM y bromoferol. Posteriormente, a 90 μ L de muestra, se le añadieron 10 μ L de SDS al 25% (p/v, en agua destilada) y se mantuvieron en un baño a 100°C durante 5 minutos. Las muestras se aplicaron en geles comerciales de acrilamida de 20%. Las electroforesis se realizaron en un Phast System (Pharmacia, Uppsala, Suecia) siguiendo las recomendaciones que el fabricante establece para cada tipo de geles.

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas de proteínas se tiñeron con el colorante Phast Gel Blue R. Esta solución colorante contenía 0,65g de Azul de Coomassie R, 300 ml de metanol, 100 ml de ácido acético y 500 ml de agua destilada. Los geles se cubrieron totalmente con el colorante y se pusieron en agitación durante una hora, después se retiró el colorante y se añadió una mezcla de decolorante para aclarar los geles. El decolorante se preparó con 250 ml de metanol, 80 ml de ácido acético, 20 ml de glicerina y 650 ml de agua destilada. Los geles permanecieron en la mezcla de decolorante hasta que quedaron incoloras las zonas del gel donde no había bandas de proteína.

2.5. Western-blotting

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un equipo de transferencia MilliBlot-SDE Transfer System (Millipore, Bedford, MA, EEUU). Para ello, se recortaron seis láminas de papel de filtro Whatmann 3MM y una membrana de nitrocelulosa de similares dimensiones al gel de electroforesis. Cada uno de los papeles de filtro permaneció sumergido en uno de los siguientes tampones: un papel en tampón Tris 0,3 M, 10% metanol, pH 10,4 (ánodo I), dos papeles en tampón Tris 25 mM, 10% metanol, pH 10,4 (ánodo II) y tres papeles en tampón Tris 25 mM, glicina 4 mM, 20% metanol, pH 10,4 (cátodo). La membrana de nitrocelulosa se humedeció en agua destilada.

En el sistema de transfer se colocaron encima de la unidad del ánodo y en este orden el papel de filtro del ánodo I, los del ánodo II, la membrana de nitrocelulosa, el gel de electroforesis y los papeles de filtro del cátodo. Después, se colocó la unidad del cátodo y la transferencia se realizó utilizando una intensidad de 2 mA/cm² durante 45 minutos. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, la nitrocelulosa se incubó como se ha indicado en el caso del inmunodotting.

2.6. Técnica de ELISA no competitivo indirecto

Esta técnica se ha usado para titular los antisueros. Para ello, las placas se tapizaron con 120 µl/pocillo de una solución de proteína Ara h1 o Ara h2 (5 µg/ml) en tampón carbonato sódico 0,01 M, pH 9,6. Tras la incubación a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron 5 veces con 300 µl/pocillo de PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBST), y se incubaron con 300 µl/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 2% (p/v), en tampón PBS a temperatura ambiente durante 2 horas, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas.

Posteriormente, las placas se lavaron 5 veces con PBST y después, las placas se incubaron con 100 µl/pocillo de diferentes diluciones del antisuero correspondiente, a 37°C durante 1 hora. Tras 5 lavados con PBST, se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución adecuada de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa en tampón PBS, que se mantuvieron a 37°C durante 1 hora, y se lavaron de nuevo 5 veces con PBST. Por último, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución del sustrato comercial que contenía TMB, y tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia).

2.7. Preparación y extracción de las muestras de chocolate con cacahuete

Tras eliminar la cáscara y pelar los cacahuetes tostados que habían estado almacenados en atmósfera protectora, se trituraron con una picadora, hasta obtener una pasta fina y homogénea. Se pesaron 3 g del chocolate negro puro en polvo desengrasado y una cantidad de cacahuete triturado para obtener porcentajes de cacahuete en chocolate de 1%, 0,5%, 0,1% y 0,05% (p/p). Después, se añadieron 30 ml de tampón borato 0,01M, pH 8.0 y la mezcla se incubó a 60°C durante 30 minutos en agitación. A continuación, las muestras se clarificaron por centrifugación a 3.000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras retirar la fase lipídica superior con una espátula, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 10.000 g a 4°C durante 10 minutos. En el caso de no ser analizado inmediatamente, este sobrenadante se congeló a -20°C hasta su uso. La extracción de las muestras se realizó también con el tampón borato conteniendo como bloqueantes distintos porcentajes de gelatina (0,5-8%, p/p) o leche en polvo (1-5%, p/p).

Otro lote de muestras se extrajo con tampón que contenía PVPP. En este lote, previamente las muestras se incubaron con hexano en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos. Tras eliminar la fase orgánica, se añadió a la fase acuosa PVPP para obtener una concentración final de 0,11nM. Tras 30 minutos de incubación a 60°C, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

2.8. Preparación de estándares

Los estándares de las proteínas Ara h1 y Ara h2 usados en las técnicas de ELISA, se prepararon en tampón borato 0,01M, pH 8 que contenía BSA 0,5% y 0,05% de timerosal. Para cada proteína, los estándares se prepararon a una concentración 50 veces mayor a la usada en los ensayos, y se guardaron en alícuotas congeladas hasta su uso. Para la realización del ensayo, los estándares se diluyeron 1/50 en PBS sin o con agentes bloqueantes.

2.9. Técnica de ELISA competitivo indirecto

Las placas se tapizaron como se ha indicado en la sección 2.6. Posteriormente, se lavaron 5 veces con PBST y se incubaron con 50 µl/pocillo de una dilución adecuada del antisuero correspondiente y 50 µl/pocillo de las muestras o estándares, a 37°C durante 1 hora. Tras 5 lavados con PBST, se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución adecuada de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa en tampón PBS, que se mantuvieron a 37°C durante 1 hora. Finalmente se añadieron 100 µl/pocillo de una solución del sustrato comercial que contenía TMB, y tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2M y la absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm.

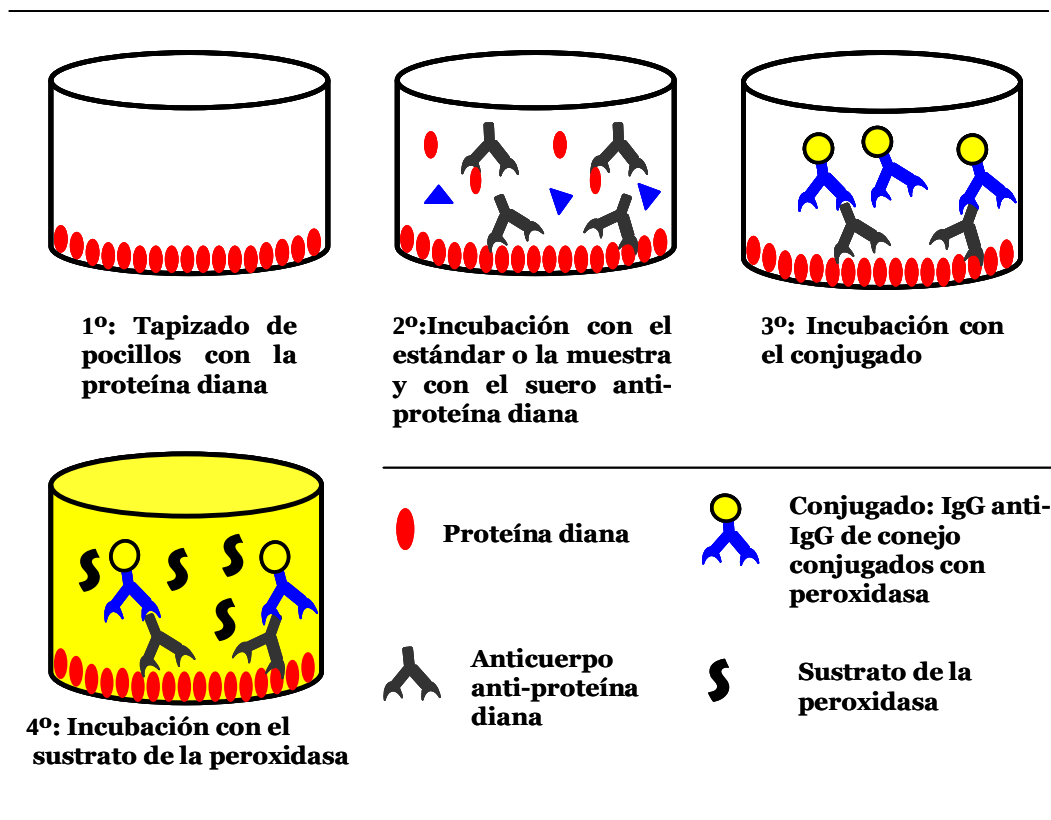


Figura 1: Esquema de la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto.

Resultados y discusión

1. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína presente en la muestra de cacahuete tostado utilizada en este trabajo se determinó mediante un test comercial que utiliza el ácido bicinconínico. Este método combina la reacción de reducción de los iones cúprico (Cu^{2+}) a cuproso (Cu^{1+}) inducida por las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret) con la posterior interacción entre el ión cuproso formado con el ácido bicinconínico que forman un complejo de color púrpura intenso. Este complejo soluble muestra un máximo de absorbancia a 562 nm, cuya intensidad aumenta al aumentar la concentración de proteína.

En la Figura 2 se muestra la curva estándar obtenida con albúmina sérica bovina utilizada como patrón, que fue lineal en un rango de concentraciones entre 20 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. Al interpolar los valores de la absorbancia de diferentes diluciones de la muestra de cacahuete y multiplicar por el inverso de la dilución de cada una se obtuvo una concentración de 13,6 mg/ml, lo que corresponde a una concentración de 136 mg/g de cacahuete. Si se considera que la concentración media de proteína del cacahuete es del 27%, en el extracto obtenido se han solubilizado aproximadamente el 50% de las proteínas presentes.

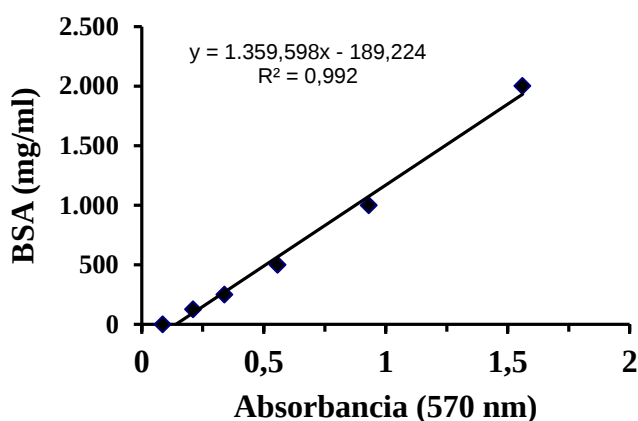


Figura 2. Curva patrón obtenida para la albúmina sérica bovina (BSA) utilizando el test del ácido bicinconínico.

2. *Obtención y caracterización de los antisueros.*

Los antisueros anti-proteína Ara h1 y Ara h2 se obtuvieron por inoculación en conejos de las proteínas purificadas. La inmunorreactividad y especificidad de los antisueros obtenidos se comprobaron por las técnicas de inmunodotting y western-blotting. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en el inmunodotting utilizando un antisuero anti-proteína Ara h2. Se observa una mancha coloreada en los puntos de la nitrocelulosa donde se aplicaron las proteínas Ara h2 y el extracto de cacahuete y no donde se aplicaron las proteínas lácteas, indicando la presencia de anticuerpos frente a dicha proteína. Se observa también reacción en el punto donde se aplicó la proteína Ara h1, lo que indica probablemente que la fracción purificada de proteína Ara h1 contiene también una pequeña cantidad de Ara h2. En los western-blotting se observa reacción de los antisueros con sus respectivas proteínas en las fracciones purificadas y en el extracto de cacahuete, lo que indica que son específicos para la proteína frente a la que se han obtenido.

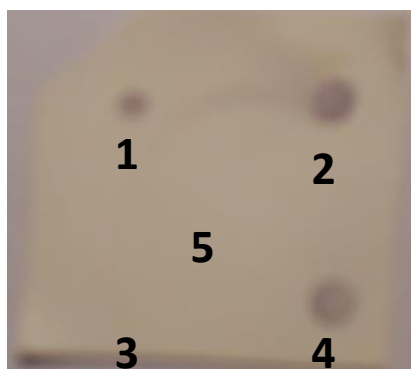


Figura 3: Inmunodotting obtenido utilizando un antisuero anti-proteína Ara h2 de:

1: Proteína Ara h1 (2 mg/ml)

2: Extracto de cacahuete

3: Lactoferrina (2 mg/ml)

4: Proteína Ara h2 (2mg/ml)

5: Alfa-lactalbúmina (2 mg/ml)

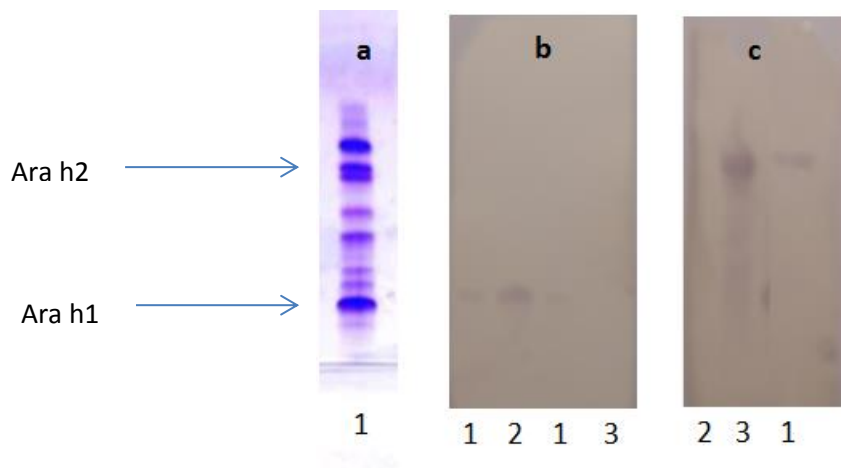


Figura 4: Electroforesis (a) y western-blotting (b, c) utilizando un antisuero anti-proteína Ara 1(b) y Ara h2 (c) de:

1. Extracto de cacahuete
2. Proteína Ara h1
3. Proteína Ara h2

La determinación del título de los antisueros se realizó utilizando una técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto. El título de un antisuero corresponde al inverso de la dilución correspondiente al 50% de la máxima absorbancia obtenida. En la Figura 5 se muestra el ejemplo de una curva de titulación obtenida con un antisuero anti-Ara h2, cuyo título fue de 1/6.000. El título de los antisueros obtenidos frente a las proteínas Ara h1 y Ara h2 en las distintas sangrías de los diferentes conejos varió entre 1/2.500 y 1/75.000.

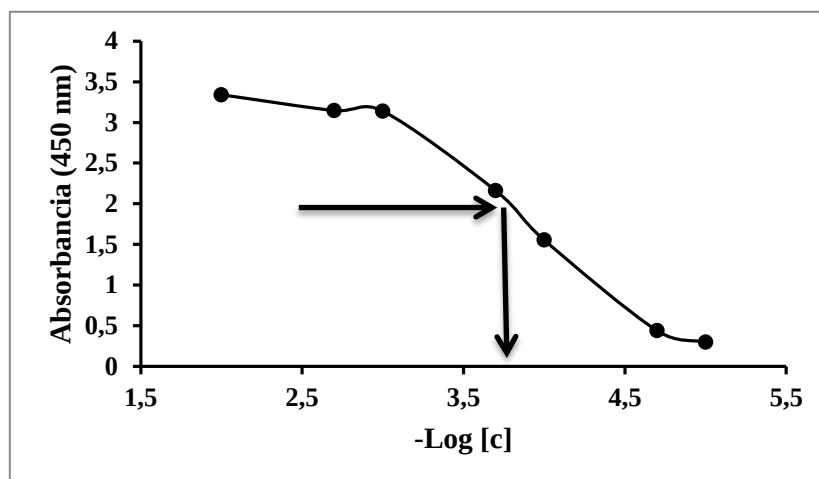


Figura 5. Curva de titulación de un antisuero obtenido frente a la proteína Ara h2.

3. Desarrollo de técnicas de ELISA competitivo indirecto para la determinación de las proteínas Ara h1 y Ara h2.

Para desarrollar las técnicas de ELISA en placa de tipo competitivo indirecto, se probaron distintas concentraciones de proteína fijadas a la placa, distintas soluciones de bloqueo de los pocillos y distintas diluciones de los antisueros y del conjugado. Las condiciones óptimas para la realización de este test se han indicado en la metodología.

Las curvas de calibración obtenidas para la determinación de las proteínas Ara h1 y Ara h2 utilizando esta técnica se muestran en la Figura 6. En las gráficas se representa la absorbancia a 450 nm de los estándares en PBS frente al logaritmo de la concentración de proteína. Las rectas obtenidas fueron lineales en un rango de concentraciones entre 50 ng/ml y 10 µg/ml ($r^2 \geq 0,98$). La concentración de las proteínas Ara h1 y Ara h2 en las muestras analizadas se determinó por interpolación de los valores de la absorbancia en las curvas de calibración obtenidas en cada placa. Estos resultados son comparables con los indicados en otros trabajos, que han mostrado rectas de regresión lineales en un rango de concentraciones entre 10 y 1000 ng/ml para las proteínas Ara h1 y Ara h2 (Pomés et al., 2004; Schmitt et al., 2004).

La concentración de las proteínas Ara h1 y Ara h2 estimada en el cacahuete extraído con tampón borato ha sido de 6,98 y 4,97 mg/g de cacahuete, respectivamente.

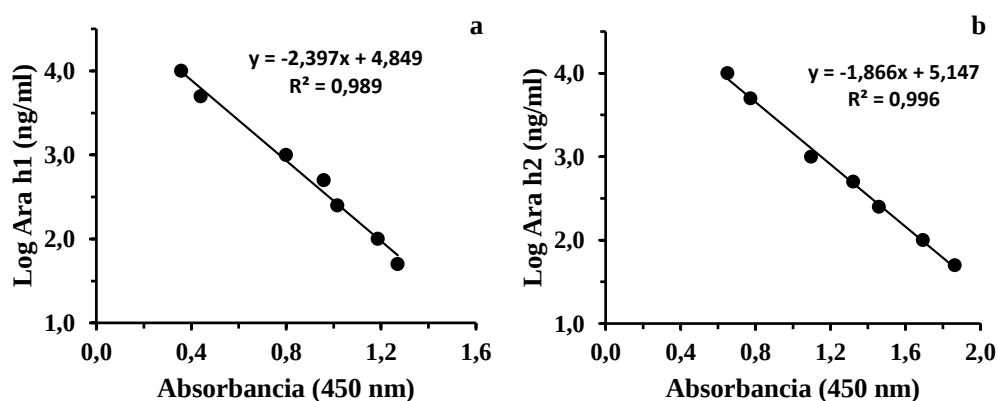


Figura 6. Curvas de calibración obtenidas para la determinación de las proteínas Ara h1 (a) y Ara h2 (b) mediante las técnicas de ELISA tipo competitivo indirecto. Los estándares contenían las proteínas Ara h1 y Ara h2 en PBS.

4. Análisis de las muestras de chocolate comerciales por las técnicas de ELISA

Diversas muestras de chocolate en tableta, chocolate en polvo a la taza y cacao puro desengrasado se adquirieron en el supermercado y se analizaron utilizando las técnicas de ELISA en placa desarrolladas (Figura 7). Como puede observarse, la absorbancia de las muestras se encontró dentro de un rango entre 0,13 y 0,75 para el ELISA de la proteína Ara h1 y entre 0,20 y 0,41 para la Ara h2, no existiendo una clara tendencia en función del tipo de muestra analizado. Estos resultados indican que el chocolate interfiere considerablemente en los ensayos, debido probablemente a la presencia de taninos y otros polifenoles que interaccionan con la proteína fijada en los pocillos impidiendo su reacción con los anticuerpos y/o interaccionan con los anticuerpos dificultando la reacción de éstos con la proteína fijada en el pocillo (Pomés et al., 2004). Por ello, todas las muestras de chocolate analizadas tienen unos valores de absorbancia menores a los del blanco y por tanto dan un resultado positivo a la presencia de cacahuete. Este resultado no se puede descartar en el caso de las muestras adquiridas en tableta, pues en todas ellas se indica la posible presencia de trazas de frutos secos, al ser elaboradas en las mismas líneas de procesado que se elabora el chocolate con frutos secos. Sin embargo, las muestras de chocolate en polvo a la taza y de chocolate puro están exentas de contaminantes de frutos secos, pues no se elaboran productos con frutos secos en sus líneas de procesado. Además, en la etiqueta de estas muestras no se indica la eventual presencia de trazas de frutos secos. Estos resultados ponen de manifiesto la dificultad de trabajar con una matriz como el chocolate, en la que es necesario probar la adición al medio de extracción de reactivos que bloqueen la interacción inespecífica entre los componentes del chocolate y las proteínas diana y/o los anticuerpos usados en los ensayos.

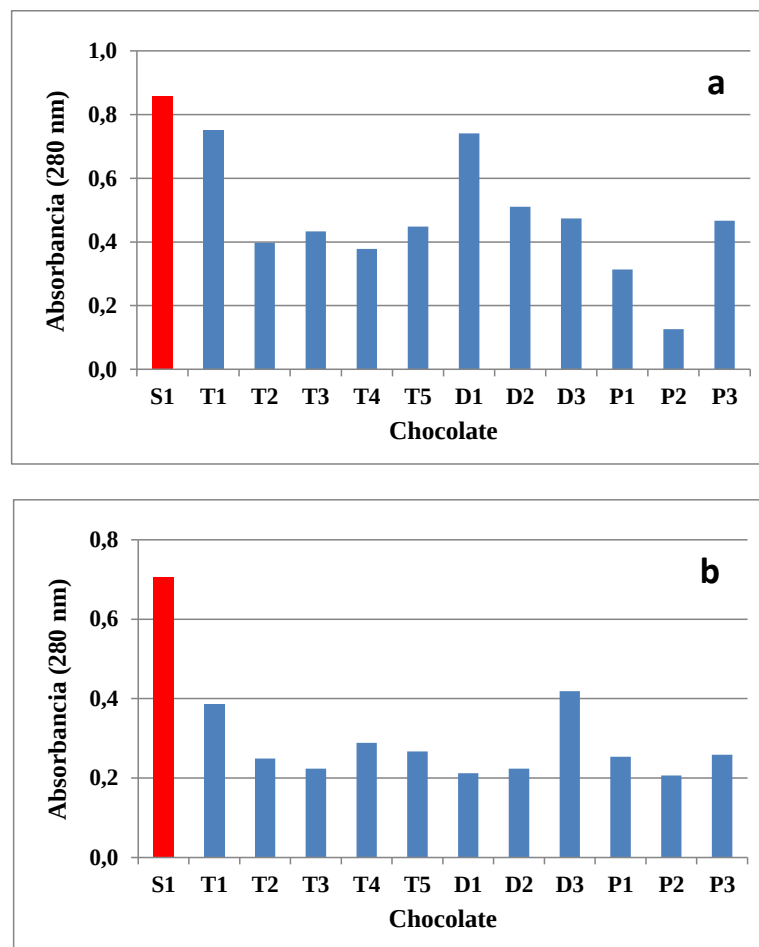


Figura 7. Análisis de muestras de chocolate comerciales utilizando las técnicas de ELISA en placa para la determinación de las proteínas Ara h1(a) y Ara h2 (b). La barra roja corresponde a la absorbancia del blanco (PBS). Chocolate en tableta (T), chocolate en polvo a la taza (D), chocolate puro desengrasado (P).

5. Determinación del color de las muestras de chocolate en polvo

Se han analizado muestras de chocolate en polvo a la taza y de cacao puro desengrasado en un colorímetro y se han determinado los parámetros CIELAB (Tabla 2, Figura 8). Los tres parámetros determinados representan la luminosidad de color (L^* , $L^*=0$ rendimientos negro y $L^*=100$ indica blanca), su posición entre rojo y verde (a^* , valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul (b^* , valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo).

Los resultados indican que los chocolates puros desengrasados tienen un valor L más bajos que los chocolates en polvo a la taza, por lo que son más oscuros. Respecto a las coordenadas de los valores a^* y b^* , los chocolates puros muestran mayores valores que los chocolates en polvo a la taza. Estos valores indican que los chocolates puros

muestran una tendencia hacia colores anaranjados oscuros, más rojizos, mientras que los chocolates en polvo a la taza que contienen como ingredientes azúcar y almidón tienden a colores grisáceos, al haber perdido gran parte del rojo.

Tabla 2. Valores de los parámetros CIELAB de muestras de chocolate en polvo.

	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)
Chocolates en polvo puros desengrasados			
P1	41,5	16,7	24,0
P2	36,7	15,6	21,0
P3	45,9	13,5	23,5
Chocolates en polvo a la taza			
D1	60,8	9,0	16,9
D2	61,8	9,1	17,9
D3	55,9	8,9	13,6

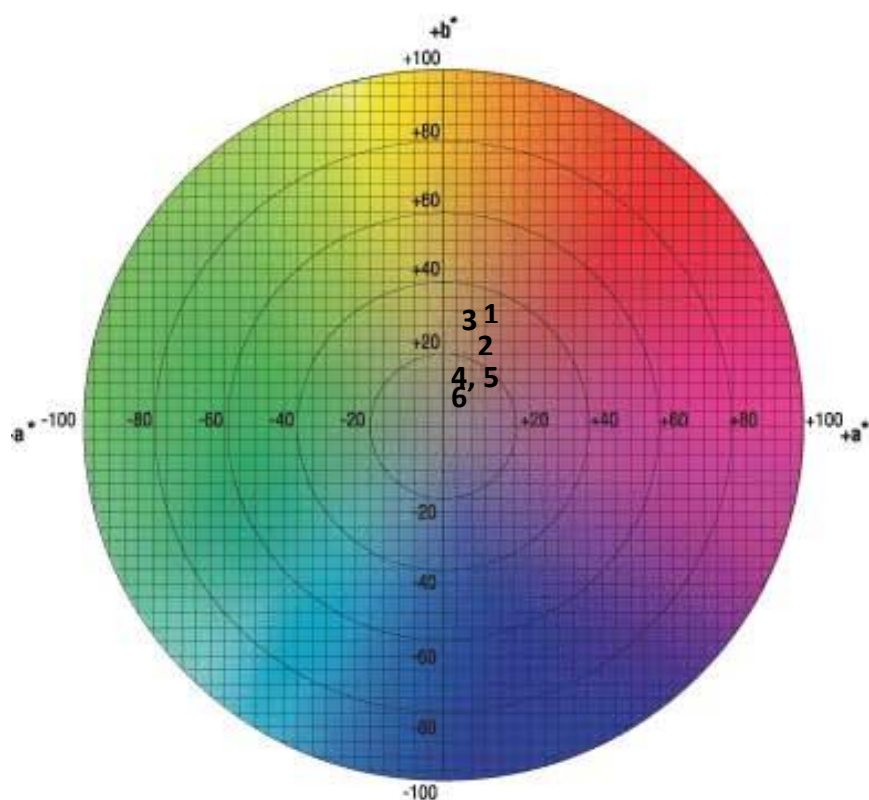


Figura 8. Posición orientativa de los chocolates en polvo dentro del sistema CIELAB

1: P1 2: P2 3: P3
 4: D1 5: D2 6: D3

6. Ensayos de estándares en presencia de diferentes bloqueantes

Para disminuir las reacciones inespecíficas de los componentes del chocolate con las proteínas diana y/o los anticuerpos usados en los ensayos de ELISA resulta necesario la adición al tampón de extracción de las muestras de diferentes bloqueantes en distintas proporciones. Tras revisar la bibliografía en la que se analiza esta matriz alimentaria, se ha determinado ensayar la adición al tampón de extracción de los bloqueantes gelatina, leche en polvo y PVPP (Pomés et al., 2004; Stephan y Vieths, 2004; Wen et al., 2005).

La utilización de estos bloqueantes hace necesario probar previamente como afecta su adición a los estándares usados en los ensayos de ELISA. Por ello, los estándares concentrados preparados como se ha indicado en la sección de métodos se diluyeron en tampón PBS que contenía los bloqueantes seleccionados. En las Figuras 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos con un 5% de gelatina y con PVPP, respectivamente. Como puede observarse, la adición de ambos bloqueantes produce una disminución de los valores de la absorbancia en comparación con los valores obtenidos con los estándares diluidos en PBS sin bloqueantes, siendo la disminución mayor en el caso de la gelatina. La disminución de la absorbancia se ha observado también cuando se utiliza como bloqueante leche en polvo, y tanto en la gelatina como en la leche en polvo, la disminución ha sido mayor al utilizar una mayor concentración de bloqueante.

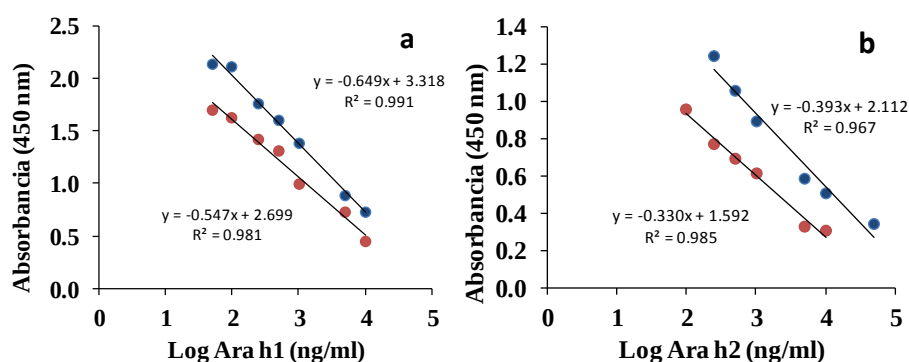


Figura 9. Curvas de calibración obtenidas para la determinación de las proteínas Ara h1 (a) y Ara h2 (b) mediante las técnicas de ELISA tipo competitivo indirecto. Los estándares contenían las proteínas Ara h1 y Ara h2 en PBS (●) y en PBS con 5% de gelatina (●).

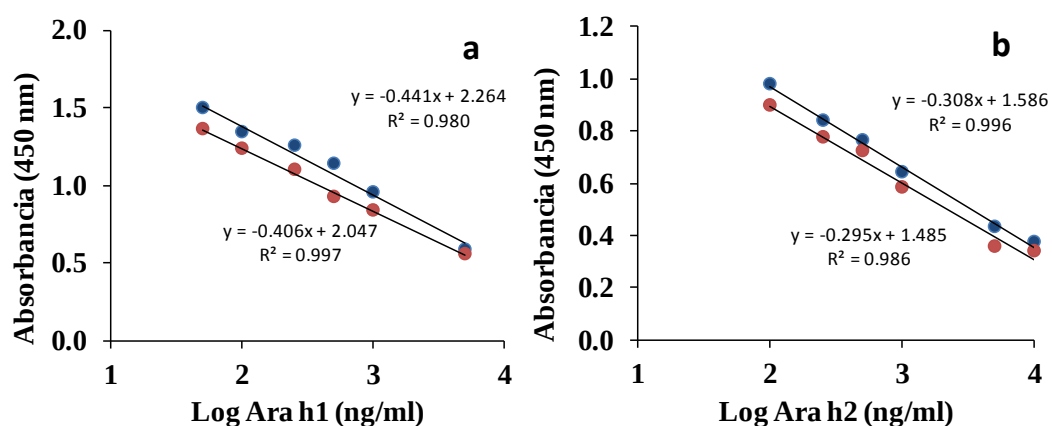


Figura 10. Curvas de calibración obtenidas para la determinación de las proteínas Ara h1 (a) y Ara h2 (b) mediante las técnicas de ELISA de tipo competitivo indirecto. Los estándares contenían las proteínas Ara h1 y Ara h2 en PBS (●) y en PBS con 0,11 nM de PVPP (●).

7. Ensayos de extracción del chocolate con cacahuete en presencia de diferentes bloqueantes

El chocolate utilizado en este trabajo ha sido un cacao comercial en polvo desengrasado, concretamente el indicado previamente como muestra P3, por ser el que produce unas interferencias más similares a los otros formatos de chocolate comerciales analizados.

En las Figuras 11 a y b se muestran los resultados obtenidos en el análisis del chocolate extraído con el tampón borato en presencia de porcentajes de gelatina del 0,5, 1, 3 y 5% utilizando los ensayos de las proteínas Ara h1 y h2, respectivamente. Teniendo en cuenta que la cuantificación de las muestras es muy dependiente del tampón que se utiliza para diluir los estándares, se ha considerado oportuno mostrar en los resultados la absorbancia de las muestras. Al utilizar un sistema de tipo competitivo, el incremento en la absorbancia indica una disminución de la concentración y viceversa.

Como puede observarse, la adición entre un 0,5 y un 5% de gelatina al tampón de extracción produce un incremento en la absorbancia de las muestras de chocolate sin cacahuete que es mayor cuanto mayor es el porcentaje añadido. Asimismo, la absorbancia de las muestras con cacahuete se mantiene (para la proteína Ara h2) o disminuye (para la proteína Ara h1) con el porcentaje de gelatina añadida. Sin embargo, a mayores porcentajes de gelatina se observa el efecto contrario. Este hecho indica que la adición de gelatina hasta un 5% disminuye las interferencias producidas por los componentes del chocolate en los inmunoensayos, obteniéndose los mejores resultados

con un porcentaje de este bloqueante del 5%. En otros trabajos se ha probado la adición al tampón de extracción de un 5% (Wen et al., 2005) y un 6% (Stephan y Vieths, 2004) de gelatina. Estos autores indican que estos bloqueantes reducen pero no evitan completamente las interacciones inespecíficas con los taninos del chocolate, como también se observa en este trabajo.

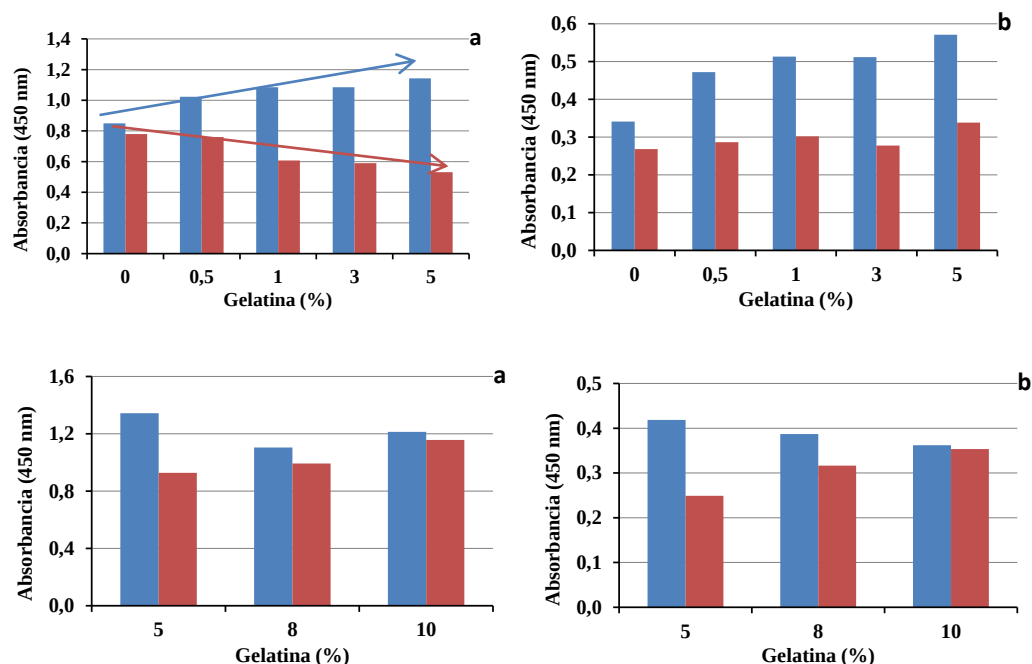


Figura 11: Efecto de la adición de diferentes porcentajes de gelatina al tampón de extracción de las muestras de chocolate en la determinación de las proteínas Ara h1 (a) y h2 (b) mediante las técnicas de ELISA competitivo indirecto. Muestra de chocolate sin (■) y con un 0,1% de cacahuete (■).

Cuando se utilizó como bloqueante la leche en polvo, los mejores resultados se obtuvieron cuando se adicionó al tampón de extracción un porcentaje del 1% y tuvieron un efecto más marcado en la proteína Ara h2 que en la Ara h1 (Figura 12). En el trabajo de Pomes *et al.* (2004) estudiaron el efecto de la adición de leches de diferentes especies a diferentes proporciones y observaron que la extracción de cacahuete en chocolate era mejor en presencia de un 5% de leche en polvo bovina. La adición del reactivo PVPP mejoró ligeramente la extracción ambas proteínas (Figura 13). Sin embargo hay que considerar que la cantidad de cacahuete añadido es muy alta en comparación con otros ensayos, por ello este bloqueante no se incluyó en los posteriores ensayos realizados. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Wen et al. (2005) quienes usando un sistema de inmunocromatografía con anticuerpos anti proteína Ara h1 observaron una

mejora en la sensibilidad del test al tratar las muestras de chocolate previamente con hexano y usar PVPP como bloqueante.

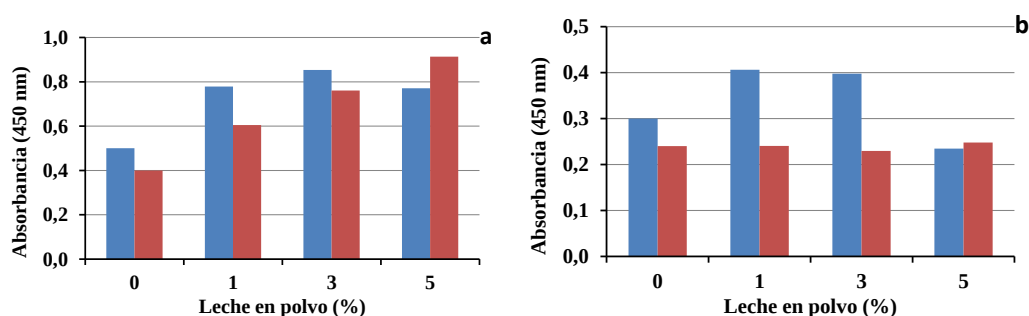


Figura 12: Efecto de la adición de diferentes porcentajes de leche en polvo al tampón de extracción de las muestras de chocolate en la determinación de las proteínas Ara h1 (a) y h2 (b) mediante las técnicas de ELISA competitivo indirecto. Muestra de chocolate sin (■) y con un 0,1% de cacahuete (■).

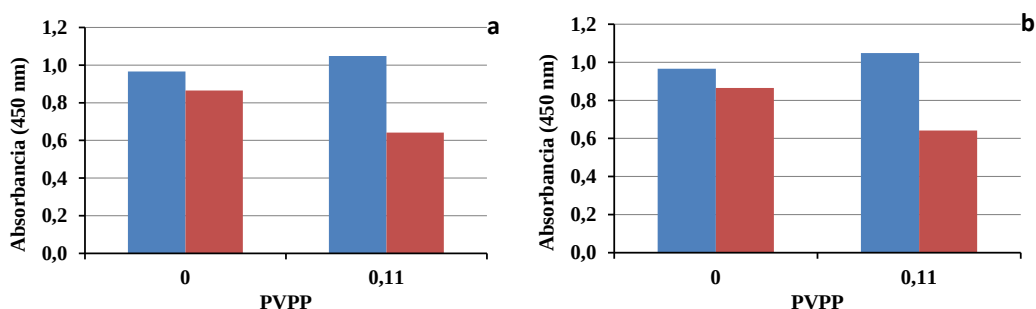


Figura 13: Efecto de la adición de PVPP (0,11 nM) al tampón de extracción de las muestras de chocolate en la determinación de las proteínas Ara h1 (a) y h2 (b) mediante las técnicas de ELISA competitivo indirecto. Muestra de chocolate sin (■) y con un 1% de cacahuete (■).

8. Determinación de las proteínas Ara h1 y h2 en muestras de chocolate enriquecidas con diferentes porcentajes de cacahuete

Las proteínas Ara h1 y Ara h2 se han determinado en muestras de chocolate enriquecidas con diversas proporciones de cacahuete. Todas las muestras se extrajeron con tampón borato que contenía los agentes bloqueantes seleccionados: gelatina al 5% y leche en polvo al 1%.

La cuantificación de las proteínas se ha realizado utilizando tanto una curva patrón con los estándares diluidos en PBS como una curva con los estándares diluidos en chocolate conteniendo el porcentaje de cada bloqueante seleccionado (5% de gelatina y 1% de leche en polvo) (Figura 15). Se ha considerado relevante incluir ambas curvas con el objeto de disminuir los valores de la absorbancia de los estándares, que resultan en una reducción del alto background que produce esta matriz alimentaria. Como muestran las gráficas, la absorbancia de los estándares es menor en presencia de ambos bloqueantes, siendo el efecto más marcado en el ensayo de la proteína Ara h2. Además, la absorbancia fue menor en presencia de gelatina para la proteína Ara h1 y en presencia de leche en polvo para la proteína Ara h2. Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto de los bloqueantes depende de la proteína diana y de los anticuerpos usados en cada ensayo.

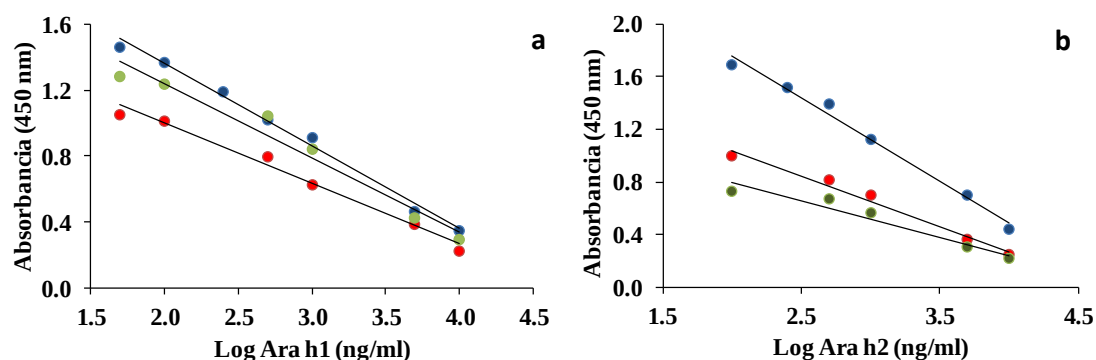


Figura 15. Curvas de calibración obtenidas para la determinación de las proteínas Ara h1 (a) y Ara h2 (b) mediante las técnicas de ELISA tipo competitivo indirecto. Los estándares contenían las proteínas Ara h1 y Ara h2 en PBS (●), en PBS conteniendo chocolate y gelatina al 5% (●) y en PBS conteniendo chocolate y leche en polvo al 1% (●).

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de chocolate con diferentes proporciones de cacahuete.

Como puede observarse, la concentración de proteína estimada en las muestras de chocolate es mayor cuando se usa la curva de los estándares diluidos en PBS (Figuras b y d) que las de los estándares en chocolate con bloqueantes (Figuras a y c), hecho que es esperable teniendo en cuenta las diferencias en la absorbancia de los estándares de cada curva, como se ha mostrado en la Figura 15.

Por otra parte, cuando se utiliza la curva patrón de los estándares en PBS (Figuras b y d), las muestras de chocolate extraídas con gelatina dan concentraciones menores de la proteína Ara h1 que las extraídas con leche en polvo. Sin embargo, las muestras extraídas con gelatina dan valores de concentración de la proteína Ara h2 ligeramente mayores a las muestras extraídas con leche en polvo. Estos resultados indican que el efecto de un determinado agente bloqueante depende de la proteína diana y/o de los anticuerpos usados en cada ensayo, como ya se ha indicado anteriormente.

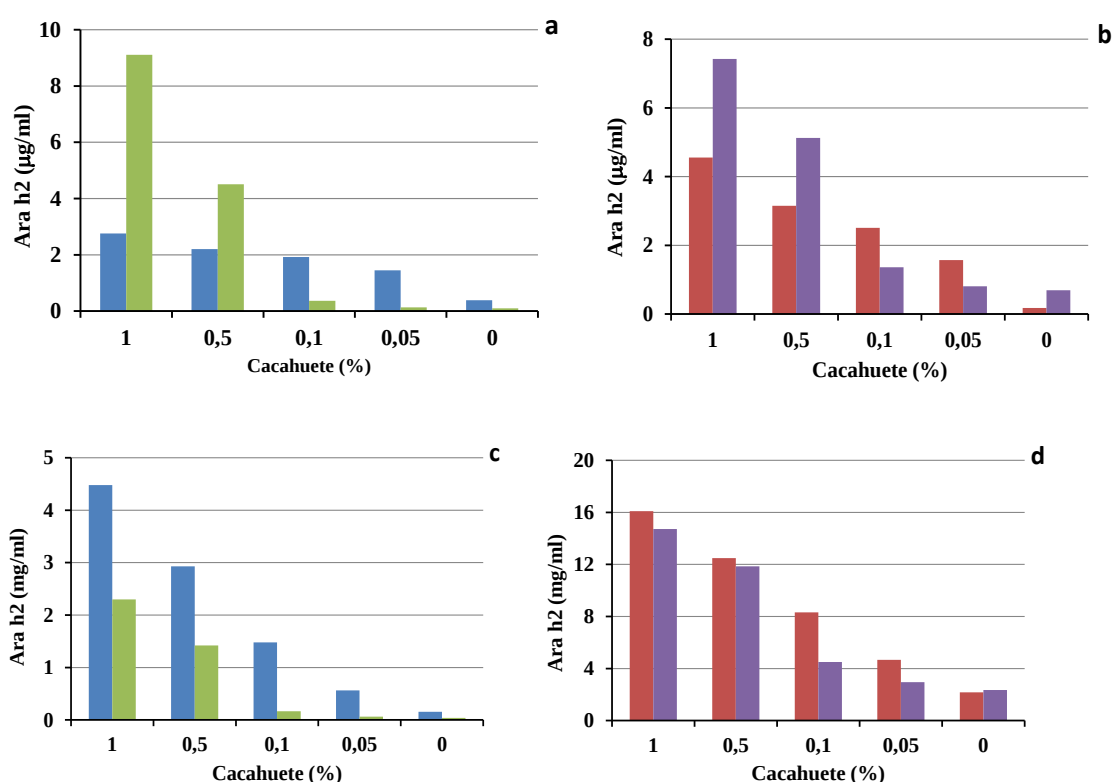


Figura 16: Análisis de muestras de chocolate conteniendo diferentes porcentajes de cacahuete mediante las técnicas de ELISA competitivo indirecto basadas en la determinación de las proteínas Ara h1 (a, b) y Ara h2 (c, d). Las muestras se extrajeron con tampón que contenía un 5% de gelatina (■, ■) o un 1% de leche en polvo (■, ■). La cuantificación de proteína se ha realizado utilizando las curvas de los estándares diluidos en PBS (■, ■) o en PBS con chocolate y un 5% de gelatina (■) o con chocolate y leche en polvo al 1% (■).

En la Tabla 3 se muestra la relación entre los valores de concentración de las proteínas Ara h1 y h2 obtenidos en la muestra de chocolate con un 0,05% de cacahuete y la muestra sin cacahuete. Esta relación es mayor para las muestras extraídas con gelatina al 5% que con leche en polvo al 1%. Esta relación interesa que sea lo más alta posible para asegurar que no se detectan falsos positivos. Por ello, considerando los resultados obtenidos en este ensayo, se deduce que la extracción de las muestras con tampón con un 5% de gelatina resulta la más adecuada para determinar la presencia de cacahuete en muestras de chocolate, aún cuando en estas condiciones sigue habiendo problemas de interferencias con la matriz, como han mostrado también otros autores al usar este bloqueantes (Pomés et al., 2004, Stephan y Vieths, 2004, Wen et al., 2005). El realizar los cálculos utilizando una determinada curva patrón dependerá de lo relevante que se considere obtener unos bajos valores de concentración en las muestras sin cacahuete.

Tabla 3. Relación entre los valores de concentración de las muestras de chocolate con y sin un 0,05% de cacahuete extraídas con tampón conteniendo como bloqueante gelatina al 5% o leche en polvo al 1%.

Curva estándar	Choc + Bloq	PBS	Choc + Bloq	PBS
Proteína	Ara h1	Ara h1	Ara h2	Ara h2
Bloqueante				
Gelatina 5%	3,6	2,2	4	9
Leche polvo 1%	1,7	1,3	1,3	1,2

En conjunto, los resultados de este trabajo preliminar indican que las técnicas desarrolladas permiten detectar la adición de un 0,05% de cacahuete en cacao puro desengrasado en las condiciones ensayadas. No obstante, habría que realizar más pruebas para determinar con precisión el valor cut-off por encima del cual una muestra se consideraría positiva para la presencia de cacahuete, así como determinar los parámetros usuales de validación de los tests desarrollados en la matriz alimentaria estudiada. Además, dada la diferente composición de los otros formatos de chocolate comerciales (tableta, chocolate a la taza, etc) que incluyen ingredientes como manteca de cacao, azúcar y espesantes, entre otros, sería conveniente estudiar si la metodología desarrollada en este trabajo se puede aplicar para la detección de cacahuete en dichas muestras.

Conclusiones

1. La inoculación de las proteínas Ara h1 y Ara h2 en conejos da lugar a la obtención de antisueros específicos que reaccionan con las proteínas correspondientes por las técnicas de inmunodotting y de western-blotting.

2. Las rectas estándar obtenidas para las técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto son lineales en un rango de concentraciones entre 50 ng/ml y 10 µg/ml, para las proteínas Ara h1 y Ara h2.

3. El chocolate produce interferencias en los ensayos de ELISA en placa, que pueden reducirse añadiendo al medio de extracción de la muestra agentes bloqueantes, tales como la gelatina y la leche en polvo. La mejor concentración de bloqueante ha sido de 5% y de 1% para la gelatina y la leche en polvo, respectivamente. El efecto de bloqueo ha resultado ser comparativamente mucho menor cuando se usa PVPP como bloqueante.

4. Las técnicas desarrolladas en este trabajo permiten detectar la adición de un 0,05% de cacahuete en muestras de chocolate, obteniéndose mejores resultados en el rango de concentraciones de cacahuete más bajos cuando se usa gelatina como agente bloqueante.

Conclusions

1. Inoculation of Ara h1 and Ara h2 proteins in rabbits give specific antiserum which react with the corresponding proteins by immunodotting and western-blotting.

2. Calibration curves were obtained for the indirect competitive ELISA techniques developed for Ara h1 and Ara h2 proteins, which were linear over a range of concentrations between 50 ng/ml and 10 µg/ml.

3. The chocolate causes interferences in the immunoassays that can be reduced by adding to the extraction medium blocking agents such as gelatin and milk powder. The best blocking concentration was found to be of 5% and 1% for gelatin and milk, respectively. The blocking effect has been found to be comparatively less efficient than using PVPP.

4. ELISA techniques developed in this work can detect the addition of 0.05% peanut in chocolate samples, obtaining the best results in the low concentration range of peanut when we using gelatin as a blocker.

Identificación de las aportaciones que, en materia de aprendizaje, han supuesto la realización de esta asignatura

Tras realizar este proyecto he podido alcanzar un conjunto de competencias propias del título, que considero útiles para desarrollar mi posterior actividad profesional en el mercado laboral sobretodo en el análisis de alimentos, tales como:

- **Buscar, analizar y sintetizar información científica** sobre un tema en particular, y utilizarla en mi proyecto personal en el diseño del trabajo experimental y en la discusión de los resultados obtenidos. Además, me ha permitido mejorar mi nivel de inglés científico, ya que prácticamente toda la bibliografía se encontraba en ese idioma.

- **Mejorar la capacidad de trabajo de manera autónoma en el laboratorio.** Gracias al trabajo de fin de grado he podido conocer más a fondo algunas de las técnicas analíticas que he estudiado en la carrera, y además aprender el manejo de equipos específicos. Realizando este trabajo he tenido que aprender a trabajar de manera autónoma, ya que he tenido que preparar personalmente los reactivos y realizar los experimentos sin la presencia del profesor. Todo ello me ha servido para desenvolverme y adquirir destreza en el trabajo sistemático de un laboratorio controlando todas las condiciones de manejo de reactivos, materiales, equipos, etc.

- **Aprendizaje de diversas técnicas inmunoquímicas.** Con la realización de este proyecto he aprendido a desarrollar técnicas inmunoquímicas y aplicarlas en el ámbito del control alimentario. Ello me permitirá poder realizar mejor el trabajo tanto en los laboratorios donde estas técnicas se usan de manera rutinaria como en los laboratorios que se dedican al desarrollo de este tipo de técnicas.

- **Trabajar en equipo.** La realización de este proyecto también ha supuesto una experiencia estimulante desde un punto de vista personal. A pesar de que he tenido que trabajar autónomamente en el laboratorio, he contado en todo momento con el apoyo y asesoramiento de los miembros del equipo de trabajo en el que me he integrado.

- **Elaborar resultados y obtener conclusiones.** A partir de los análisis experimentales que he realizado, he aprendido a elaborar los resultados de forma sistemática, utilizando programas informáticos, y a presentarlos para poder extraer de ellos unas conclusiones.

Evaluación de la asignatura y sugerencias de mejora

El trabajo de fin de grado supone un aliciente académico, con el se aprenden muchas competencias transversales tales como trabajar de forma autónoma, analizar y sintetizar información, resolver problemas y realizar análisis que se podrían encuadrar dentro de un contexto profesional. Por todo ello, considero esta asignatura una de las más importantes del Grado porque ayuda a desarrollar habilidades y destrezas que se necesitan para encaminarse al mercado laboral.

Con este trabajo he aprendido que el obtener unos resultados en un trabajo de investigación no es una tarea sencilla, y que se precisa mucha perseverancia, dedicación y paciencia para poder alcanzar los objetivos que se han planteado.

La única sugerencia de mejora que aporte sería que para conseguir un mejor aprovechamiento se necesitaría más tiempo del invertido para realizar el trabajo de fin de grado, ya que el curso académico es muy intensivo y no permite dedicar el tiempo que requeriría un trabajo de esta envergadura. Por lo tanto considero que una de las limitaciones de este estudio es el tiempo. También considero que el trabajo de fin de grado debería tener más peso en créditos en el grado, por su importancia, su implicación para el estudiante y como he comentado anteriormente por el tiempo invertido para realizarlo.

Bibliografía

- Alvarado, M. y Pérez, M. 2006. Study of food allergy in the Spanish population. *Allergology and Immunopathology*, 34, 185-193.
- Bock, S.A. y Atkins, F.M. 1990. Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *Journal of Paediatrics*, 117, 561-567.
- Bousoiio, C. 1999. Mesa redonda: Alergia e intolerancia alimentaria. Principales formas clínicas de presentación. *Boletín Pediátrico*, 39, 148-151.
- Burks, W. 2008. Peanut allergy. *Lancet* 371: 1538–46.
- Bush, R.K., y Hefle, S.L. 1996. Food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, S119-S163.
- Deibel, K., Trautman, T., DeBoom, T., Sveum, W.H., Dunaif, G., Scott, V.N. y Bernard, D.T. 1997. A comprehensive approach to reducing the risk of allergens in foods. *Journal of Food Protection*, 60, 436-441.
- Directiva 2003/89/CE, de 10 de noviembre de 2003, por la que se modifica la Directiva 2001/13/EC, en lo que respecta a la indicación de los ingredientes presentes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 308, 25 de noviembre de 2003, 15-18. Real Decreto 2220/2004.
- Directiva 2005/26/CE, de 21 de marzo de 2005, por la que se establece una lista de sustancias o ingredientes alimentarios excluidos provisionalmente del anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 75, 22 de marzo de 2005, 33-34. Real Decreto 1164/2005.
- Directiva 2006/142/CE, de 22 de diciembre de 2006, por la que se modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, en el que figura la lista de ingredientes que, en cualquier circunstancia, deben indicarse en el etiquetado de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 368, 23 de diciembre de 2006, 110-111. Real Decreto 36/2008.
- Esteban, M., y Polanco, I. 2002. Actualización en alergia alimentaria. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 9, 96-108.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995. Report of the FAO Technical Committee on Food Allergies. Rome, Italy, November, 13-14.

- Hird, H., Lloyd, J., Goodier, R., Brown, J., Reece, P. 2003. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *European Food Research and Technology* 217:265–8.
- Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A.E., y Thomas, W. 1994. Allergen nomenclature. *Bulletin of the World Health Organization*, 72, 796-806. <http://www.allergen.org>.
- Holzhauser y Vieths. 1999. Indirect Competitive ELISA for Determination of Traces of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Protein in Complex Food Matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 603-611.
- Hurst WJ, Krout ER, Burks WR. 2002. A comparison of commercially available peanut ELISA test kits on the analysis of samples of dark and milk chocolate. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 23(4):451–9.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Flabbée, J., Beaudoin, E., Morisset, M., y Thévenin, F. 2001. Population study of food allergy in France. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 133-140.
- Kiening, M., Niessner, R., Drs, E., Baumgartner, S., Krska, R., Bremer, M., Tomkies, V., Reece, P., Danks, C., Immer, V. and G.Weller, M. 2005. Sandwich Immunoassays for the Determination of Peanut and Hazelnut Traces in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3321-3327.
- King, T.P., Hoffman, D., Løwenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A., y Thomas, W. 1994. Allergen nomenclature. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 10, 224-233.
- Maleki, S.J., Viquez, O., Jacks, T., Dodo, H., Champagne, E.T., Chung, S.Y., Landry, S.J.. 2003. The major peanut allergen, Ara h2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112:190–195.
- Monaci, L., Tregoeat, V., van Hengel, A.J., y Anklam, E. 2006. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology*, 223, 149-179.
- Pomés, R. Vinton and M. D. Chapman, 2004. Peanut allergen (Ara h1) detection in foods containing chocolate. *Journal of Food Protection* 67, 793–798.
- Poms, R. E., Agazzi, M. E., Bau, A., Brohee, M., Capelletti, C., Norgaard, J. V. and Anklam, E. 2005. Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA

test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate. *Food Additives and Contaminants*, 22 (2): 104-112.

- Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio.
- Saíz, J., Montealegre, C., Marina, ML and García-Ruiz, C. 2013. Peanut Allergens: An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:722–737.
- Sampson, H.A. 2004. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 805-819.
- Sampson, H.A. y McCaskill, C.C. 1985. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *Journal of Paediatrics*, 107, 669-675.
- Shefcheck KJ, Musser SM. 2004. Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10):2785–90.
- Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. 2003. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112:1203–7.
- Stephan, O and Vieths, S. 2004. Development of a Real-Time PCR and a Sandwich ELISA for Detection of Potentially Allergenic Trace Amounts of Peanut (*Arachis hypogaea*) in Processed Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3754-3760.
- Strobel, S., y Hourihane, J. 2001. Gastrointestinal allergy: clinical symptoms and immunological mechanisms. *Pediatric Allergy and Immunology*, 12, 43-46.
- Taylor, S.L. 1986. Food allergies. *Food Technology*, 39, 98-105.
- Taylor, S.L., y Lehrer, S.B. 1996. Principles and characteristics of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(S), S91-S118.
- Wen, H.W. Borejtsza-Wysocki, W. DeCory, T.R., J. Baeumner, A y Durst, R.A. 2005. A novel extraction method for peanut allergenic proteins in chocolate and their detection by a liposome-based lateral flow assay. *European Food Research and Technology*, 221: 564–569.

- Wen, H.W. Borejjsza-Wysocki, W. DeCory, T.R., y Durst, R.A., 2007. Peanut Allergy, Peanut Allergens, and Methods for the Detection of Peanut Contamination in Food Products. Institute of Food Technologists, 6:47-58.
- Wensing, M., Penninks, A.H., Hefle, S.L., Koppelman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Knulst, A.C. 2002. The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 110:915–20.