



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS
DEL EFECTO DEL PROCESADO EN ALGUNAS
PROTEÍNAS ALERGÉNICAS Y RECOMBINANTES DE
LOS ALIMENTOS**

RUTH DE LUIS PÉREZ



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Producción Animal y Ciencia de los
Alimentos**

**ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS
DEL EFECTO DEL PROCESADO EN ALGUNAS
PROTEÍNAS ALERGÉNICAS Y RECOMBINANTES DE
LOS ALIMENTOS**

Memoria presentada por
Ruth de Luis Pérez
para optar al grado de Doctor por
la Universidad de Zaragoza



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Miguel Servet, 177 · 50013 ZARAGOZA (España)
Tfno. 976 76 21 32 – Fax 976 76 16 90

Dña. M^a Dolores Pérez Cabrejas, Profesora Titular del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, y D. Miguel Calvo Rebollar, Catedrático del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado en algunas proteínas alergénicas y recombinantes de los alimentos”, de la que es autora Ruth de Luis Pérez, ha sido realizada bajo su dirección, su contenido se corresponde con el proyecto de tesis aprobado en su momento y cumple las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

En Zaragoza, a 17 de febrero de 2009

Fdo.: M^a Dolores Pérez Cabrejas

Fdo.: Miguel Calvo Rebollar

Índice

I. INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	1
I.1. Introducción y antecedentes	3
I.2. Objetivos	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
II.1. Control de calidad: utilización de técnicas inmunoquímicas	11
II.1.1. Técnicas inmunoquímicas para la detección de proteínas en alimentos	13
II.1.1.1. Técnicas de precipitación en gel	14
II. 1.1.2. Técnicas de inmunoensayo	14
II. 1.1.3. Inmunocromatografía	16
II. 1.1.4. Inmunosensores	17
II. 1.1.5. Factores que afectan a las técnicas inmunoquímicas	17
II.2. Alergia alimentaria	19
II.2.1. Alergia alimentaria	19
II.2.2. Clasificación y nomenclatura de los alérgenos alimentarios	22
II.2.3. Legislación y etiquetado de alérgenos	23
II.2.4. Alergia a la leche bovina	27
II.2.4.1. Proteínas de la leche	27
II.2.4.2. Productos derivados de la leche	30
II.2.4.3. Alergia a las proteínas de la leche de vaca	32
II.2.4.4. Técnicas de detección de proteínas de la leche	34
II.2.5. Alergia al huevo	36
II.2.5.1. Proteínas del huevo	36
II.2.5.2. Productos derivados del huevo	37
II.2.5.3. Alergia a las proteínas del huevo	39
II.2.5.4. Técnicas de detección de proteínas del huevo	40
II.3. Maíz transgénico resistente a insectos	42
II.3.1. Organismos genéticamente modificados	42

II.3.2. Ventajas e inconvenientes del cultivo de vegetales transgénicos	45
II.3.3. Legislación sobre organismos genéticamente modificados	47
II.3.4. Maíz transgénico resistente a insectos	48
II.3.5. Toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
II.3.5.1. Clasificación y modo de acción de las toxinas Cry	51
II.3.5.2. Caracterización y propiedades de la toxina Cry1A(b)	52
II.3.5.3. Técnicas analíticas para la detección de proteínas Cry	53
III. MATERIALES Y MÉTODOS	57
III.1. Materiales	59
III.2. Métodos	60
III.2.1. Obtención de antisueros	60
III.2.2. Inmunodifusión doble	61
III.2.3. Inmunoelectroforesis	61
III.2.4. Inmunodotting	62
III.2.5. Electroferesis en gel de poliacrilamida	62
III.2.6. Inmunotransfer	63
III.2.7. Preparación de inmunoabsorbentes	63
III.2.8. Aislamiento de anticuerpos específicos	64
III.2.9. Conjugación de anticuerpos con peroxidasa	64
III.2.10. Técnicas de ELISA en placa	65
a. Técnica de ELISA no competitivo indirecto	65
b. Técnica de ELISA competitivo indirecto	66
c. Técnica de ELISA tipo sándwich	66
d. Preparación de estándares	67
e. Diseño de un estudio colaborativo para la evaluación de tests de ELISA	67
III.2.11. Inmunocromatografía	69
a. Tapizado de las microesferas con anticuerpos	69
b. Preparación del soporte inmunocromatográfico	70
c. Realización de análisis inmunocromatográfico	71

III.2.12. Aislamiento y caracterización de la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico	72
III.2.13. Elaboración de productos en planta piloto	73
a. Productos elaborados con leche y huevo en polvo	74
a.1. Salchichas	74
a.2. Pan	74
a.3. Paté	74
b. Productos elaborados con maíz	75
b.1. Maíz nixtamalizado	75
b.2. Obtención de la harina de maíz	75
b.3. Tortillas de maíz	75
b.4. Farinetas	76
III.2.14. Extracción de proteínas en muestras de alimentos	76
a. Extracción de proteínas en productos comerciales y en alimentos elaborados con leche y huevo en polvo	76
b. Extracción de proteínas en productos de maíz	76
III.2.15. Tratamiento térmico de las muestras	77
III.2.16. Análisis cinético y termodinámico	77
a. Cálculo de los valores D y Z	77
b. Análisis cinético y termodinámico	77
III.2.17. Estudio del efecto de la proteólisis con pepsina porcina en la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico	79
III.2.18. Determinación de masas moleculares por espectrometría de masas	80
IV. RESULTADOS	81
IV.1. Obtención y caracterización de antisueros	83
IV.2. Aislamiento y conjugación de anticuerpos específicos con peroxidasa	85
IV.3. Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado en la β-lactoglobulina y el ovomucoide	87
IV.3.1. Desarrollo de técnicas de ELISA en placa para la determinación de β-lactoglobulina	87

IV.3.2. Estudio del efecto del tratamiento térmico sobre la desnaturalización de la β -lactoglobulina	88
IV.3.3. Estudio del efecto del procesado de los alimentos sobre la desnaturalización de la β -lactoglobulina	90
IV.3.4. Estudio colaborativo para la evaluación de dos prototipos de tests comerciales de ELISA para la determinación de β -lactoglobulina en alimentos modelo procesados	92
IV.3.5. Determinación de β -lactoglobulina en alimentos comerciales	94
IV.3.6. Desarrollo de una técnica de inmunocromatografía para la detección de β -lactoglobulina y su aplicación en alimentos modelo procesados	97
IV.3.7. Desarrollo de técnicas de ELISA en placa para la determinación de ovomucoide	101
IV.3.8. Estudio del efecto del tratamiento térmico sobre la desnaturalización del ovomucoide	102
IV.3.9. Estudio colaborativo para la evaluación de dos prototipos de tests comerciales de ELISA para la determinación de ovomucoide en alimentos modelo procesados	103
IV.3.10. Determinación de ovomucoide en alimentos comerciales	106
IV.3.11. Desarrollo de una técnica de inmunocromatografía para la detección de ovomucoide y su aplicación en alimentos modelo procesados	108
IV.4. Estudio del efecto del tratamiento térmico y la proteólisis sobre la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico	109
IV.4.1. Aislamiento y caracterización de la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico	110
IV.4.2. Desarrollo de técnicas inmunoquímicas para la determinación de la proteína Cry1A(b)	112
IV.4.3. Efecto del tratamiento térmico sobre la proteína Cry1A(b) expresada en el maíz transgénico: determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de desnaturalización	114
IV.4.4. Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado sobre la proteína Cry1A(b)	117
IV.4.5. Estudio del efecto de la hidrólisis con pepsina sobre la proteína Cry1A(b)	121

V. DISCUSIÓN	125
V.1. Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado en la β-lactoglobulina y el ovomucoide	127
V.2. Estudio del efecto del tratamiento térmico y la proteólisis sobre la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico	138
VI. CONCLUSIONES	149
VII. BIBLIOGRAFÍA	155

I.Introducción, antecedentes y objetivos

I. INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

I.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En los últimos años el consumidor está demandando el disponer de una mayor información acerca de diversos aspectos de los alimentos que consume. Entre ellos se encuentran aspectos relacionados con la seguridad de los ingredientes utilizados en su elaboración, como por ejemplo la presencia de ingredientes alergénicos, y otros relacionados con su modo de producción, como por ejemplo la presencia de ingredientes obtenidos de organismos genéticamente modificados (Cheftel, 2005). En este contexto ha tenido lugar la implantación de nuevas normativas en el etiquetado, relativas a la presencia en los alimentos de dichos ingredientes.

La prevalencia de las alergias alimentarias está aumentando en los últimos años, y se asocia a 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 (Monaci, 2006). Hasta la fecha, se han identificado más de 160 alimentos capaces de producir alergias, pero tan sólo 8 de ellos (huevo, cacahuete, leche, frutos secos, soja, pescados, mariscos y trigo) producen más del 95% de las reacciones alérgicas (FAO, 1995; Ellman *et al.*, 2002). Los alérgenos alimentarios son proteínas, y se caracterizan por presentar una alta resistencia frente al procesado habitual que se lleva a cabo en la industria, tales como los tratamientos térmicos o ácidos, así como frente a la proteólisis por los enzimas digestivos (Taylor y Lehrer, 1996).

Las proteínas lácteas y las de huevo son muy utilizadas en la industria alimentaria debido a sus buenas propiedades funcionales, pero, como se ha indicado anteriormente, también constituyen una de las principales causas de alergia alimentaria, especialmente en

niños, con una prevalencia de alrededor del 7-8% en los menores de dos años (Matsumura *et al.*, 1975; Cant *et al.*, 1985; Zarkadas *et al.*, 1999; Kanny *et al.*, 2001). Aunque alrededor del 70% de los niños adquieren tolerancia al consumo oral de estos alimentos en los primeros 3 ó 4 años de vida, en algunos individuos la alergia a la leche de vaca y al huevo puede persistir en la edad adulta (Høst, 1997), estimándose una prevalencia en este grupo de alrededor del 2% (Bock *et al.*, 1978; Bernhisel-Broadbent *et al.*, 1994; Besler *et al.*, 2002). Los mayores alérgenos de la leche de vaca son las α y β caseínas y la β -lactoglobulina, (Bleumink y Young, 1968; Docena *et al.*, 1996; Wal, 1998), y los mayores alérgenos del huevo son el ovomucoide, la ovalbúmina y la ovotransferrina (Langeland, 1982; Hoffman, 1983).

El único método efectivo para evitar las reacciones alérgicas es evitar el consumo del alimento que causa la alergia. Por ello, resulta muy importante para un individuo alérgico conocer si un alimento contiene él o los ingredientes que le causan alergia para evitar así su consumo. Esto sería posible si en la etiqueta de los alimentos se incluyesen de manera clara todos los ingredientes empleados en su elaboración, aunque se hayan añadido en una baja proporción. Con este objetivo, en el año 2003 se publicó una lista de 12 alimentos que pueden producir alergias o intolerancias, basándose en la severidad y la prevalencia de éstas. Estos alimentos o sus derivados deben estar correctamente indicados en las etiquetas de todos los alimentos envasados que los contienen (Directiva 2003/89/EC, Real Decreto 2220/2004). Esta lista inicial está abierta a la incorporación o eliminación de otros alimentos dependiendo de las aportaciones científicas que se vayan introduciendo, de manera que se han incluido diversas modificaciones que se reflejan en nuevas Directivas y Reales Decretos (Directiva 2005/26/CE, Real Decreto 1164/2005; Directiva 2006/142/CE, Real Decreto 36/2008; Directiva 2007/68/CE, Real Decreto 1245/2008). Sin embargo, estos ingredientes alérgicos pueden encontrarse en los alimentos como alérgenos ocultos, como consecuencia de una contaminación durante el transporte o el procesado. Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas específicas y sensibles para su detección en los alimentos (Nordlee y Taylor, 1995).

Por otra parte, el cultivo de vegetales genéticamente modificados ha aumentado mucho en los últimos años. Mediante las modificaciones introducidas se pretende obtener alguna característica de interés, por medio de la introducción de un gen que codifica una nueva proteína, o de la modificación e incluso la supresión de la expresión de un gen propio. Las modificaciones genéticas más utilizadas en los cultivos vegetales son las que confieren resistencia a determinados insectos y tolerancia a ciertos herbicidas. La resistencia a insectos se consigue al insertar en la planta genes aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que codifican toxinas de la familia Cry, y que afectan principalmente a lepidópteros y coleópteros. Los principales cultivos transgénicos comercializados que expresan estas toxinas son el maíz,

la soja y el algodón (Jouanin *et al.*, 1998). En España, en 2006 se cultivaron 70.000 hectáreas de maíz transgénico resistente a insectos, lo que equivale a alrededor del 21% de la superficie sembrada con maíz en ese año (James, 2006).

El cultivo y consumo de maíz derivado de la línea MON810, que contiene la proteína Cry1A(b), fue el primero con resistencia a insectos aprobado en la UE, con fecha 22 de Abril de 1998 (Decisión de la Comisión 98/294/CE), y hasta la fecha, otros ocho eventos más de maíz transgénico resistente a insectos han sido aprobados por la Unión Europea. Los genes Cry usados en estos cultivos frente a lepidópteros son los que codifican las proteínas insecticidas Cry1A(b) y Cry1F (http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_print_en.cfm).

El cultivo de variedades transgénicas representa ventajas importantes para el agricultor, al facilitar la lucha contra plagas de insectos, lo que conlleva un aumento de la producción y una menor necesidad de uso de insecticidas (Jouanin *et al.*, 1998; Anklam *et al.*, 2002). Sin embargo, estas ventajas no resultan evidentes para los consumidores, dado que no han llegado a ellos en forma de nuevos productos de mayor calidad o de menor precio.

En los últimos años se ha cuestionado la utilización de vegetales transgénicos desde algunos sectores de la sociedad, acusándolos de representar un peligro para el medio ambiente y para la salud de los consumidores, siendo una de las principales preocupaciones la aparición de fenómenos de alergias. Esta desconfianza entre los consumidores se ha manifestado en peticiones a los gobiernos de mayores medidas de control, como la obligación de indicar la presencia de organismos genéticamente modificados (OGMs) en los alimentos que los contienen (Moseley, 1999). Como resultado, en la Unión Europea se obliga a declarar en la etiqueta la presencia de OGMs en aquellos alimentos que sean OGMs, o él o sus ingredientes contengan o estén producidos a partir de OGMs, siempre que vayan al consumidor final o a colectividades. El umbral de presencia adventicia o accidental para el etiquetado en la Unión Europea se establece en un 0,9% por ingrediente, para los OGMs autorizados, y un 0,5% para OGMs con evaluación positiva pero que no han recibido la autorización administrativa correspondiente (Reglamento 1829/2003/EC). Además, el Reglamento 1830/2003/EC introdujo un sistema armonizado para la trazabilidad y el etiquetado de los alimentos modificados genéticamente y sus derivados a lo largo de la cadena alimentaria (Reglamento 1830/2003/EC).

La creciente demanda impuesta por la legislación europea en relación al etiquetado de alimentos, y la necesidad de controlarlo, han dado lugar a que, en los últimos años, se hayan desarrollado numerosos métodos para el análisis de los alimentos basados en la detección de proteínas alergénicas y recombinantes. La detección de estas proteínas se puede llevar a cabo

directamente, mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas o inmunoquímicas (Carrera *et al.*, 1997; Mackie *et al.*, 2000; Mayer, 2005; Berrini *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006), o indirectamente, mediante técnicas genéticas, que se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de DNA que codifican una determinada proteína (Matsunaga *et al.*, 1999; Bottero *et al.*, 2002; Terzy *et al.*, 2005).

Las técnicas inmunoquímicas están basadas en el reconocimiento de una determinada proteína por los anticuerpos específicos obtenidos frente a ella. Las principales ventajas de estas técnicas son su elevada sensibilidad y especificidad, por lo que son muy apropiadas para analizar una proteína minoritaria contenida en una mezcla compleja. Otras ventajas destacables de estas técnicas son su sencillez operativa, rapidez y bajo coste (Rittenburg, 1990; Gazzar *et al.*, 1992).

La aplicación de las técnicas inmunoquímicas para el control de calidad ha experimentado un notable desarrollo y difusión en la industria alimentaria en los últimos años. Actualmente, son varios los ensayos inmunoquímicos, sobre todo los basados en la técnica de ELISA en placa y de inmunocromatografía, desarrollados para la determinación de proteínas alergénicas del huevo y de la leche (Yeung *et al.*, 2000; Hefle *et al.*, 2001; Hefle y Lambretch, 2004; Watanabe *et al.*, 2005a) y de la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico (Lipp *et al.*, 1999a y b; Walschus *et al.*, 2002; Margarit *et al.*, 2006; Roda *et al.*, 2006). Estas técnicas se han aplicado fundamentalmente en el análisis de alimentos comerciales con el objeto de comprobar si se cumple la normativa de etiquetado actualmente vigente.

Sin embargo, hay que considerar que, cuando estas técnicas van a ser aplicadas en el análisis de alimentos, la compleja naturaleza y composición de los mismos, así como los tratamientos tecnológicos a los que se han sometido durante su procesado, pueden dificultar la extracción de la proteína diana usada en el ensayo, así como la interacción de la misma con sus anticuerpos específicos (Besler *et al.*, 2001).

Por todo ello, es necesario realizar estudios que permitan determinar la termorresistencia de las proteínas utilizadas como diana en los análisis inmunoquímicos, así como elaborar alimentos modelo que las contengan para determinar el efecto que las distintas condiciones del procesado tienen sobre ellas. Estos estudios permitirían conocer las limitaciones que las técnicas inmunoquímicas tienen cuando van a ser aplicadas en el análisis de alimentos que han sido sometidos a un procesado industrial.

I.2. OBJETIVOS

En el proyecto de Tesis que se presenta se ha planteado como objetivo global el determinar, mediante técnicas inmunoquímicas, el efecto que tienen los tratamientos térmicos y el procesado de los alimentos sobre las proteínas alergénicas β -lactoglobulina y ovomucoide, y sobre la proteína recombinante Cry1A(b). Este estudio permitiría conocer las limitaciones que dichas técnicas tienen cuando se van a aplicar en el análisis de alimentos procesados.

Para llevar a cabo este objetivo global, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

Con relación a la detección de proteínas alergénicas:

1. Desarrollar técnicas inmunoquímicas cuantitativas (ELISA en placa de tipo competitivo indirecto y sándwich), y un test cualitativo rápido de inmunocromatografía, para la determinación de las proteínas alergénicas β -lactoglobulina y ovomucoide presentes en la leche y en el huevo, respectivamente.
2. Estudiar el efecto que tienen tratamientos térmicos de diferente intensidad sobre la inmunorreactividad de la β -lactoglobulina y del ovomucoide.
3. Estudiar el efecto que tienen distintos tipos de procesado de los alimentos (pasterización, horneado y esterilización) sobre la determinación de la β -lactoglobulina y el ovomucoide en alimentos modelo elaborados con distintas cantidades de leche y huevo en polvo.
4. Realizar un estudio colaborativo para evaluar y comparar las técnicas de ELISA en placa desarrolladas para la detección de β -lactoglobulina y ovomucoide utilizando alimentos modelo procesados.
5. Determinar la presencia o ausencia de β -lactoglobulina y ovomucoide en alimentos comerciales para comprobar si se cumple la normativa vigente de etiquetado de alérgenos.

Con relación a la detección de la proteína recombinante Cry1A(b):

6. Desarrollar técnicas inmunoquímicas cuantitativas (ELISA en placa de tipo sándwich), y un test cualitativo rápido de inmunocromatografía, para la determinación de la proteína recombinante Cry1A(b) presente en el maíz transgénico.
7. Estudiar la termorresistencia de la proteína Cry1A(b) expresada en el maíz transgénico y calcular los parámetros cinéticos y termodinámicos de su desnaturalización.

8. Estudiar el efecto que tienen distintos tipos de procesado del maíz (nixtamalización, fritura, plancha y cocción) sobre la determinación de la proteína recombinante Cry1A(b) en alimentos modelo elaborados con harina de maíz transgénico.
9. Estudiar el efecto que tiene la digestión con pepsina sobre la proteína Cry1A(b) aislada del maíz transgénico.

II.Revisión bibliográfica

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. CONTROL DE CALIDAD: UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS

La calidad de un alimento es un concepto que viene determinado por la conjunción de distintos factores, relacionados todos ellos con su aceptabilidad por parte del consumidor. Existen distintas acepciones al término de calidad de un alimento: calidad higiénico-sanitaria, nutricional, sensorial, económica y estable (Bello, 2000).

La calidad higiénico-sanitaria hace referencia a la ausencia tanto de sustancias potencialmente tóxicas como de microorganismos patógenos. También asegura que su carga microbiana responda a los niveles de microorganismos, tanto patógenos como alterantes, admitidos por la legislación. La calidad nutricional se refiere a la contribución del alimento al aporte total de nutrientes de la dieta, tanto de un modo cualitativo como cuantitativo. La calidad sensorial viene determinada por aquellos atributos del alimento que son percibidos por los sentidos, y es la que más relación tiene con su aceptabilidad. La calidad económica hace referencia a la relación que existe entre el coste de producción y el grado de aceptabilidad que consigue, cumpliendo todas las exigencias requeridas por la legislación vigente, tanto las específicas como las de carácter general en los productos y los procesos de toda la cadena de producción. La calidad estable está relacionada con la aptitud del alimento para no sufrir alteraciones, lo que garantiza una vida comercial adecuada (Bello, 2000).

El etiquetado de los alimentos constituye la referencia informativa básica para el consumidor, y le aporta la información necesaria para poder identificarlo y compararlo con

otros productos que se encuentran en el mercado. La normativa sobre etiquetado de los alimentos tiene como objetivo fundamental la protección del consumidor. Estas normas están sometidas al derecho alimentario propio de cada país, aunque existen organismos internacionales como la FAO o la OMS que armonizan un conjunto de "buenas prácticas" que sirven de referencia común a los países. En España, en el Real Decreto 1334/1999 (Directiva 97/4/CE) se publicó la Norma General de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. Esta normativa ha sido modificada posteriormente por la Directiva 2000/13/EC (Real Decreto 2220/2004) y otras posteriores. Las normas de etiquetado se aplican a la información relativa a las características del alimento, como naturaleza, identidad, propiedades, composición, vida útil, origen o método de producción, entre otros, de manera que todos los alimentos deben poseer una adecuada identificación que garantice que lo expresado en los envases y etiquetas se corresponde con el contenido de forma inequívoca (Reglamento 2002/178/EC).

Entre los aspectos a reflejar en el etiquetado de los alimentos, se encuentran aquellos relacionados con la seguridad de los ingredientes utilizados en la elaboración de un alimento, como por ejemplo la presencia de ingredientes alergénicos. En el año 2003 se publicó una lista de 12 alimentos que pueden producir alergias o intolerancias, basándose en la severidad y la prevalencia de éstas. Estos alimentos deben estar correctamente indicados en las etiquetas de todos los alimentos envasados (Directiva 2003/89/EC, Real Decreto 2220/2004). Esta lista está abierta a la incorporación o eliminación de otros ingredientes dependiendo de las aportaciones científicas que se vayan introduciendo, de manera que, en los años siguientes, se han incluido diversas modificaciones que se reflejan en nuevas Directivas y Reales Decretos (Directiva 2005/26/CE, Real Decreto 1164/2005; Directiva 2006/142/CE, Real Decreto 36/2008; Directiva 2007/68/CE, Real Decreto 1245/2008).

Por otra parte, el hecho de que los organismos genéticamente modificados (OGMs) entraran en la cadena alimenticia hace ya una década, y de que se hayan producido diversos debates públicos sobre ellos, ha dado lugar al desarrollo de una normativa acerca de su etiquetado en la Unión Europea. Dicha normativa obliga a declarar en la etiqueta la presencia de OGMs en aquellos alimentos que sean OGMs, o él o sus ingredientes contengan o estén producidos a partir de OGMs. El umbral de presencia adventicia o accidental para el etiquetado se establece en un 0,9% por ingrediente, para los OGMs autorizados en la Unión Europea, y un 0,5% para OGMs con evaluación positiva pero que no han recibido la autorización administrativa correspondiente en la Unión Europea (Reglamento 1829/2003/EC).

La creciente demanda impuesta por la legislación europea con relación al etiquetado de alimentos, y la necesidad de controlar este etiquetado, han dado lugar a que, en los últimos años, se hayan desarrollado numerosos métodos para el análisis de los alimentos basados en la detección de proteínas específicas en productos alimentarios, como la detección de proteínas alergénicas, o de las proteínas recombinantes expresadas en los organismos genéticamente modificados.

II.1.1. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN ALIMENTOS

La detección de proteínas alimentarias se realiza, fundamentalmente, mediante la utilización de técnicas electroforéticas, cromatográficas e inmunoquímicas (Carrera *et al.*, 1997; Mackie *et al.*, 2000; Mayer, 2005; Berrini *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006). En algunas ocasiones se utilizan también técnicas genéticas, que se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de DNA que codifican una determinada proteína (Matsunaga *et al.*, 1999; Bottero *et al.*, 2002; Terzy *et al.*, 2005).

Las técnicas electroforéticas y cromatográficas han demostrado ser útiles para la identificación de numerosas proteínas en alimentos, y se han aplicado fundamentalmente en la detección de fraudes por sustitución de especies en productos lácteos, cárnicos y en pescado. Sin embargo, debido a su baja sensibilidad y a la dificultad de estandarización, estas técnicas no resultan muy adecuadas para análisis de rutina en la industria alimentaria (Bonneto *et al.*, 1986; Carrera *et al.*, 1997; Mackie *et al.*, 2000; Mayer, 2005; Berrini *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006).

Las técnicas genéticas son muy específicas y sensibles, y presentan la ventaja de que el DNA se ve en general menos afectado que las proteínas por los tratamientos tecnológicos. Sin embargo, estas técnicas son largas y laboriosas, requieren personal cualificado para su realización, y precisan de una considerable inversión económica en reactivos y equipos. Además, la aplicación de las técnicas genéticas se ve limitada si durante el procesado tiene lugar una separación de componentes, como es el caso de la obtención de productos proteicos alimentarios.

Las técnicas inmunoquímicas están basadas en la reacción específica entre una proteína y los anticuerpos específicos obtenidos frente a ella. Estas técnicas presentan una elevada sensibilidad y especificidad, lo que las hace muy apropiadas para identificar una proteína minoritaria contenida en un alimento complejo. Otras ventajas de estas técnicas son su

sencillez operativa, rapidez y bajo coste, además de ser fácilmente automatizables, y de que los reactivos que se utilizan son muy estables (Rittenburg 1990; Gazzar *et al.*, 1992).

Por todo ello, en los últimos años, se han desarrollado numerosas técnicas inmunoquímicas para la detección de proteínas específicas, que se están utilizando en el control de calidad en la industria alimentaria. Estas técnicas se están aplicando actualmente para detectar fraudes por sustitución de especies, principalmente en productos cárnicos y lácteos, para la detección de bacterias patógenas y sus toxinas, así como para identificar alérgenos alimentarios y alimentos transgénicos (Fukal, 1991; Samarajeewa *et al.*, 1991; González *et al.*, 1993; Anguita *et al.*, 1995; Asensio *et al.*, 2008).

Las técnicas inmunoquímicas aplicadas en el análisis de alimentos incluyen las técnicas de precipitación en gel, las técnicas de inmunoensayo, la inmunocromatografía y los inmunosensores.

II.1.1.1. Técnicas de precipitación en gel

Son aquellas en las que la reacción antígeno-anticuerpo da lugar a un complejo que forma un precipitado visible. Las más usadas son la inmunodifusión doble, que es cualitativa, y la inmunodifusión radial, que es cuantitativa (Kang'ethe *et al.*, 1986).

Estas técnicas fueron las primeras técnicas inmunoquímicas que se aplicaron en el análisis de alimentos. Son técnicas muy sencillas de realizar, cuyo resultado se observa visualmente, no requiriendo la utilización de ningún equipo. Sin embargo, dado que poseen una baja sensibilidad, del orden de $\mu\text{g/mL}$, y que la formación del precipitado requiere un tiempo largo, 24-48 horas, han sido reemplazadas por otras técnicas inmunoquímicas más sensibles y rápidas.

II.1.1.2. Técnicas de inmunoensayo

Las técnicas de inmunoensayo son aquellas en las que se emplean antígenos o anticuerpos marcados con enzimas, isótopos radiactivos o sustancias fluorescentes (Andrews, 1992). De ellas, las técnicas inmunoenzimáticas, conocidas con el acrónimo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) son las que más se emplean en la actualidad en el análisis de alimentos.

En estas técnicas, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza al añadir un sustrato del enzima marcador, que da lugar a la formación de un producto coloreado. Estas técnicas tienen una gran sensibilidad, del orden de ng/mL, y son muy rápidas, ya que el ensayo se completa en 2-4 horas.

Los enzimas que se utilizan como marcadores con mayor frecuencia son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina. Los sustratos más usados para la peroxidasa son la *o*-fenilendiamina (OPD), el ácido sulfónico de la 2,2' azido bis-(3 etil-benzotiazolina) (ABTS) y la tetrametilbenzidina (TMB), y para la fosfatasa alcalina el *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP).

La técnica de inmunodotting es un tipo de inmunoensayo que utiliza como soporte una membrana, generalmente de nitrocelulosa o de nylon. En la variante más sencilla, la muestra que se desea analizar se deposita en forma de gota en la membrana. Posteriormente, la membrana se satura con una solución proteica inerte y se incuba con anticuerpos marcados enzimáticamente que son específicos para la proteína diana que se quiere detectar. Tras el lavado de la membrana, ésta se incuba con el sustrato del enzima. La aparición de una mancha coloreada en el punto de aplicación de la muestra indica que ésta contiene la proteína diana.

En la técnica de inmunotransfer o Western-blotting las proteínas se separan previamente mediante una electroforesis y se transfieren a una membrana. Posteriormente, la detección se realiza de igual modo a como se ha indicado en el inmunodotting (Bonnefoi *et al.*, 1986). La presencia de una banda coloreada indica que la muestra contiene la proteína diana.

El inmunodotting y el inmunotransfer son técnicas cualitativas, aunque dependiendo de la intensidad de la mancha o de la banda electroforética pueden considerarse semicuantitativas (Blais y Philippe, 2000).

Las técnicas inmunoenzimáticas más usadas son aquellas en la que el ensayo se realiza sobre placas de pocillos de material plástico (Hefle *et al.*, 1992; Poms *et al.*, 2004). En estas técnicas, la acción del enzima utilizado como marcador sobre el sustrato da lugar a la formación de un producto coloreado cuya intensidad puede determinarse espectrofotométricamente. Los lectores de placas de ELISA disponibles en el mercado poseen filtros de diferentes longitudes de onda, que se corresponden con las de los cromógenos más utilizados, lo que permite la automatización del ensayo al realizar la lectura de un gran número de muestras en un tiempo muy corto. La incorporación en el ensayo de una serie de estándares de la proteína a detectar permite obtener una curva de calibración y, por intrapolación, la determinación de la cantidad de proteína presente en la muestra problema.

Los dos formatos de ELISA en placa más empleados son el sándwich y el competitivo indirecto, siendo éste último el más adecuado en el caso de querer detectar proteínas de bajo peso molecular.

En el formato de tipo sándwich, la proteína diana es capturada por los anticuerpos específicos que tapizan el pocillo, y el complejo es detectado por la adición de anticuerpos específicos marcados que se unen a la proteína formando un sándwich. En este formato la absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la concentración de proteína presente en la misma.

El formato competitivo indirecto se basa en la competición entre la proteína diana presente en la muestra y la fijada al pocillo por la unión con sus anticuerpos específicos. La detección del complejo formado se realiza mediante la adición de IgGs marcadas que interaccionan con los anticuerpos que han reaccionado con la proteína fijada al pocillo. En este formato, la absorbancia de la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la misma.

II.1.1.3. Inmunocromatografía

En los últimos años se ha desarrollado una nueva técnica inmunoquímica denominada inmunocromatografía, o lateral flow test.

En esta técnica, los anticuerpos específicos, tapizados en la superficie de microesferas de poliestireno coloreado o de oro coloidal, reaccionan con la proteína diana presente en la muestra, y el complejo formado asciende por capilaridad a lo largo de una membrana de nitrocelulosa o nylon que contiene anticuerpos específicos inmovilizados en una fina línea. El complejo es capturado por los anticuerpos inmovilizados, y la presencia de la proteína en la muestra problema se visualiza por la aparición de una línea coloreada en la membrana (Van Herwijnen, 2006).

Este tipo de ensayo presenta una alta sensibilidad, del orden de ng/mL, es muy sencillo de realizar, y se completa en unos 10 minutos. Estas características han hecho que su implantación en el ámbito comercial haya sido un éxito, constituyendo actualmente la técnica de elección como prueba cualitativa rápida. Además, la utilización de un pequeño escáner, ya comercializado, permite determinar la intensidad de la banda coloreada, obteniéndose un resultado semicuantitativo.

II.1.1.4. Inmunosensores

Una tecnología emergente en el campo de la detección de proteínas alimentarias utilizando anticuerpos es el desarrollo de inmunosensores. Esta tecnología está basada en la inmovilización de anticuerpos específicos para una determinada proteína en la superficie de un chip, de forma que al reaccionar con ella se produce un cambio en las propiedades físicas, normalmente en el índice de refracción, que es monitorizado *in situ* (Jonsson *et al.*, 2006). Las principales ventajas de esta técnica son el alto grado de automatización que puede obtenerse y la rapidez, ya que pueden realizarse en 5-10 minutos, lo que permite realizar determinaciones en línea en tiempo real. Además, se trata de técnicas muy sensibles, con límites de detección del orden de ng/mL (Haasnot *et al.*, 2001; Rasooly, 2001).

Los inmunosensores que utilizan la técnica de resonancia de plasma superficial (SPR) se han aplicado para la detección de alérgenos, como cacahuete y β -lactoglobulina (Jonsson *et al.*, 2001; Mohammed *et al.*, 2001; Hohensinner *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque existen diversos trabajos en el ámbito experimental, hasta el momento los inmunosensores para la detección de proteínas alimentarias no están disponibles comercialmente.

II.1.1.5. Factores que afectan a las técnicas inmunoquímicas

La efectividad de una técnica inmunoquímica para la determinación de proteínas en alimentos depende de la naturaleza de la proteína utilizada como diana (antígeno), de las propiedades de los anticuerpos obtenidos y del formato del ensayo usado en el análisis (Nordlee y Taylor, 1995; Immer, 2006).

La naturaleza del antígeno (composición y estructura) influye en su inmunogenicidad, es decir, en la capacidad para inducir la síntesis de anticuerpos en el animal inoculado, y en su antigenicidad, es decir, en la capacidad para reaccionar con los anticuerpos sintetizados (Yeung, 2006).

Los anticuerpos ideales son aquellos que poseen una alta afinidad y especificidad por la proteína diana. La afinidad es el principal factor para alcanzar un nivel de detección adecuado, y la especificidad un requisito indispensable para identificarlo en una mezcla compleja sin problemas de reacciones cruzadas (Nordlee y Taylor, 1995; Hefle *et al.*, 2006). Los anticuerpos utilizados en las técnicas inmunoquímicas pueden ser monoclonales o

policlonales. Los anticuerpos policlonales reconocen múltiples epítopos de una proteína, mientras que los monoclonales se unen a un único epítipo de la misma. Por ello, los anticuerpos monoclonales pierden la capacidad de interactuar con la proteína diana si el epítipo reconocido está alterado como consecuencia de los tratamientos tecnológicos, mientras que los anticuerpos policlonales muestran una mayor tolerancia a modificaciones de la proteína, por lo que resultan de elección cuando se analizan alimentos procesados. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales suelen tener una mayor especificidad que los policlonales al presentar menos problemas de reactividad cruzada con otros componentes. Este problema es especialmente importante cuando se quieren diferenciar proteínas de especies filogenéticamente próximas, lo que obliga a llevar a cabo una monoespecificación si se usan anticuerpos policlonales, que se realiza generalmente por inmunoadsorción (Rittenburg, 1990).

Las características intrínsecas del formato utilizado pueden influir también en la determinación de la proteína diana. Así, en el formato de sándwich, la proteína debe ser reconocida por dos anticuerpos, mientras que, en el competitivo sólo es necesario que la proteína sea reconocida por uno. Además, en el formato de sándwich los anticuerpos inmovilizados en el soporte capturan la proteína soluble presente en la muestra, mientras que en el competitivo la proteína presente en la muestra compite con la proteína fijada a la placa por la unión con los anticuerpos (Rittenburg, 1990). Esta diferencia puede ser importante, dado que la accesibilidad de los epítopos de la proteína adsorbida puede ser distinta a la de la proteína en solución (Yeung, 2006).

La naturaleza y composición del alimento a analizar, así como los tratamientos tecnológicos utilizados durante su procesado, pueden también influir notablemente en la extracción de la proteína y en su capacidad para interactuar con los anticuerpos (Nordlee y Taylor, 1995; Poms *et al.*, 2004). El procedimiento de extracción ideal debería permitir una completa extracción de la proteína diana del alimento que lo contiene. Sin embargo, este objetivo es a menudo difícil de alcanzar debido a la naturaleza del alimento (sólidos, emulsiones, espumas...), a la heterogénea distribución de los ingredientes y, sobre todo, a su composición compleja. En ocasiones, la interacción de la proteína diana con algunos componentes dificulta su extracción, como sucede en alimentos con un elevado contenido graso, o enmascara epítopos reconocidos por los anticuerpos, como es el caso de los taninos del chocolate. Estas interferencias se conocen en conjunto como efecto matriz del alimento (Poms *et al.*, 2004; Immer, 2006).

El efecto del procesado constituye probablemente el principal problema al utilizar técnicas inmunoquímicas para determinar proteínas alimentarias. Los tratamientos tecnológicos pueden alterar la solubilidad de la proteína, dificultando su extracción. Además,

dichos tratamientos pueden desnaturalizar la proteína, destruyendo epítomos que son reconocidos por los anticuerpos, y/o inducir la agregación de la proteína con otros componentes, enmascarando así sus determinantes antigénicos (Poms *et al.*, 2004).

La cuantificación de una proteína en un alimento mediante técnicas de inmunoensayo se realiza normalmente por intrapolación a partir de una curva de calibración obtenida con estándares que pueden estar compuestos por la proteína purificada o por un ingrediente que contiene dicha proteína. Sin embargo, la utilización de estos estándares puede dar lugar a una cuantificación que no se ajuste a la cantidad real de proteína presente en una muestra debido al efecto matriz y al efecto del procesado. Por ello, el análisis de alimentos modelo, en los que la proteína se añade como tal o como parte de un ingrediente antes del procesado permitiría conocer la aplicabilidad y las limitaciones de una determinada técnica en el análisis de alimentos reales (Poms *et al.*, 2004; Poms, 2006).

II.2. ALERGIA ALIMENTARIA

II.2.1. 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). Estas reacciones pueden estar mediadas por inmunoglobulinas de la clase E (IgE), en cuyo caso se observa una alta concentración en la sangre de esta clase de inmunoglobulinas frente al alérgeno, o bien mediadas por cualquier otro mecanismo inmunológico conocido, encontrándose entonces un aumento de otras clases de inmunoglobulinas frente al alérgeno, de complejos inmunes o de una inmunidad mediada por células. En muchos pacientes, puede tener lugar simultáneamente una inmunidad mixta, mediada por inmunoglobulinas y células (Strobel y Hourihane, 2001).

Las reacciones alérgicas a alimentos deben distinguirse de las reacciones de intolerancia y de las intoxicaciones. Estas dos últimas se caracterizan por ser dependientes de la dosis, es decir, las manifestaciones clínicas que producen son tanto más intensas cuanto mayor es la cantidad de alimento ingerido. Sin embargo, esta relación dosis-respuesta no existe en las reacciones alérgicas, de tal forma que, en algunos casos, dosis muy pequeñas pueden dar lugar a una respuesta clínica exagerada. Otra característica peculiar de las intoxicaciones es que pueden ocurrir en cualquier individuo, siempre que se ingiera el alimento en cantidad suficiente. En cambio, tanto en las reacciones alérgicas como en las de

intolerancia, la aparición de manifestaciones clínicas tras la ingestión de un producto determinado está únicamente en relación con las características del individuo, de tal forma que esa misma dosis puede ser perfectamente tolerada por otro individuo (Martín Esteban y Polanco, 2002).

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.

La prevalencia de la alergia alimentaria en general y a cada uno de los alimentos en particular varía con los hábitos alimentarios, lo que condiciona una distribución heterogénea en los distintos países y en los diferentes periodos de la vida (Leduc *et al.*, 1996). Las alergias alimentarias son más comunes en los niños que en los adultos (Sampson, 1990), debido probablemente a que el sistema digestivo de los niños está menos desarrollado, y por tanto es más permeable al paso de proteínas parcialmente digeridas. En Europa se estima que la prevalencia de la alergia alimentaria en niños varía entre el 6 y el 8%, y en los adultos entre el 2 y el 3% (Sampson y Metcalfe, 1992; <http://www.agrodigital.com>).

En los últimos años se está observando un incremento en la prevalencia de las alergias. Las razones de este incremento se han asociado a cambios en los hábitos alimentarios de la población y a la mayor complejidad de los ingredientes y de los procesos tecnológicos utilizados actualmente en la industria alimentaria (Monaci, 2006).

Las manifestaciones clínicas de las alergias mediadas por IgE suelen aparecer de una a dos horas tras la ingesta del alimento, por lo que se denominan alergias de tipo inmediato. La sintomatología corresponde fundamentalmente a alteraciones en la piel y en el tracto gastrointestinal. Los síntomas cutáneos más comunes son urticaria, que suele ir acompañada de una prurito intenso y de localización variable, eritema y angioedema. Los síntomas digestivos más comunes son náuseas, vómitos y diarrea, aislados o en combinación, y se dan con mayor frecuencia en niños de corta edad. Además, existen numerosos estudios en los que se indica que las personas que padecen dermatitis atópica tienen una mayor predisposición a presentar alergias alimentarias. En los pacientes con una intensa sensibilidad a los alimentos, la alergia puede llegar a provocar una reacción anafiláctica. En esta reacción suelen estar afectados múltiples sistemas (digestivo, respiratorio, cardiovascular y piel) dando lugar a una

sintomatología muy variada. La reacción puede llegar a provocar un choque anafiláctico, que en ocasiones puede conducir a la muerte. Afortunadamente, los episodios de anafilaxia son poco comunes, ya que aparecen aproximadamente en el 1-2% de los alérgicos.

Los procesos alérgicos no mediados por IgE, en cambio, suelen tener un comienzo tardío en relación con el momento de la ingesta, y suelen manifestarse por síntomas gastrointestinales como enteropatías, con o sin mala absorción, colitis y lesiones de la mucosa intestinal (Boussoii, 1999).

El diagnóstico de la alergia de tipo inmediato se plantea normalmente a dos niveles, ya sea mediante la realización de un diagnóstico clínico, que incluye la historia clínica y la prueba de provocación, o mediante un diagnóstico patogénico del mecanismo inmunológico, demostrando la presencia de IgE específicas para el alimento sospechoso (Martín 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. Se ha comprobado que las dietas de eliminación conducen a la pérdida de reactividad a muchos alimentos (desarrollo de tolerancia clínica) en alrededor de un tercio de los niños y adultos después de uno o dos años. El desarrollo de la tolerancia parece depender mucho del alérgeno implicado, ya que se ha mostrado que los niños sensibles a la soja, la leche, los huevos y el trigo, pierden en muchos casos su reactividad clínica tras varios años de eliminación de los alérgenos en su dieta, mientras que no ocurre lo mismo en el caso de la alergia a los cacahuets, a las nueces, al pescado o al marisco, de manera que estos son los alimentos más comúnmente asociados con reacciones alérgicas en jóvenes y adultos (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).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios que están abriendo algunas perspectivas en el tratamiento de las alergias alimentarias. La elaboración de alimentos hipoalergénicos es ya un hecho en el campo de las leches infantiles, en el que existen numerosas fórmulas de hidrolizados de proteínas de leche de vaca que son bien toleradas por muchos lactantes alérgicos a dicha leche. La administración de anticuerpos monoclonales anti-IgE humanas que bloquean la unión de las IgE a los receptores de los mastocitos y basófilos, y así inhiben la liberación de las sustancias activas que desarrollan el cuadro alérgico, es otra alternativa en estudio. Los resultados obtenidos hasta el momento en pacientes que presentan alergia a los cacahuets parecen ser bastante prometedores, ya que se produce un incremento significativo en la cantidad de proteína necesaria para inducir la

aparición de síntomas en pacientes sensibilizados. Si estos resultados se confirmaran, la administración de anti-IgE humanas podría extenderse al tratamiento de pacientes que presentaran una alergia mediada por IgE frente a cualquier alimento (Nowak-Wegrzyn, 2003).

El uso de la inmunoterapia, es decir, la terapia a base de vacunas con dosis bajas del alérgeno para inducir tolerancia es otra alternativa en estudio. En el caso del cacahuete, se ha observado que un alto porcentaje de pacientes tratados mejoraron la tolerancia oral al consumo de cacahuete. Sin embargo, la tasa de reacciones adversas debidas a las inyecciones es muy alta, por lo que por el momento se desaconseja su utilización (Nelson *et al.*, 1997).

II.2.2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LOS ALÉRGENOS ALIMENTARIOS

Se han identificado más de 160 alimentos capaces de producir alergias, pero tan sólo 8 de ellos producen más del 95% de las reacciones alérgicas (FAO, 1995; Ellman *et al.*, 2002). En orden descendiente de frecuencia, éstos son: huevo, cacahuete, leche, frutos secos, soja, pescados, mariscos y trigo (Schwartz, 1992; Poms *et al.*, 2004).

La mayor parte de los alérgenos presentes en los alimentos son glicoproteínas, y tienen un peso molecular entre 10 y 70 kDa y un punto isoeléctrico ácido (Taylor *et al.*, 1987). Aunque moléculas más pequeñas pueden ser inmunógenas, parece ser que 10 kDa representa el límite inferior para dar lugar a una respuesta alérgica. El límite superior es probablemente el resultado de la absorción restringida de la mucosa del intestino al paso de moléculas más grandes (Taylor *et al.*, 1987; Metcalfe *et al.*, 1996; Taylor y Lehrer, 1996; Taylor y Hefle, 2001).

Los alérgenos alimentarios suelen ser resistentes al procesado habitual que se lleva a cabo en la industria, tales como los tratamientos térmicos, ácidos, y la fermentación, aunque hay excepciones (Taylor y Lehrer, 1996).

Los alérgenos alimentarios pueden ser tanto de origen vegetal como de origen animal. La mayor parte de los alérgenos vegetales están incluidos en tres superfamilias; cupinas, prolaminas y papaínas. La superfamilia de las cupinas incluye las vicilinas y las leguminas, que son las proteínas de reserva de las leguminosas y los frutos secos. En la superfamilia de las prolaminas se incluyen las albúminas 2S, presentes en la mostaza o el sésamo, las proteínas de transferencia de lípidos, presentes en frutas como la manzana o el melocotón, y

las prolaminas de los cereales. La superfamilia de las papaínas incluye proteínas presentes en la soja y en frutas, como el kiwi o la piña.

Los alérgenos de origen animal pertenecen a un número más limitado de familias. Entre ellas destacan las familias de las parvalbúminas y las tropomiosinas, presentes en numerosas especies de pescado, crustáceos y moluscos. En el caso del huevo y de la leche, se han identificado varias proteínas alergénicas que pertenecen a diferentes familias. En el huevo destacan el ovomucoide, la ovoalbúmina y la ovotransferrina, y en la leche la α y β caseína, la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina.

En algunas ocasiones se producen fenómenos de reactividad cruzada entre proteínas que no tienen una relación taxonómica directa, pero que son reconocidas por un mismo tipo de IgE (Aalberse *et al.*, 2001), como es el caso de los denominados síndromes polen-frutas (Vieths *et al.*, 2002), látex-frutas (Blanco, 2003) o ácaros-marisco (Fernandes *et al.*, 2003).

Los alérgenos se han clasificado en dos grandes grupos según su prevalencia. Los alérgenos mayores se definen como las proteínas alergénicas frente a las que un 50% o más de los pacientes alérgicos a ese alimento elaboran IgE específicas (King *et al.*, 1994). Ejemplos de alérgenos mayores son la araquina y la conaraquina del cacahuete (Burks *et al.*, 1991), el ovomucoide, la ovoalbúmina, y la ovotransferrina del huevo (Langeland y Harbitz, 1983), y las caseínas y la β -lactoglobulina de la leche bovina (Bush y Hefle, 1996). Los alérgenos menores, en cambio, son aquellas proteínas alergénicas frente a las que menos del 50% de los pacientes alérgicos elaboran IgE específicas.

Los alérgenos alimentarios se designan de acuerdo a un sistema de nomenclatura taxonómico que consta de cuatro letras y un número. Las tres primeras letras, que van juntas, corresponden al género, la cuarta a la especie, y el número al orden de identificación del alérgeno dentro de cada especie (Hoffman *et al.*, 1994; King *et al.*, 1994). Como ejemplo, los primeros alérgenos descritos en el huevo de gallina, *Gallus domesticus*, fueron el ovomucoide (*Gal d 1*), la ovoalbúmina (*Gal d 2*) y la ovotransferrina (*Gal d 3*).

II.2.3. LEGISLACIÓN Y ETIQUETADO DE ALÉRGENOS

Resulta muy importante para un individuo alérgico conocer si un alimento contiene él o las proteínas que le causan una alergia para evitar así su consumo. Esto sería posible si en la etiqueta de los alimentos se incluyesen de manera clara todos los ingredientes empleados en su elaboración, aunque se hayan añadido en una baja proporción. La Directiva 2000/13/CE

(Real Decreto 2220/2004) exigía incluir en la etiqueta los ingredientes cuya proporción en peso fuera superior al 25% del producto final, lo que podía suponer un riesgo para el consumidor alérgico si el alimento al que era sensible estaba en una menor proporción. Con fecha 10 de noviembre de 2003 se publicó la nueva Directiva 2003/89/CE del Parlamento y del Consejo Europeos (Real Decreto 2220/2004) que modificó la normativa de etiquetado vigente. Esta modificación tenía como objetivo fundamental hacer obligatoria la mención en la etiqueta de los alimentos de 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. Para llevar a cabo una adecuada implementación de la normativa de etiquetado, se publicó también una “guía de aplicación” en la que se indicaba cómo deben aparecer los ingredientes alergénicos en la etiqueta de un alimento, fundamentalmente en lo que respecta a su denominación y localización.

En los años siguientes se han incluido diversas modificaciones a esta normativa. Así, en la Directiva 2005/26/CE (Real Decreto 1164/2005) se estableció una lista de ingredientes derivados de algunos alimentos que quedaban excluidos provisionalmente de la lista publicada en el 2003, y en la Directiva 2006/142/CE (Real Decreto 36/2008) se incluyeron en la lista de alimentos alergénicos los altramuces y los moluscos. Recientemente, en la Directiva 2007/68/CE (Real Decreto 1245/2008), que entró en vigor el 27/11/07, se publicó la lista completa que incluía los dos alimentos recientemente incorporados y los ingredientes definitivamente excluidos. Esta lista está abierta a la incorporación o eliminación de otros alimentos dependiendo de las aportaciones científicas que se vayan introduciendo con el tiempo. Esta lista incluye los siguientes alimentos:

1. Cereales que contengan gluten (es decir, trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas) y productos derivados, salvo:
 - a) jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa;
 - b) maltodextrinas a base de trigo;
 - c) jarabes de glucosa a base de cebada;
 - d) cereales utilizados para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.
2. Crustáceos y productos a base de crustáceos.
3. Huevos y productos a base de huevo.
4. Pescado y productos a base de pescado, salvo:

- a) gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides;
 - b) gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.
5. Cacahuetes y productos a base de cacahuetes.
6. Soja y productos a base de soja, salvo:
- a) aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados;
 - b) tocoferoles naturales mezclados (E306), d-alfa tocoferol natural, acetato de d-alfa tocoferol natural y succinato de d-alfa tocoferol natural derivados de la soja;
 - c) fitosteroles y esterres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja;
 - d) esterres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.
7. Leche y sus derivados (incluida la lactosa), salvo:
- a) lactosuero utilizado para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas;
 - b) lactitol.
8. Frutos de cáscara, es decir, almendras (*Amygdalus communis* L.), avellanas (*Corylus avellana*), nueces (*Juglans regia*), anacardos (*Anacardium occidentale*), pacanas [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], castañas de Pará (*Bertholletia excelsa*), alfóncigos (*Pistacia vera*), macadamias o nueces de Australia (*Macadamia ternifolia*) y productos derivados, salvo:
- a) nueces utilizadas para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.
9. Apio y productos derivados.
10. Mostaza y productos derivados.
11. Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.
12. Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro expresado como SO₂.
13. Altramuces y productos a base de altramuces.
14. Moluscos y productos a base de moluscos.

Sin embargo, aún incluyendo de forma adecuada en la etiqueta todos los ingredientes que se utilizan en la elaboración de un determinado producto, existe la posibilidad de que alguno contenga una pequeña cantidad del o de los componentes alérgicos sin incluir en la etiqueta, debido a la presencia de los denominados “alérgenos ocultos”. Se consideran como “alérgenos ocultos” aquellos presentes en un producto alimentario, que pasan de forma desapercibida para el consumidor, y generalmente también para el productor. La presencia de estos alérgenos ocultos 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 procesado, entre otros.

Un ejemplo de contaminación involuntaria es el de las pastas alimenticias con y sin huevo fabricadas en la misma línea de producción. Se considera que, prácticamente, ninguna pasta que no haya sido elaborada en instalaciones independientes sería garantizable que careciera por completo de proteínas de huevo. Un ejemplo de contaminación voluntaria es el suceso que ocurrió en Noruega en 1992 cuando un fabricante sustituyó el almidón de patata de una salsa por almidón de guisante, de forma que las personas sensibles al guisante sufrieron una reacción alérgica (García *et al.*, 2003).

Existen muy pocos datos sobre la frecuencia de contaminación de alimentos procesados que contienen alérgenos sin declarar. En un estudio para el control de los alimentos realizado en la Unión Europea (Standing Committee for Foodstuffs, 1997) el 2,3% de 838 productos contenían proteínas lácteas sin declarar. El porcentaje de alimentos contaminados con huevo y gluten sin aparecer en la etiqueta fue de 1,3% en Alemania (n=319) y 5,2% en los EE.UU. (n=1.583), respectivamente (Besler, 2001). Asimismo, Hefle y Lambrecht (2004) detectaron que el 11,8% (n=27) de las muestras analizadas, en las que se incluyeron sorbetes, y bebidas a base de frutas, así como todas las muestras de chocolate negro (n=29), contenían caseínas sin haber declarado la presencia en la etiqueta de derivados lácteos.

Para evitar el hecho de infringir la legislación sobre etiquetado de alérgenos, los productores han optado por usar un etiquetado preventivo del tipo “puede contener”, y así alertar al consumidor de la posible presencia de ingredientes alergénicos no añadidos intencionadamente en un alimento. El uso indiscriminado de este tipo de etiquetado supone una restricción en la elección de productos para los consumidores alérgicos, sin poder estar seguros de si realmente supondría un riesgo para su salud. Por ello, este tipo de etiquetado sólo debería usarse si, debido a las características del proceso de fabricación, y tras haber realizado una correcta evaluación del riesgo, no se pueda garantizar la ausencia de los componentes alergénicos (Deibel *et al.*, 1997).

II.2.4. ALERGIA A LA LECHE BOVINA

II.2.4.1. Proteínas de la leche

Las proteínas se encuentran en la leche bovina en una concentración de aproximadamente 30-35 g/L. Éstas se pueden dividir en dos grandes grupos: las caseínas y las proteínas del lactosuero, que constituyen un 80% y un 20% de las proteínas de la leche, respectivamente.

Las caseínas se definen de forma operacional como las proteínas de la leche que precipitan a pH 4,4-4,6. Su peso molecular varía entre 19 y 33 kDa, y se encuentran en la leche asociadas entre ellas formando micelas cuyo diámetro medio es de 600 nm en la leche de vaca. Existen cuatro clases de caseínas según su estructura: α_{s1} , α_{s2} , β y κ caseínas. La leche humana contiene sólo β -caseína y κ -caseína, mientras que la leche bovina contiene las cuatro clases (Jennes, 1985).

Las proteínas del lactosuero son aquellas que permanecen en solución a pH 4,4-4,6. Algunas de ellas son sintetizadas exclusivamente por las células epiteliales de la glándula mamaria, como la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina, por lo que son órgano-específicas. Otras proceden de la sangre, como las IgG, la albúmina o la α_2 -macroglobulina, y otras son sintetizadas por las células sanguíneas que se encuentran presentes en el tejido mamario, como las IgA y las IgM.

La β -lactoglobulina es la proteína cuantitativamente más importante del lactosuero de los rumiantes. Su concentración es mayor durante la etapa calostrual que en la leche definitiva, siendo de 18 mg/mL y 4 mg/mL, respectivamente (Pérez *et al.*, 1990). Esta proteína se encuentra presente en la leche de numerosas especies, pero no se encuentra en la leche humana (Hambling *et al.*, 1992).

El estado de agregación y la conformación de la β -lactoglobulina bovina varían en función de las condiciones del medio, principalmente del pH. En los rumiantes, la β -lactoglobulina se encuentra al pH normal de la leche (6,6) formando dímeros unidos de forma no covalente. A un pH menor de 3,5 o mayor de 7,5 se encuentra en forma monómera, mientras que a pH 8,6 y superior se encuentra formando octámeros (McKenzie y Sawyer, 1967). Cada monómero, cuyo peso molecular aproximado es de 18.000, está compuesto por 162 aminoácidos (Godovac-Zimmerman y Braunitzer, 1987; Hambling *et al.*, 1992) y

contiene cinco residuos de cisteína, cuyos grupos sulfhidrilo se encuentran cuatro de ellos formando dos puentes disulfuro y uno se encuentra en forma libre.

La β -lactoglobulina presenta diversas variantes genéticas, siendo las más comunes la A y la B (Aschaffenburg y Drewry, 1955). Estas variantes difieren en los aminoácidos que ocupan las posiciones 64 y 118, en las cuales el ácido aspártico y la valina de la variante A son sustituidos por la glicina y la alanina, respectivamente, en la variante B (Gordon *et al.*, 1961; Piez *et al.*, 1961).

La β -lactoglobulina de los rumiantes tiene la capacidad de interactuar *in vitro* con pequeños ligandos hidrofóbicos, como el retinol y los ácidos grasos (Spector y Fletcher, 1970; Puyol *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1992a). Además, en estas especies la β -lactoglobulina aislada de la leche utilizando condiciones no desnaturalizantes tiene unido un mol de ácidos grasos por mol de proteína dímera. Sin embargo, en las especies no rumiantes, como la equina y la porcina, la β -lactoglobulina no posee ácidos grasos unidos de forma fisiológica ni la capacidad de unirlos *in vitro* (Frapin *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1993).

La función biológica de la β -lactoglobulina no está todavía clara (Bernback *et al.*, 1990; Pérez y Calvo, 1995). Su capacidad para unir retinol *in vitro* y la alta homología de secuencia que presenta con la proteína fijadora de retinol del suero sanguíneo, ha permitido plantear como hipótesis que esta proteína podría estar involucrada en el transporte de retinol en el rumiante recién nacido (Futterman y Heller, 1972). Por otra parte, se ha observado que la β -lactoglobulina de los rumiantes tiene la capacidad de aumentar la actividad de las lipasas pregástricas, debido probablemente a que capta los ácidos grasos libres del medio que inhiben la actividad del enzima. Por ello, se ha indicado que su función biológica sería la de participar en la digestión de los lípidos en los rumiantes recién nacidos (Pérez y Calvo, 1995).

El efecto que el tratamiento térmico tiene sobre la β -lactoglobulina bovina ha sido estudiado por la técnica de calorimetría diferencial. La proteína muestra un pico endotérmico que refleja el proceso de termodesnaturalización, que se encuentra entre 60 y 90°C, estando los valores de la temperatura máxima del pico en un intervalo entre 70 y 80°C, dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas (Kella y Kinsella, 1988; Relkin y Launay, 1990; Puyol *et al.*, 1994).

La α -lactalbúmina es la proteína más característica del lactosuero, pues está presente en la leche de todas las especies de mamíferos excepto en la foca, cuya leche tampoco contiene lactosa. La concentración de esta proteína en la leche bovina y humana varía entre 1 y 2 mg/mL, por lo que es la proteína cuantitativamente más importante del lactosuero humano y la segunda del lactosuero bovino, tras la β -lactoglobulina (Pérez *et al.*, 1991; Walstra *et al.*,

2001). En la leche se encuentra en forma monómera con un peso aproximado de 14.000. La α -lactalbúmina tiene unido un ión calcio por molécula que estabiliza su estructura frente a la desnaturalización por el calor y otros agentes desnaturalizantes (Hambling *et al.*, 1992). La función principal de la α -lactalbúmina en la glándula mamaria es la de modular la actividad del enzima galactosiltransferasa en la síntesis de la lactosa (Brew y Grobler, 1992).

Las inmunoglobulinas constituyen las proteínas de defensa específica de la leche. Su concentración es muy elevada en el calostro bovino, variando entre 50 y 200 mg/mL, mientras que en el calostro humano esta concentración es mucho menor, de unos 20 mg/mL (Walstra *et al.*, 2001). En la leche definitiva de ambas especies, la concentración de inmunoglobulinas es similar, de aproximadamente 2 mg/mL. El tipo de inmunoglobulina que predomina en cada especie es distinto. En la leche bovina predomina la clase IgG, y en la humana se encuentra mayoritariamente la clase IgA. La función principal de estas proteínas es la de transmitir inmunidad pasiva al recién nacido frente a las infecciones microbianas.

La lactoferrina es una glicoproteína fijadora de hierro con un peso molecular de 80.000. Se encuentra en la leche humana en una concentración de aproximadamente 4 mg/mL y en la bovina en una proporción mucho menor, de alrededor de 0,1 mg/mL, siendo en ambos casos la concentración mayor durante la etapa calostrual (Masson y Heremans, 1971; Sánchez *et al.*, 1988). Aunque su función biológica no está todavía aclarada, parece que participa en la protección del recién nacido frente a las infecciones intestinales, y en el establecimiento y selección de la flora bacteriana intestinal. Inicialmente, se pensaba que el efecto bacteriostático de la lactoferrina sobre las bacterias que requieren hierro para su crecimiento se debía exclusivamente a su capacidad para secuestrar este metal. Sin embargo, se ha propuesto que este efecto está relacionado también con la capacidad de esta proteína para unirse a la membrana de los microorganismos, alterándola y produciendo la liberación de algunos de los polisacáridos presentes, lo que les induce a la muerte (Tomita *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 1992).

El lactosuero contiene, además, otras proteínas minoritarias tales como la lactoperoxidasa, la transferrina, la albúmina y algunos inhibidores de proteasas entre otras, algunas de las cuales desempeñan funciones fisiológicas importantes en el recién nacido y/o en la glándula mamaria.

II.2.4.2. Productos derivados de la leche

Las proteínas lácteas son ingredientes muy utilizados en la industria alimentaria debido a sus propiedades tanto nutritivas como funcionales, tales como la capacidad de retención de agua, la participación en la formación de geles, la regulación de la viscosidad y la contribución a la estabilización de emulsiones y espumas (Mulvihill, 1992). Los principales objetivos que se persiguen cuando se utilizan preparados proteicos de origen lácteo en la elaboración de determinados alimentos son incrementar el valor nutritivo, elaborar productos con unas propiedades funcionales determinadas, o sustituir proteínas más caras.

En los últimos años se ha desarrollado una metodología a gran escala para la obtención de ingredientes lácteos, que son utilizados en la elaboración de numerosos alimentos. Los principales ingredientes lácteos utilizados en la industria alimentaria son la leche y el lactosuero en polvo y los productos proteicos derivados de las caseínas y de las proteínas del lactosuero (Varnam y Sutherland, 1994).

La leche en polvo se obtiene preferentemente a partir de leche desnatada para evitar problemas por oxidación de la grasa. Su fabricación incluye un tratamiento térmico previo, y a continuación una etapa de concentración de la leche por evaporación, y otra de secado por atomización. El tratamiento térmico al que previamente se somete la leche puede ser de diferente intensidad. Los tratamientos bajos (75°C, 20 segundos) no desnaturalizan las proteínas del lactosuero, y por lo tanto estos productos presentan buenas propiedades de solubilidad y coagulabilidad, por lo que son usadas para enriquecer las leches destinadas a la elaboración de quesos. Los tratamientos térmicos medios (85-105°C, 1-2 minutos) y altos (120-135°C, 2-4 minutos) tienen un efecto desnaturalizante sobre las proteínas del lactosuero, que les confiere unas buenas propiedades emulsionantes y espumante, así como una elevada capacidad de retención de agua, por lo que se usan ampliamente en la elaboración de cremas, de productos cárnicos y de repostería (Singh y Creamer, 1991).

Los productos proteicos a base de caseínas se obtienen a partir de leche desnatada. Existen tres tipos de productos: las caseínas propiamente dichas, los caseinatos y los coprecipitados. Las caseínas pueden a su vez ser de tres tipos según el método de obtención: la caseína ácida, que se obtiene por precipitación isoelectrica mediante la adición de un ácido; la caseína láctica obtenida por precipitación isoelectrica mediante la adición de bacterias lácticas; y la caseína enzimática que se obtiene mediante la adición de un enzima coagulante. Las caseínas son poco solubles en agua, lo que a veces limita su uso en la industria alimentaria. Se utilizan en confitería por su capacidad de retención de agua, para

controlar la cristalización de los azúcares, y en los productos horneados porque aportan color y aroma al favorecer la reacción de Maillard (Fox y Mulvihill, 1983; Allen *et al.*, 1985).

Los coprecipitados están constituidos por una mezcla de caseínas y proteínas del lactosuero. Se obtienen aplicando primero un tratamiento térmico para inducir la agregación entre ellas seguido de una precipitación conjunta por acidificación o adición de calcio. Estos productos se utilizan en la elaboración del chocolate, por su estabilidad térmica y por su contribución a la estabilidad del sabor. Pueden contribuir también a la textura en productos de panadería y en productos cárnicos procesados (Mulvihill y Ennis, 2003).

Los caseinatos se obtienen a partir de caseínas o de coprecipitados mediante una reacción en medio acuoso con álcalis (sales alcalinas de sodio, potasio o calcio). Los caseinatos presentan una mejor solubilidad que las caseínas, y son usados en la industria alimentaria por sus propiedades espesantes, emulsificantes y espumantes (Muller, 1982).

El lactosuero constituye el subproducto que se obtiene en el proceso de fabricación del queso o en la obtención de caseínas. Según como se realice la coagulación de las caseínas, el lactosuero puede ser dulce (procedente de la elaboración de quesos obtenidos por coagulación enzimática, a pH 5,8-6,6), semiácido (procedente de la elaboración de quesos frescos y ácidos, a pH 5,0-5,8) o ácido (procedente de la obtención de caseínas a pH <5,0).

En Europa, el lactosuero se había utilizado tradicionalmente para la alimentación animal. Sin embargo, la subida del precio de la leche desnatada en polvo en los últimos años ha hecho que aumente la demanda de proteínas del lactosuero como ingredientes alimentarios por su menor precio. En Estados Unidos, las proteínas del lactosuero son actualmente las proteínas funcionales más utilizadas en la elaboración de productos para consumo humano. Se utilizan para mejorar el valor nutritivo y las propiedades tecnológicas de los alimentos (de Wit, 1989; Spreer, 1998).

El lactosuero en polvo se obtiene, al igual que la leche en polvo, por evaporación y secado posterior por atomización. Este lactosuero puede ser sometido antes del secado a procesos de ultrafiltración para eliminar la lactosa, o a procesos de intercambio iónico o electrodiálisis para eliminar las sales. La desmineralización es un proceso costoso por lo que sólo se realiza cuando se va a destinar a fines muy específicos, como la elaboración de alimentos infantiles (Morr, 1984). La fracción "lactalbúmina" se obtiene por coagulación térmica de las proteínas del lactosuero. La cantidad de precipitado obtenido depende de la intensidad del tratamiento térmico, del pH y de la concentración de calcio. El precipitado se lava posteriormente para eliminar la lactosa y los minerales, y finalmente se deseca (de Witt *et al.*, 1978).

Los concentrados y aislados de proteínas del lactosuero se obtienen a partir del lactosuero mediante técnicas de ultrafiltración o de intercambio iónico, respectivamente. En estos procesos, se elimina gran parte del agua, la lactosa y las sales, obteniéndose productos con una proporción de proteínas entre un 75 y un 90%. Los aislados tienen propiedades funcionales mejores que de los concentrados y la “lactalbúmina”, pero su obtención supone un mayor coste económico (Marshall, 1982). La principal ventaja de los productos derivados del lactosuero frente a los derivados de las caseínas es su mayor solubilidad en alimentos de pH ácido, como son los zumos de frutas y las bebidas carbonatadas.

Por otra parte, determinadas proteínas de la leche se pueden aislar con objetivos más específicos, para mejorar las propiedades tecnológicas o para usarlas como ingredientes funcionales. Así, las proteínas α -lactalbúmina y β -lactoglobulina se pueden separar del lactosuero mediante tratamiento térmico a 55-65°C a pH 4,2. La separación se basa en que a ese pH y temperatura, la fracción alfa precipita, y la fracción beta queda en solución (Slack, 1986).

También existen métodos específicos para aislar proteínas biológicamente activas como las inmunoglobulinas, la lactoferrina y la lactoperoxidasa, o péptidos bioactivos. Algunas de estas proteínas se utilizan como ingredientes en productos especiales tales como preparaciones dietéticas para atletas, enfermos y alimentos infantiles, así como en preparaciones farmacéuticas y en productos cosméticos.

II.2.4.3. Alergia a las proteínas de la leche de vaca

La leche de vaca es el alimento que provoca más reacciones adversas durante la infancia, ya que es el primer alimento que se ingiere tras la lactancia materna o, en algunos casos, tras el nacimiento. La mayoría de las alergias a la leche de vaca tienen su origen en el primer año de vida, y se manifiestan cuando el niño se alimenta con leches de fórmula (Besler *et al.*, 2002). En algunas ocasiones, el contacto se puede producir a través de la leche materna, a la que se transfieren las proteínas procedentes de la leche de vaca ingeridas por la madre (Axelsson *et al.*, 1986).

Las observaciones realizadas por pediatras de diversos países indican que la prevalencia de alergia a la leche de vaca en niños es del 7-8% (Zarkadas *et al.*, 1999; Kanny *et al.*, 2001). Aunque alrededor de un tercio de los pacientes alérgicos a la leche adquieren tolerancia al consumo oral de ésta en los primeros 3 o 4 años de vida, en algunos individuos la alergia a la

leche de vaca puede persistir en la edad adulta (Høst, 1997), estimándose una prevalencia en este grupo de alrededor del 2% de la población total (Besler *et al.*, 2002).

Los síntomas más frecuentes en las alergias a la leche de vaca, que suelen aparecer en menos de dos horas tras el consumo del alimento, son: urticaria, dermatitis atópica, vómitos y asma y, en los casos más graves, shock anafiláctico (Saarinen *et al.*, 2000). La dosis necesaria para producir una reacción es muy variable entre individuos, encontrándose habitualmente entre 20 y 200 mL, aunque algunos estudios han mostrado que dosis mucho menores, de 0,1 a 5 mL, pueden llegar a provocar reacciones alérgicas en individuos muy sensibles (Hefle y Taylor, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004; Monaci *et al.*, 2006).

Los principales alérgenos de la leche de vaca son las α y β caseínas (*Bos d 8*) y la β -lactoglobulina (*Bos d 5*), seguidas por la α -lactalbúmina (*Bos d 4*) y la albúmina sérica bovina (*Bos d 6*) (Bleumink y Young, 1968; Docena *et al.*, 1996; Wal, 1998).

Existe una gran controversia sobre el efecto que los tratamientos térmicos tienen sobre la alergenicidad de las proteínas de la leche. En general, las caseínas son proteínas que presentan una alta termorresistencia, mientras que las proteínas del lactosuero son bastante termosensibles. En ambos casos, la desnaturalización producida por efecto de los tratamientos térmicos puede dar lugar a la pérdida de epítomos conformacionales, como resultado de la alteración de la estructura terciaria, pero también puede producir la exposición de epítomos que estaban localizados en el interior de la proteína en su estado nativo. Además, diversos estudios han indicado que algunos productos formados durante la reacción de Maillard, resultado de la interacción entre las proteínas de la leche y la lactosa, presentan una alta alergenicidad (Høst y Samuelsson, 1988; Jedrychowski, 1999; Besler *et al.*, 2002; Karamonova *et al.*, 2003).

El mejor modo para combatir la alergia a la leche de vaca es evitar su consumo. Sin embargo, dado que la leche es el único alimento del niño durante los primeros meses de vida, y a que no siempre es posible seguir una lactancia materna, la alternativa para disminuir la alergenicidad de las proteínas de la leche de vaca ha sido la hidrólisis de las mismas mediante la utilización de diversos enzimas proteolíticos. Los resultados obtenidos indican que la disminución de la alergenicidad depende del grado de hidrólisis, obteniéndose una mayor tolerancia con leches en las que se ha llevado a cabo una hidrólisis extensiva. Estas leches infantiles hipoalergénicas son actualmente las que suelen administrarse a los niños que presentan alergia a la leche de vaca.

Por otra parte, dadas las buenas propiedades funcionales de las proteínas de la leche y el gran desarrollo alcanzado en el ámbito industrial en sus métodos de obtención, estas

proteínas son utilizadas habitualmente como ingredientes en la elaboración de numerosos alimentos, ya sea como emulsificantes, gelificantes, ligantes, o como una fuente de enriquecimiento proteico. Por ello, las proteínas de la leche de vaca se han descrito a menudo también como alérgenos ocultos, ya sea por no estar declarados en la etiqueta del alimento, o como resultado de una contaminación durante el procesado (Gern *et al.*, 1991; Laoprasert *et al.*, 1998; Giovannacci *et al.*, 2004).

II.2.4.4. Técnicas de detección de proteínas de la leche

Las técnicas usadas para la detección de proteínas lácteas incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (García *et al.*, 1998), las técnicas electroforéticas (Malmheden Yman *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 1998), las técnicas genéticas (Plath *et al.*, 1997; López-Calleja *et al.*, 2004), y las técnicas inmunoquímicas (Mäkinen-Kiljunen y Palosuo, 1992; Pérez *et al.*, 1992b; Mariager *et al.*, 1994; Plebani *et al.*, 1997).

Estas técnicas se han aplicado fundamentalmente para detectar la adulteración por sustitución de especies (Pérez *et al.*, 1992b; Anguita *et al.*, 1997; Plath *et al.*, 1997; Negroni *et al.*, 1998; Hurley *et al.*, 2004), para determinar la intensidad del tratamiento térmico a que se ha sometido la leche (Karamonova *et al.*, 2003), o para determinar la presencia de proteínas residuales en las fórmulas infantiles hipoalérgicas (Niggemann *et al.*, 1999; Docena *et al.*, 2002). Sin embargo, existen muy pocos trabajos sobre la detección de proteínas lácteas como alérgenos en alimentos procesados elaborados con diversos ingredientes. En estos trabajos, la detección se ha realizado utilizando distintos tipos de técnicas inmunoquímicas, dada su alta sensibilidad y especificidad, además de su sencillez operativa.

La utilidad de las técnicas genéticas para ese fin se ha cuestionado, ya que muchos productos alimentarios están elaborados con fracciones proteicas de la leche que no contienen DNA (Plath *et al.*, 1997; López-Calleja *et al.*, 2004).

Las técnicas inmunoquímicas que utilizan IgE procedentes de pacientes alérgicos se han usado también para detectar proteínas lácteas (Frémont *et al.*, 1996; Ylitalo *et al.*, 1999). Sin embargo, su uso en la industria alimentaria para la detección de alérgenos es muy limitado, debido a la gran variabilidad que existe en la producción de IgE dependiendo del individuo y a la falta de disponibilidad de sueros de pacientes alérgicos. Por ello, en las técnicas inmunoquímicas se usan fundamentalmente sueros o anticuerpos obtenidos a partir de animales inmunizados con proteínas lácteas.

Malmheden Yman *et al.* (1994) detectaron caseína en diferentes alimentos, como helados, salchichas o chocolate, mediante la técnica de inmunoelectroforesis cuantitativa con una sensibilidad de 30 mg/kg. Debido a la relativa baja sensibilidad de estas técnicas, han sido sustituidas por las técnicas de inmunoensayo enzimático.

Los trabajos llevados a cabo para detectar proteínas lácteas utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales mediante técnicas inmunoenzimáticas han mostrado una clara preferencia por los primeros (Mariager *et al.*, 1994; Plebani *et al.*, 1997), debido a que reaccionan frente a diferentes epítomos de la proteína, lo que permite su reconocimiento en diferentes grados de desnaturalización.

Se ha publicado el desarrollo de un ELISA tipo sándwich para la detección de caseína en diferentes alimentos, como zumos, sorbetes y chocolate, con un límite de detección de 0,5 mg/kg (Hefle y Lambrecht 2004). Watanabe *et al.* (2005a) detectaron caseína y otras proteínas lácteas en productos cárnicos mediante la técnica de ELISA, e identificaron las proteínas alergénicas en los productos que contenían leche mediante Western-blotting utilizando el suero de individuos alérgicos. Recientemente, Rolland *et al.* (2008) han desarrollado un ELISA de tipo sándwich para la detección de α -caseína en vino, con una sensibilidad de 8 ng/mL. La finalidad de este trabajo era determinar si las caseínas estaban presentes en el vino, debido a que éstas son usadas como adyuvantes tecnológicos, y no deben estar presentes en el producto final. Hohensinner *et al.* (2007) desarrollaron un inmunosensor con anticuerpos marcados con oro coloidal para detectar β -lactoglobulina en productos infantiles comerciales.

Existen pocos trabajos publicados hasta la fecha sobre validación de los tests de ELISA usados para la detección de proteínas lácteas en alimentos. Matsuda *et al.* (2006) realizaron un estudio interlaboratorial para validar dos kits comerciales de ELISA tipo sándwich para la detección de caseína y proteínas de leche, respectivamente. Con estos tests analizaron alimentos modelo procesados, como salchichas, galletas o mermelada, que contenían como ingrediente leche en polvo a una concentración de 10 μ g/g. Los resultados mostraron que las recuperaciones de un test fueron de entre el 97 al 137% para los diferentes productos, mientras que para el otro test fueron de entre el 49 al 89%, encontrando diferencias en la concentración para una misma muestra entre los dos tests de hasta el 198%.

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente varios kits para la detección de proteínas de la leche (Tabla 1). La mayor parte de los tests son técnicas de ELISA en placa de tipo competitivo o de tipo sándwich, y en los últimos años se han comercializado algunos tests que utilizan la técnica de inmunocromatografía. Estos kits comerciales están basados en

la detección de determinadas proteínas individuales, fundamentalmente la caseína o la β -lactoglobulina, o en la detección conjunta de las proteínas del lactosuero.

II.2.5. ALERGIA AL HUEVO

II.2.5.1. Proteínas del huevo

El huevo está constituido por tres estructuras: la cáscara, la clara y la yema. La cáscara representa un 10% del peso total del huevo, la clara o albumen el 58%, y la yema o vitelo el 32%. La clara está formada casi exclusivamente por agua (87%) y proteínas (11-13%), y la yema por agua (45%), lípidos (30%) y proteínas (15%) (Stadelman y Cotterill, 1977; <http://www.institutohuevo.com>).

Las principales proteínas de la clara son la ovoalbúmina, el ovomucoide, la ovotransferrina y la lisozima.

La ovoalbúmina es la proteína predominante del albumen, constituyendo aproximadamente el 54% en peso de las proteínas totales del mismo. Es una fosfoglicoproteína monomérica que tiene un peso molecular de 44.500 y un punto isoelectrico de 4,5. La molécula de ovoalbúmina contiene cuatro grupos sulfhidrilo, además de dos puentes disulfuro por molécula (Stadelman y Cotterill, 1977). La ovoalbúmina se desnaturaliza rápidamente tras la agitación o el batido en las interfases aire-agua o grasa-agua. Por calorimetría diferencial, se ha descrito un pico de desnaturalización con una temperatura máxima de alrededor de 78°C (Yamasaki *et al.*, 2003).

El ovomucoide constituye el 11% de las proteínas de la clara. Es una proteína altamente glicosilada, ya que contiene aproximadamente 20-25% de carbohidratos (Besler *et al.*, 1997), tiene un peso molecular de 28.000 y un punto isoelectrico de 4,1 (Kato *et al.*, 1987). El ovomucoide está constituido por tres dominios en tandem, cada uno de los cuales contiene tres puentes disulfuro (Kato *et al.*, 1987; Mine, 1995), lo que podría ser la causa de su alta resistencia a la desnaturalización térmica y a la degradación proteolítica (Matsuda, 1982).

Por calorimetría diferencial, a un pH de 7,4 el ovomucoide presenta un pico de desnaturalización con una temperatura máxima de 76,5°C, y un incremento en la entalpía de 460 kJ/mol. Sin embargo, al tratar la proteína a pH de 9,1, se obtienen dos picos, uno a 74,3°C y otro a 82,2°C, y un valor de la entalpía mucho mayor, de 732 kJ/mol (Julià *et al.*,

2007). El ovomucoide inhibe la tripsina y otras serín-proteasas (Lineweaver y Murray, 1947), debido a lo cual podría constituir un mecanismo de defensa antimicrobiano en el huevo, al inhibir enzimas proteolíticos que producen péptidos que son necesarios para el desarrollo de las bacterias (Wang y Shelef, 1991; Winiarska-Mieczan y Kwiecién, 2007).

La ovotransferrina, llamada antiguamente conalbúmina, es una glicoproteína que constituye el 12% de las proteínas de la clara. Tiene un peso molecular de 14.000 y posee una acción bacteriostática, por su capacidad de fijar metales, principalmente el hierro (Mine, 1995). La lisozima es el principal enzima protector del huevo, y ejerce su acción lisando la pared celular de las bacterias Gram +. También se han descrito otras funciones biológicas para esta proteína, como la inactivación de ciertos virus, la potenciación de la acción de algunos antibióticos o cierto efecto antiinflamatorio (Ibrahim, 1997). El peso molecular de la lisozima es de aproximadamente 14.600 y el punto isoeléctrico de 10,7 (Stadelman y Cotterill, 1977).

La ovomucina es una glicoproteína, con un 30% de carbohidratos, que contribuye a la estructura gelatinosa de la clara, constituyendo el 1,5-3,5% de los sólidos de ésta (Powrie, 1997). Se asocia con frecuencia a otras proteínas de la clara, como la ovoalbúmina, la ovotransferrina y, especialmente, la lisozima.

La clara del huevo contiene, además, otras proteínas minoritarias, como la ovoglobulina, la ovoflavoproteína, la ovomacroglobulina, el ovoinhibidor o la avidina, entre otras, algunas de las cuales desempeñan funciones biológicas importantes en el huevo.

II.2.5.2. Productos derivados del huevo

Los ovoproductos son los productos obtenidos a partir del huevo entero o de sus diferentes componentes o sus mezclas, previa eliminación de la cáscara y las membranas. Estos productos pueden comercializarse como huevo entero, yema, clara, o una mezcla de ambas, y todas ellas pueden encontrarse en forma líquida, congelada o deshidratada. Los ovoproductos tienen ciertas ventajas como sustitutos del huevo fresco en la industria, como una mayor versatilidad, manipulación más sencilla, mayor seguridad bacteriológica y mayor facilidad de distribución.

Los huevos, antes de su transformación en ovoproductos, se lavan y se aclaran con una solución de cloro de 200-500 ppm. Se procede después a su apertura, tras la cual se separan las yemas de las claras mediante un sistema de rejillas. Las yemas y las claras, juntas o por

separado, se filtran para eliminar las chalazas, restos de cáscaras y membranas. Posteriormente, se someten a una pasterización para asegurar una adecuada calidad higiénica.

La concentración de ovoproductos tiene como objeto reducir los costes de transporte, almacenamiento, y de posteriores tratamientos, ya que, en muchos casos, constituye un paso previo a la deshidratación o la congelación (Copin *et al.*, 1994; Laurent, 1996). La concentración se puede realizar por evaporación a vacío o mediante procesos de membrana, como ultrafiltración u ósmosis inversa. En el primer caso hay cambios importantes en las propiedades funcionales de las proteínas, mientras que en el segundo caso, al no aplicar calor, se conservan bien dichas propiedades, aunque suelen dar problemas de colmatación de las membranas (Copin *et al.*, 1994).

La adición de azúcar al huevo concentrado permite obtener un producto estable a temperatura ambiente, denominado “confitura de huevo” (Copin *et al.*, 1994; Laurent, 1996).

La deshidratación para obtener huevo en polvo suele realizarse por atomización. Además, se están aplicando otras tecnologías para el secado de los huevos, como el desecado en espuma, introduciendo un gas inerte antes del proceso, o la liofilización, si bien esta última se utiliza muy poco por su alto coste (Sørensen, 2008).

Los ovoproductos congelados se utilizan principalmente como ingrediente en otros alimentos. Su principal ventaja respecto a los ovoproductos líquidos es su mayor vida útil respecto al producto refrigerado pasteurizado. Sin embargo, poseen el inconveniente de que el ciclo de congelación-descongelación incrementa el riesgo de contaminación, y además provoca, en aquellos productos que contienen yema, importantes modificaciones de textura no deseables, como un descenso en la capacidad emulsionante (Cotterill, 1977; Copin *et al.*, 1994).

Ciertos componentes de la clara se separan y se usan por sus propiedades tecnológicas y funcionales. La ovoalbúmina es utilizada en la industria alimentaria por sus propiedades emulsionantes y espumantes, y la lizozima es utilizada como conservante natural, por su potente actividad antimicrobiana frente a Clostridios, *Yersinia*, *Campylobacter*, y algunos bacilos. Este enzima se usa actualmente en la industria quesera debido a que es capaz de evitar la hinchazón tardía de los quesos al inhibir el crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum*. En la industria del vino se usa para el control de las bacterias lácticas y de las fermentaciones en el mosto. Aunque en España no está permitido su uso como conservante en derivados de pescado y mariscos, sí se utiliza en algunos países, como Japón.

La avidina tiene usos farmacéuticos, y forma además forma parte de determinados kits de diagnóstico como sistema de amplificación, basados en la formación del complejo avidina-

biotina. Otros componentes derivados del huevo, como la lecitina o la vitamina A son usados en la industria alimentaria por sus propiedades emulsificantes y colorantes, respectivamente.

II.2.5.3. Alergia a las proteínas del huevo

Los huevos de gallina son muy utilizados en la alimentación humana, debido a que poseen una gran cantidad de proteínas de alto valor biológico y unas buenas propiedades funcionales. Sin embargo, son también una de las causas más comunes de alergias a alimentos, sobre todo en niños, en los que constituye la segunda causa más frecuente de alergia alimentaria (Taylor, 1986). La introducción habitual de este alimento en la dieta humana alrededor de los 12 meses de vida hace que su aparición en la clínica y su frecuencia sean máximas a esta edad. Además, diferentes estudios han mostrado que el niño puede entrar en contacto con algunas proteínas del huevo durante la lactancia debido al paso de éstas a la leche materna (Kilshaw y Cant, 1984; Hirose *et al.*, 2001).

La prevalencia de alergia al huevo oscila, según las fuentes, entre 5 y 8 % en la población infantil y 2% en los adultos (Matsumura *et al.*, 1975; Cant *et al.*, 1985). Se ha indicado en diferentes informes que entre el 50 y el 70% de los niños alérgicos a alimentos presentan reacciones al huevo (Bock *et al.*, 1978; Bernhisel-Broadbent *et al.*, 1994).

Las manifestaciones clínicas provocadas por la ingestión de huevo en personas sensibilizadas son fundamentalmente de tipo cutáneo, y con menos frecuencia de tipo respiratorio de vías altas y bajas (Bock *et al.*, 1978). Las dosis reactivas varían entre 1 y 400 mg de huevo, y el tiempo de latencia entre la ingestión y la aparición de los síntomas suele ser inferior a una hora (Taylor *et al.*, 2002; Morisset *et al.*, 2003).

Durante muchos años se ha considerado a la clara del huevo como la única responsable de la mayoría de las alergias a este alimento, siendo los alérgenos principales el ovomucoide, la ovalbúmina, y la ovotransferrina (Langeland, 1982; Hoffman, 1983), seguidas de la lisozima y la ovomucina (Walsh *et al.*, 1987; Holen y Elsayed, 1990). Actualmente, se sabe que la yema del huevo también da lugar en algunas ocasiones a reacciones alérgicas, en las que están implicadas fundamentalmente las apovitelinas I y IV (Walsh *et al.*, 1987). Como un caso especial debe considerarse la dermatitis atópica, en la que muchos autores reconocen la implicación de los alérgenos del huevo, por presentar los afectados con frecuencia pruebas positivas para IgE específicas al huevo (Zeiger, 1985).

II.2.5.4. Técnicas de detección de proteínas del huevo

En la última década se han desarrollado diversas técnicas inmunoquímicas para la detección de proteínas de huevo como alérgenos en alimentos, que han estado dirigidas fundamentalmente a la detección de proteínas de la clara. Además, mediante el uso de estas técnicas también se ha estudiado el efecto que el tratamiento térmico tiene sobre la inmunorreactividad y la alergenicidad de las proteínas del huevo (Matsuda *et al.*, 1982; Gu *et al.*, 1986; Julià *et al.*, 2007). El ovomucoide es muy resistente a la desnaturalización térmica y a la degradación proteolítica (Matsuda *et al.*, 1982), y mantiene su alergenicidad tras haber sido sometido a estos tratamientos (Gu *et al.*, 1986; Urisu *et al.*, 1997).

Las técnicas inmunoquímicas que utilizan IgE procedentes de pacientes alérgicos se han usado para detectar proteínas del huevo (Walsh *et al.*, 1987; Hirose *et al.*, 2004). Sin embargo, como se ha indicado anteriormente en el caso de las proteínas de la leche, su uso es muy limitado.

Malmheden-Yman *et al.* (1994), mediante inmunolectroforesis cuantitativa, detectaron proteínas del huevo en alimentos procesados, como productos cárnicos, chocolate o pasteles, con límites de detección de 30 ppm. El Comité Nórdico para el Análisis de Alimentos llevó a cabo un estudio interlaboratorial para la detección de alérgenos usando técnicas de inmunodifusión doble (Malmheden-Yman *et al.*, 2002), obteniendo límites de detección de ovoalbúmina en pasta similares al anterior trabajo. Debido a la baja sensibilidad, los métodos de inmunoprecipitación han sido reemplazados por técnicas inmunoenzimáticas, de mayor sensibilidad.

Yeung *et al.* (2000) desarrollaron un ELISA en el que utilizaban anticuerpos policlonales frente a proteínas de huevo entero. Este test se utilizó para el análisis de muestras de helado a las que se habían añadido proteínas de huevo, obteniendo recuperaciones de entre 67 y 96%, y un límite de detección de 0,2 ppm. Además, se analizaron diferentes productos comerciales, como helados, pasta y pan para determinar la presencia de proteínas de huevo, coincidiendo los resultados obtenidos con lo indicado en las etiquetas de todos los productos analizados.

Hefle *et al.* (2001) diseñaron un ELISA de tipo sándwich, en el que utilizaban anticuerpos frente a la clara del huevo como anticuerpos de captura, y anticuerpos frente a la ovoalbúmina como anticuerpos de detección. El límite de detección de este test es de 1 ppm. De las 22 muestras comerciales de pasta analizadas que no contenían huevo según la etiqueta, el 55% resultaron positivas, conteniendo entre <1 y >100.000 ppm de huevo.

Baumgartner *et al.* (2002) desarrollaron un inmunoensayo tipo sándwich en formato de paletas para la detección de proteínas de la clara, que resultó muy específico y sensible, con límites de detección por debajo de 20 µg/kg de huevo. En ese trabajo, de los 16 alimentos comerciales analizados en los que se indicaba la presencia de huevo, 14 dieron un resultado positivo, y de los 11 productos en los que no se indicaba la presencia de huevo, sólo uno resultó ser positivo.

En otro estudio llevado a cabo por Immer *et al.* (2003), se analizaron diferentes productos usando un ELISA comercial para la detección de clara de huevo. De los 32 productos que incluían huevo en la etiqueta, se detectó clara en 27, y de los 11 productos en los que no se mencionaba, se detectó clara en uno. Rolland *et al.* (2008) desarrollaron un ELISA con un límite de detección de 1 ng/mL. La finalidad de este trabajo fue comprobar la ausencia de ovoalbúmina en el vino, debido a que ésta se usa como adyuvante tecnológico, y por lo tanto no debe estar presente en el producto final.

Watanabe *et al.* (2005b) diseñaron una técnica de ELISA para la detección de ovoalbúmina en alimentos modelo que contenían 10 y 50 ppm de huevo en polvo. En la extracción de las muestras se usó un tampón que contenía 2-mercaptoetanol y SDS, y en el ensayo anticuerpos que se habían obtenido frente a la proteína tratada en el mismo tampón. La extracción de proteínas se incrementó al usar dicho reactivo de 10 a 100 veces, dependiendo del producto. En zumo de naranja, la recuperación fue del 93%, para las muestras de 10 ppm, mientras que en otros productos, como galletas o mermelada, las recuperaciones fueron del 47%. Leduc *et al.* (1999) desarrollaron un ELISA de formato competitivo para la detección de clara de huevo, mediante el cual se pudo detectar un 0,03% de huevo en polvo en productos cárnicos crudos y pasterizados (70°C, 2 h), y un 0,125% en esterilizados (115°C, 90 min).

Existen pocos trabajos hasta la fecha de validación de los tests ELISA comerciales dirigidos a la detección de proteínas de huevo. Matsuda *et al.* (2006) realizaron un estudio interlaboratorial para validar dos kits comerciales de ELISA tipo sándwich para la detección de ovoalbúmina y proteínas de huevo, respectivamente. Con estos test se analizaron alimentos modelo procesados, como salchichas, galletas o mermelada, que contenían como ingrediente huevo en polvo a una concentración de 10 µg/g. Los resultados mostraron que las recuperaciones de un test fueron de entre el 52 al 87% para los diferentes productos, mientras que para el otro test fueron de entre el 66 al 95%, encontrando diferencias en la concentración para una misma muestra entre los dos tests de hasta el 127%.

Aunque la mayor parte de los trabajos se han dirigido a la detección de proteínas específicas de la clara, también se ha descrito un método para la determinación de la proteína α -livetina de la yema del huevo en pasta (Pressi *et al.*, 1994). En este trabajo, no se encontraron diferencias de inmunorreactividad entre muestras de pasta secada a temperatura ambiente y aquellas calentadas a 80°C durante 3 horas, debido probablemente a la gran termorresistencia de esta proteína.

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente algunos kits para la detección de huevo en alimentos (Tabla 2). La mayor parte de los tests son técnicas de ELISA en placa de tipo competitivo o de tipo sándwich, y en los últimos años se han comercializado varios tests que utilizan la técnica de inmunocromatografía. Estos kits comerciales están basados en la detección de determinadas proteínas individuales, fundamentalmente la ovoalbúmina o el ovomucoide, o en la detección conjunta de las proteínas de la clara.

II.3. MAÍZ TRANSGÉNICO RESISTENTE A INSECTOS

II.3.1. ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Los organismos genéticamente modificados (OGMs) son aquellos organismos cuyo material genético ha sido modificado mediante técnicas de ingeniería genética, de una manera que no se produce ni en el apareamiento ni en la recombinación natural (Directiva 2001/18/CE). Con ello se pretende obtener alguna característica de interés, por medio de la introducción de un gen que codifica una nueva proteína, o de la modificación e incluso la supresión de la expresión de un gen propio.

En la actualidad, la obtención de vegetales modificados genéticamente es el campo con mayores aplicaciones y posibilidades de desarrollo. Las modificaciones genéticas más utilizadas en los cultivos vegetales son las que confieren resistencia a determinados insectos y tolerancia a ciertos herbicidas.

El primer vegetal transgénico comercial, desarrollado por la empresa Calgene en 1994, fue el tomate “Flavr Savr”, resistente al ablandamiento al tener inhibida la síntesis del enzima poligalacturonasa. En este tomate, se insertó un gen antisentido que inducía la síntesis de un m-RNA complementario del m-RNA de la poligalacturonasa, y que al unirse a él impedía la síntesis del enzima. Por distintas razones, este tomate no ha tenido éxito comercial, pero la aproximación es válida para la modificación de otros vegetales (Skerrit, 2000; Bouis *et al.*, 2003).

Tabla 1: Tests inmunológicos comerciales para la detección de leche o proteínas lácteas.

Casa comercial	Nombre comercial	Alérgeno diana	Tipo de ensayo	Punto de corte
Tepnel Biosystems	BIOKITS BLG	β -lactoglobulina	ELISA	2 ppm
" "	BIOKITS Casein	Caseína	ELISA	1 ppm
" "	RAPID 3-D	Caseína	IC	Low levels
Neogen	Alert for Total Milk	Leche	ELISA	5 ppm
" "	Veratox for Total Milk	Leche	ELISA	2,5 ppm
" "	Reveal for Total Milk	Leche	IC	5 ppm
ELISA Systems	Blg Residue Assay	β -lactoglobulina	ELISA	0,1 ppm
" "	Casein Residue Assay	Caseína	ELISA	0,1 ppm
r- Biopharm	RidaScreen Fast Casein	Caseína	ELISA	0,5 ppm
" "	RidaScreen Fast β -lactoglobulin	β -lactoglobulina	ELISA	5 ppb
Zeus-Immunotec	Proteon β -lactoglobulin	β -lactoglobulina	ELISA	0,5 ppm
" "	Proteon β -lg Express	β -lactoglobulina	IC	1-2 ppm
Ingenasa	30.ES.BLG-48	β -lactoglobulina	ELISA	0,1 ppm
" "	30.ES.CASPRD-48	Caseína	ELISA	0,27 ppm

Tabla 2: Tests inmunológicos comerciales para la detección de huevo o proteínas del huevo.

Casa comercial	Nombre comercial	Alérgeno diana	Tipo de ensayo	Punto de corte
Tepnel Biosystems	BIOKITS Egg	Ovomucoide	ELISA	0,5 ppm
" "	RAPID 3-D	Clara de huevo	IC	Low levels
Neogen	Alert for Egg Allergen	Huevo	ELISA	5 ppm
" "	Veratox for Egg Allergen	Huevo	ELISA	2,5 ppm
ELISA Systems	Egg Residue Assay	Clara de huevo	ELISA	0,1 ppm
r- Biopharm	RidaScreen Fast Ei/Egg	Clara de huevo	ELISA	1 ppm
Zeus-Immunotec	Proteon Ovomucoide	Ovomucoide	ELISA	0,5 ppm
" "	Proteon Ovo Express	Ovomucoide	IC	1-2 ppm
Ingenasa	30.ES.ERD-48	Ovoalbúmina/ ovomucoide	ELISA	1 ppm

ELISA: Enzyme Linked-Immunesorbent Assay; IC: Inmunocromatografía; ppm: partes por millón
 Tepnel Biosystems: www.tepnel.com; Neogen: www.neogen.com; ELISA systems: www.elisas.com; r-Biopharm: www.r-biopharm.com;
 Zeus-Immunotec: zeus-immunotec.com; Ingenasa: www.ingenasa.com

La resistencia a insectos se consigue al insertar en la planta genes aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que codifican toxinas que afectan principalmente a lepidópteros y coleópteros. Los principales cultivos transgénicos comercializados que expresan estas toxinas son el maíz, la soja y el algodón (Jouanin *et al.*, 1998).

La tolerancia a determinados herbicidas se consigue mediante dos vías diferentes. La primera de estas vías es la inserción de un gen obtenido de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que codifica el enzima enolpiruvilshikimato-3 fosfato sintetasa (EPSPS). Este enzima está implicado en la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos. El enzima equivalente del vegetal es inhibido por el herbicida glifosato, pero el bacteriano no, de forma que no se interrumpe la correspondiente ruta metabólica, y la planta transgénica no se ve afectada. La segunda vía es la inserción de un gen de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*, que codifica el enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT). El herbicida glufosinato inhibe un enzima de la ruta biosintética de la glutamina, dando lugar a la acumulación de amonio. El enzima PAT inactiva el glufosinato por acetilación, eliminando su actividad inhibitoria. Los principales cultivos transgénicos comercializados con resistencia a herbicidas son el maíz, la soja, la colza y el algodón (Mackenzie y McLean, 2002).

Un cultivo transgénico con propiedades beneficiosas para el consumidor es el “arroz dorado”, cuya modificación genética da lugar a la producción de un mayor contenido en beta carotenos, precursores de la vitamina A. Su desarrollo podría contribuir a disminuir los problemas causados por la falta de esta vitamina en la población de los países en los que el arroz constituye básicamente el único alimento (Bouis *et al.*, 2003). La modificación genética de especies vegetales podría tener, además, un papel importante en el desarrollo de nuevas variedades de plantas con capacidad para sobrevivir en condiciones medioambientales duras, como en tierras de cultivo con una gran concentración de sales, o en zonas con bajas temperaturas (Mackenzie y McLean, 2002).

A nivel experimental, el número actual de plantas transgénicas obtenidas es muy alto, aunque por el momento sólo algunas se encuentran aprobadas y comercializadas en la Unión Europea. Durante el periodo de 1996 a 2007, el área global de cultivos transgénicos se incrementó de 1,7 a 114,3 millones de hectáreas. La distribución de la superficie total dedicada a cultivos transgénicos en 2007 fue el 57% para la soja, el 25% para el maíz, el 13% para el algodón y el 5% para la colza. De estos cultivos, la tolerancia a herbicidas supuso el 63% de la superficie, la resistencia a insectos el 18%, y los cultivos con ambas características el 19% (James, 2007).

II.3.2. VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL CULTIVO DE VEGETALES TRANSGÉNICOS

El cultivo de variedades transgénicas representa ventajas importantes para el agricultor, al facilitar la lucha contra plagas de insectos o de malas hierbas, lo que conlleva un aumento de la producción y una menor necesidad del uso de plaguicidas (Jouanin *et al.*, 1998; Anklam *et al.*, 2002). Desde el punto de vista medioambiental, los vegetales transgénicos con genes de resistencia a insectos representan una ventaja, desde el momento en que reducen la utilización de insecticidas químicos, menos específicos que el presente en el propio vegetal. También los genes de tolerancia a herbicidas representan una ventaja medioambiental, al permitir una mejor gestión del uso de los herbicidas, utilizando aquellos que son menos tóxicos y persistentes, como el glifosato y el glufosinato, pero que presentaban problemas debido precisamente a su falta de selectividad. Sin embargo, estas ventajas no resultan evidentes para los consumidores, dado que no han llegado a ellos en forma de nuevos productos de mayor calidad o de menor precio.

En los últimos años se ha cuestionado la utilización de vegetales transgénicos desde algunos sectores de la sociedad, acusándolos de representar un peligro para el medio ambiente o para la salud de los consumidores. Esto sucede a pesar de que las variedades transgénicas son sometidas a procesos de evaluación individual de riesgos, tanto en lo que afecta a la seguridad de los consumidores como en lo referente al medio ambiente, y a un seguimiento a largo plazo (EFSA, 2004).

Las críticas más frecuentes acerca de los efectos para el medio ambiente son el riesgo de que el polen de plantas transgénicas pueda afectar a insectos no diana que no son perjudiciales, y el riesgo de paso de genes de resistencia por dispersión del polen de plantas transgénicas a plantas salvajes, dando lugar así a la creación de lo que se ha denominado “supermalezas” (Skerrit, 2000). El segundo planteamiento olvida que esto solamente es posible por polinización entre especies muy próximas, que en los casos de soja y maíz no existen en Europa, y que, en cualquier caso, los parientes salvajes de las plantas cultivadas no han representado nunca un problema como malas hierbas.

Para estimar el riesgo de que el polen del maíz transgénico pueda afectar a insectos no diana, se han realizado una serie de estudios tanto de laboratorio como de campo. Así, Losey *et al.* (1999) utilizando una especie tan emblemática como la mariposa monarca, se encontró que la alimentación forzada en el laboratorio de sus larvas con polen de maíz transgénico reducía significativamente su crecimiento y viabilidad. Sin embargo, tal como los propios autores señalaban, esto no representaba las condiciones reales, aunque evidenciaba la

necesidad de realizar nuevos estudios. Los experimentos realizados posteriormente en condiciones de campo, con la propia mariposa monarca (Stanley-Horn *et al.*, 2001), o con otros insectos, han demostrado que el efecto lesivo de la protección biológica frente a insectos es inexistente o mínimo sobre las poblaciones de insectos no diana, comparado con la misma planta convencional sin ningún tratamiento. También hay que considerar que el uso de insecticidas químicos podría ser incluso más perjudicial para estas poblaciones de insectos que el uso de cultivos transgénicos.

Desde el punto de vista agronómico, la crítica derivada del cultivo de vegetales transgénicos con proteínas insecticidas es el riesgo de aparición de fenómenos de resistencia en insectos diana, lo mismo que ha sucedido en el caso de la utilización de insecticidas químicos. La gestión de este problema exige el mantenimiento de áreas sembradas de maíz no transgénico, para disminuir la presión de selección y retardar la aparición de poblaciones resistentes.

La crítica más frecuente acerca de los efectos económicos es que las semillas transgénicas son más caras que las tradicionales, y que, además las empresas productoras intentan evitar la práctica tradicional de “autosuministro” de semillas para años sucesivos. Aún así, los cultivos transgénicos parecen ser suficientemente más rentables para que compensen el mayor gasto en la semilla.

Una de las principales preocupaciones sobre los efectos adversos de los cultivos transgénicos en la salud del consumidor es la aparición de fenómenos de alergias (Lack, 2002). Hasta el momento, el único caso conocido se produjo debido a la introducción en la soja del gen que codifica la globulina 2S de la nuez del Brasil (*Bertholletia excelsa*). El objetivo en este caso era conseguir una soja para alimentación animal, con una proteína con un mayor contenido en aminoácidos azufrados, dado que la proteína de la soja es deficiente en ellos, y en cambio la globulina 2S de la nuez de Brasil es particularmente rica en metionina. Sin embargo, dado que la globulina 2S es también uno de los alérgenos principales de la nuez de Brasil, se estudió y comprobó que cuando se expresaba en la soja, ésta era capaz de interactuar *in vitro* con IgE obtenidas de personas alérgicas a la nuez de Brasil (Nordlee *et al.*, 1996). Consecuentemente, sería probable que produjera en ellas una reacción alérgica si la ingirieran, por lo que esta soja nunca se llegó a comercializar. En el caso del maíz resistente a insectos, la experiencia del uso desde hace años de las toxinas de *B. thuringiensis* en la agricultura biológica sin que se hayan indicado casos de alergia hace que no parezca probable su aparición al encontrarse dentro de un transgénico.

Otra de las preocupaciones acerca del consumo de transgénicos es la posibilidad de que las bacterias del tracto intestinal puedan incorporar la información genética que da la

resistencia a antibióticos, utilizados como marcadores en las técnicas de ingeniería genética. Aunque la transmisión de genes desde vegetales a bacterias no ha sido comprobada, la legislación europea ha recomendado no insertar marcadores que confieran resistencia a los antibióticos en la producción de cultivos transgénicos que puedan ser usados en la fabricación de alimentos o sus ingredientes (Syvanen, 1999; Directiva 2001/18/EC).

Estas preocupaciones acerca de la seguridad de los cultivos transgénicos entre la población, sobre todo en la Unión Europea y Japón, se ha manifestado en peticiones a las administraciones públicas de medidas reguladoras, en forma de prohibiciones de ciertos cultivos, así como de obligaciones en el etiquetado de los alimentos destinados tanto a consumo humano como animal que contengan OGMs o sean derivados de estos (Moseley, 1999).

II.3.3. LEGISLACIÓN SOBRE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

El marco legislativo acerca de los alimentos transgénicos está siendo modificado y ampliado desde que, en 1997, se publicara el Reglamento 97/258/EC del Parlamento Europeo y del Consejo sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios, con objeto salvaguardar la salud de la población, proteger el medio ambiente y crear un mercado seguro y unificado en el campo de los productos obtenidos por biotecnología.

Las normas relativas a los alimentos y piensos genéticamente modificados están ahora separadas de las de los “nuevos alimentos”, pero se mantienen los mismos principios y objetivos. En la Directiva 2001/18/EC (Real Decreto 178/2004) sobre la liberación intencionada al medio ambiente de OGMs, se describen los elementos que deben considerarse, y los principios generales y la metodología que deben seguirse para llevar a cabo una rigurosa evaluación científica del riesgo derivado del uso de alimentos transgénicos, necesaria para su posterior autorización.

El Reglamento 1829/2003/EC del Parlamento Europeo y del Consejo sobre alimentos y piensos genéticamente modificados, indica que todos los alimentos y piensos que contengan, estén compuestos o se hayan producido a partir de OGMs aprobados, en cantidades mayores de 0,9% deben estar indicados en la etiqueta, siempre que vayan al consumidor final o a colectividades. Además, se establece un límite de 0,5% para aquellos cultivos que han obtenido un informe de riesgos favorable pero no cuentan todavía con la aprobación en la Unión Europea, mientras que las variedades no aprobadas tienen tolerancia cero. Dichos

umbrales se aplican a los ingredientes considerados individualmente. Los productos derivados de animales alimentados con piensos genéticamente modificados, como leche, carne o huevos, están exentos de etiquetado. En la anterior legislación los alimentos tenían que indicar en la etiqueta la presencia de OGMs si el DNA introducido o la proteína expresada podían ser detectados por encima del límite establecido, mientras que la actual legislación exige que también se etiqueten los alimentos que contienen ingredientes producidos a partir de OGMs, aunque estén libres de DNA o proteínas, como los aceites vegetales refinados o los jarabes de glucosa. Las reglas detalladas para la implementación del Reglamento 2003/1829/EC están indicadas en el Reglamento de la Comisión 2004/641/EC, cuya fecha de aplicación fue el 14 de abril de 2004.

El Reglamento 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la trazabilidad y el etiquetado de alimentos y piensos derivados de OGMs, establece el marco legislativo para facilitar el etiquetado preciso, el seguimiento de los efectos en el medio ambiente y, cuando proceda, sobre la salud, y la aplicación de las medidas de gestión de riesgo adecuadas, incluida, en caso necesario, la retirada de productos.

El Reglamento 2004/65/EC establece un sistema para el desarrollo y asignación de identificadores únicos para los OGMs. Se trata de un código alfa-numérico sencillo cuyo objeto es identificar cada OGM conforme a la transformación genética autorizada de la que procede y facilitar que se recabe la información específica requerida.

II.3.4. MAÍZ TRANSGÉNICO RESISTENTE A INSECTOS

El maíz es susceptible de ser atacado por los taladros europeos del maíz, nombre común con el que se designa a las orugas de las mariposas *Ostrinia nubilalis* y varias especies de *Sesamia*. En Estados Unidos y otras zonas maiceras, esta plaga se extiende también a la especie *Diatrea grandiosella* (Castañera, 1996). Estas especies tienen la particularidad de desarrollarse en el interior de las cañas del maíz, lo que disminuye la capacidad de producción de las plantas y las hace muy vulnerables a la caída por lluvia o viento.

Estos insectos destruyen hasta un 4% de la producción media mundial de maíz, llegando incluso a un 20% en las zonas más afectadas, poniendo en peligro la viabilidad del cultivo (Sanders *et al.*, 1998). En España se estima que las plagas producidas por taladros afectan de forma endémica a unas 80.000 hectáreas de maíz, pudiéndose llegar a producir pérdidas de cosecha de hasta un 11% (Fernández-Anero *et al.*, 1999).

La lucha para controlar las plagas producidas por los taladros del maíz se ha intentado por diversos métodos: control químico, utilizando insecticidas; agronómico, cambiando las prácticas de cultivo; biológico, utilizando parásitos contra las larvas o huevos; y control genético, desarrollando variedades de plantas transgénicas resistentes a su ataque, siendo los dos últimos los que han resultado ser más beneficiosos. Uno de los insecticidas más utilizados para combatir las plagas producidas por los taladros del maíz es el que utiliza las toxinas producidas por *Bacillus thuringiensis* (Bt), una bacteria gram-positiva formadora de esporos (de Maagd *et al.*, 1999). Durante la fase de esporulación, tiene lugar la formación de cristales parasporales, conocidos como δ -endotoxinas, que son usadas como insecticidas al tener gran actividad a bajas concentraciones.

En los años 30 se usaron diferentes formulaciones del insecticida que contenían preparaciones bacterianas en forma de spray, pero la producción a gran escala empezó con la introducción de preparados como el "Thuricide™" a finales de los años 50. Sin embargo, el uso de esos insecticidas presenta el problema de que las proteínas insecticidas producidas por las bacterias pierden su actividad bajo la luz ultravioleta, por lo que es necesario realizar múltiples aplicaciones a lo largo de diferentes etapas de crecimiento. Además, los insecticidas sólo pueden proteger la superficie de la planta, por lo que son ineficaces frente a las larvas que crecen dentro de los tejidos (de Maagd *et al.*, 1999).

El desarrollo de plantas transgénicas que tienen insertados genes que expresan las proteínas tóxicas en sus tejidos trató de solucionar estos problemas. En ellas, la toxina se está produciendo continuamente y está protegida frente a la degradación por la luz, y dado que se expresa en los tejidos también es ingerida por las larvas que se alimentan en el interior de las cañas (de Maagd *et al.*, 1999). Los primeros resultados referentes a la transferencia de los genes de *Bacillus thuringiensis* en plantas de tabaco y de tomate fueron publicados en 1987. Desde entonces, se han transferido genes de *Bacillus thuringiensis* a otras especies como algodón, maíz y soja (Jouanin *et al.*, 1998).

El maíz derivado de la línea MON810 fue el primero con resistencia a insectos aprobado en la UE para el cultivo y consumo, con fecha 22 de Abril de 1998 (Decisión de la Comisión 98/294/CE). Hasta la fecha, otros ocho eventos más de maíz transgénico resistente a insectos han sido aprobados por la Unión Europea (Tabla 3).

Los genes Cry más usados en estos cultivos son los que codifican las proteínas insecticidas frente a lepidópteros, Cry1A(b) y Cry1F, y frente a coleópteros, Cry3Bb1, Cry34Ab1 y Cry35Ab1. El uso de cultivos resistentes a insectos ha ido aumentando en los últimos años, hasta alcanzar el 18% (20,3 millones de hectáreas) de los cultivos transgénicos

Tabla 3:Eventos de maíz transgénico resistente a insectos autorizados en la UE. (http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_print_en.cfm, 16/10/2008).

Evento/Identificador	Compañía	Característica, gen insertado
Bt11/SYN-BT 011-1	Syngenta	Resistencia a lepidópteros, gen Cry1A(b) Tolerancia al glufosinato, gen PAT
DAS1507/DAS-015 07-1	Pioneer y Dow AgroSciences	Resistencia a lepidópteros, gen Cry1F Tolerancia al glufosinato, gen PAT
DAS59122/DAS- 59122-7	Pioneer y Dow AgroSciences	Resistencia a coleópteros, genes Cry34Ab1/ Cry35Ab1 Tolerancia al glufosinato, gen PAT
DAS1507 xMON603/DAS-01507-1 x MON-00603-6	Pioneer y Dow AgroSciences	Resistencia a lepidópteros, gen Cry1F Tolerancia al glufosinato, gen PAT
MON 810/MON-00810-6	Monsanto	Tolerancia al glifosato, gen CP4 EPSPS
MON 863/MON-00863-5	Monsanto	Resistencia a lepidópteros, gen Cry1A(b)
MON863xNK603 /MON-00863-5 x MON-00603-6	Monsanto	Resistencia a coleópteros, gen Cry3Bb1 Tolerancia al glifosato, gen CP4 EPSPS
MON863xMON810 /MON-00863-5 xMON-00810-6	Monsanto	Resistencia a lepidópteros, gen Cry1A(b) Resistencia a coleópteros, gen Cry3Bb1
NK603 x MON810 /MON-00603-6 xMON-00810-6	Monsanto	Resistencia a lepidópteros, gen Cry1A(b) Tolerancia al glifosato, gen CP4 EPSPS

En España, en 2006 se cultivaron 70.000 hectáreas de maíz transgénico resistente a insectos, lo que equivale a alrededor del 21% de la superficie sembrada con maíz en ese año (James, 2006; James, 2007).

II.3.5. TOXINAS Cry DE *Bacillus thuringiensis*

II.3.5.1. Clasificación y modo de acción de las toxinas Cry

Desde que se clonó por primera vez un gen que codificaba una proteína insecticida de la familia Cry (Schnepf y Whiteley, 1981), se han aislado y secuenciado más de 90 genes de diferentes subespecies de *B. thuringiensis* que codifican proteínas con actividad insecticida. Cada uno de estos genes recibe el nombre de la proteína que codifica (Crickmore *et al.*, 1998; Jouanin *et al.*, 1998).

Las proteínas Cry se clasificaron en primer lugar basándose en su actividad insecticida y en su homología estructural. Siguiendo esta clasificación, las proteínas CryI eran tóxicas para lepidópteros, las CryII para lepidópteros y dípteros, las CryIII para coleópteros, las CryIV para dípteros, y las CryV y CryVI para nematodos (Höfte y Whiteley, 1989; Jouanin *et al.*, 1998). Sin embargo, posteriores análisis de la secuencia de nucleótidos de las proteínas revelaron que esta clasificación presentaba algunos problemas, como la existencia de proteínas de secuencia homóloga pero con diferente actividad insecticida. Por ello, se propuso una nueva clasificación basada exclusivamente en la homología de la secuencia de aminoácidos.

Según esta clasificación, las proteínas Cry se designan de acuerdo a un sistema de nomenclatura que consta de tres categorías principales y una cuarta secundaria: la primera es un número arábigo, la segunda una letra mayúscula, la tercera una letra minúscula, y la cuarta otro número arábigo. Las proteínas con un mismo número en la primera categoría presentan más de un 45% de homología en su secuencia y a menudo afectan a la misma familia de insectos. Las proteínas con la misma letra en la segunda categoría presentan más de un 75% de homología, y las que proteínas con la misma letra en la tercera categoría más de un 95%. La cuarta categoría se asigna a toxinas con secuencias idénticas pero aisladas de fuentes independientes, por lo que a menudo no aparece en el nombre de la toxina. De esta forma, existen 26 proteínas denominadas Cry1A(b), aisladas de diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Como ejemplos, la Cry1A(b)1 fue aislada de la cepa Bt *berliner*, mientras que

las proteínas Cry1A(b)3, Cry1A(b)4 y Cry1A(b)10 fueron aisladas de la cepa Bt *kurstaki* HD-1 (Crickmore *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001; http://biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt).

El modo de acción de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis* ha sido extensamente estudiado y revisado (English y Slatin 1992; Gill *et al.*, 1992; Dean *et al.*, 1996). Las proteínas, de entre 50 y 140 kDa, se encuentran en forma de protoxina, y deben ser ingeridas por las larvas del insecto, tras lo cual se solubilizan debido al pH alcalino de su sistema digestivo y son hidrolizadas por las proteasas del intestino del insecto, principalmente por la tripsina. Esta proteólisis da como resultado las toxinas activas, que están formadas por fragmentos de entre 40 y 70 kDa (Nickerson, 1980; Fast, 1981; Huber y Lüthy, 1981; Aronson *et al.*, 1986).

Después, las toxinas se unen a receptores específicos, localizados en los bordes vellosos del epitelio del tubo digestivo medio (Hofmann *et al.*, 1988a y b). Esta interacción induce la formación de poros que alteran el flujo de iones existente en la mucosa del tubo digestivo, lo que produce la parálisis del mismo y la muerte de los insectos (Aronson *et al.*, 1986; Jouanin *et al.*, 1998). Las proteínas Cry son inocuas para los mamíferos y otros insectos no diana al carecer de los receptores específicos para las toxinas.

II.3.5.2. Caracterización y propiedades de la toxina Cry1A(b)

Cuatro de los nueve eventos de maíz transgénico resistente a insectos aprobadas para su comercialización en la UE tienen insertado el gen que codifica la proteína Cry1A(b) (Tabla 3). Se trata de una proteína de *B. thuringiensis* de unos 130 kDa, con una potente actividad insecticida frente a las larvas de lepidópteros (Dulmage, 1981). En el evento de maíz transgénico MON810, la proteína Cry1A(b), procedente del gen de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD-I, se encuentra a niveles de unos 9,35 µg/g en la hoja fresca, y de 0,31 µg/g en el grano (AGBIOS, 2004). Esta proteína se expresa como la forma activa de la toxina, de menor peso molecular, por lo que no es necesaria la activación previa en el intestino del insecto (Lee *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2005).

Estructuralmente, la protoxina producida por *B. thuringiensis* se divide en tres dominios. Los dominios II y III están localizados en el extremo N-terminal, son de naturaleza hidrofóbica, y poseen la toxina activa. El dominio I, localizado en el extremo C-terminal es de naturaleza hidrofílica y su función todavía se desconoce, aunque se ha propuesto que podría

participar en la formación de los cuerpos de inclusión de la bacteria (Höfte y Whiteley, 1989; de Maagd *et al.*, 1999; de Maagd *et al.*, 2003). El extremo C-terminal contiene 14 de las 16 cisteínas y 31 de las 34 lisinas de la protoxina. Los grupos tiol de la proteína solubilizada están expuestos en la superficie de la molécula, cuya estructura se estabiliza por 6 puentes disulfuro (Huber y Lüthy, 1981).

La toxina presenta una mayor solubilidad a un pH mayor de 9,5 (~8 mg/mL a pH 10,5) y menor de 3,5 (~5 mg/mL a pH 3), y tiene un punto isoeléctrico de 5,5 en geles nativos y de 6,0 en geles de urea (Bietlot *et al.*, 1989).

Se ha indicado que la proteína Cry1A(b) es degradada por la pepsina presente en fluidos gástricos en aproximadamente dos minutos, pero que es resistente a la digestión por tripsina y otras proteasas, ya que no alcanza una degradación sustancial hasta pasadas unas 20 horas de incubación en fluidos intestinales con tripsina (AGBIOS, 2004; Lutz *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2007).

Sólo existe un trabajo realizado, utilizando la técnica de calorimetría diferencial de barrido, sobre la resistencia de la proteína Cry3A (Potekhin *et al.*, 1999). Se ha realizado también un estudio para determinar el efecto del tratamiento térmico sobre la proteína Cry1A(b) expresada en *E. coli*, que ha mostrado que ésta pierde completamente su actividad insecticida tras un tratamiento a 80°C durante 10 minutos, mientras que en el mismo estudio no se observó un descenso en la actividad de la proteína Cry9C expresada en maíz tras un tratamiento a 90°C durante 10 minutos (Perferoen, 1998). El único estudio sobre el efecto que el tratamiento térmico tiene sobre la proteína Cry1A(b) expresada en el maíz, aparte del que se ha realizado en esta Tesis, es el de Van den Bulcke *et al.* (2007), quienes usaron un test comercial cualitativo de inmunocromatografía para detectar la proteína Cry1A(b) presente en granos de maíz transgénico. La proteína fue detectada después de un tratamiento de 1 hora a 55°C, pero no tras un tratamiento a 80°C durante el mismo tiempo.

II.3.5.3. Técnicas analíticas para la detección de proteínas Cry

La actual legislación de la Unión Europea sobre etiquetado de alimentos y piensos genéticamente modificados ha promovido el desarrollo de técnicas analíticas para su determinación. Las técnicas desarrolladas están basadas tanto en la detección del DNA insertado, mediante la técnica de PCR, como de las proteínas expresadas, mediante técnicas

inmunoquímicas como inmunoensayo enzimático e inmunocromatografía (Stave, 1999; Ahmed, 2002; Anklam *et al.*, 2002; Miraglia *et al.*, 2004).

Las técnicas de ELISA se han aplicado para la detección de proteínas Cry en suelos (Tapp y Stotzky, 1995; Hori *et al.*, 2000), en formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* (Takahashi *et al.*, 1998) y en diferentes cultivos transgénicos, como el algodón (Sims y Berberich, 1996) o la caña de azúcar (Vázquez *et al.*, 1996).

En el caso del maíz transgénico, las técnicas inmunoquímicas utilizadas para la detección de la proteína Cry1A(b) se han usado fundamentalmente para el análisis de grano y harina (Hupfer *et al.*, 1997; Lipp *et al.*, 1999a y b; Walschus *et al.*, 2002; Roda *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos han mostrado límites de detección para la proteína Cry1A(b) de 0,4 ng/mL utilizando un formato de ELISA en placa de tipo sándwich (Walschus *et al.*, 2002), de 0,1 ng/mL utilizando esferas magnéticas tapizadas con anticuerpos específicos (Ermolli *et al.*, 2006b), de 5 pg/mL mediante el uso de técnicas inmunoquímicas utilizando anticuerpos específicos marcados con sustancias fluorescentes (Roda *et al.*, 2006), e incluso de 0,357 pg/mL utilizando anticuerpos marcados con reactivos fluorescentes (Fantozzi *et al.*, 2007). En algunos de estos trabajos se observaron reacciones cruzadas con otras proteínas Cry, como la Cry9C o la Cry1A(c). La mínima fracción de maíz transgénico detectada en una mezcla con maíz convencional mediante algunas de estas técnicas es del 0,1%, valor que está por debajo del límite establecido por la legislación (Walschus *et al.*, 2002; Ermolli *et al.*, 2006b; Roda *et al.*, 2006; Fantozzi *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR en los diferentes trabajos tienen también un límite de detección similar (Hupfer *et al.*, 1997; Lipp *et al.*, 1999b; Bordoni *et al.*, 2004; Bordoni *et al.*, 2005).

Un aspecto importante a considerar en la detección de OGMs en alimentos es que los tratamientos tecnológicos aplicados durante el procesado de los alimentos pueden degradar sustancialmente el DNA y las proteínas, impidiendo su detección por las técnicas convencionales (Terry *et al.*, 2002). Sin embargo, existen pocos trabajos dirigidos a estudiar cómo afecta el procesado de los alimentos a la detección de maíz modificado genéticamente, tanto mediante técnicas genéticas (Hurst *et al.*, 1999; Lipp *et al.*, 2001; Greiner *et al.*, 2005) como inmunoquímicas (Díaz *et al.*, 2002; Margarit *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos por Lipp *et al.* (2001) mediante la técnica de PCR, basada en la detección de fragmento promotor 35s, mostraron que la técnica era adecuada para el análisis de maíz transgénico que había sufrido un tratamiento térmico severo, de 100°C durante 45 minutos y de 180°C durante 10 minutos. Resultados similares fueron observados

por Hupfer *et al.* (1998), basados en la detección del fragmento promotor Cry03/04 en muestras de polenta, ya que éste fue detectado tras 105 minutos de calentamiento a 100°C.

Sin embargo, los resultados obtenidos en otros trabajos indican que las técnicas de PCR o inmunoquímicas pueden detectar el maíz transgénico en alimentos poco procesados, tales como polenta precocinada y piensos, mientras que no es posible detectarlo en alimentos altamente procesados, tales como tortillas o copos de maíz (Díaz *et al.*, 2002; Margarit *et al.*, 2006; Van den Bulcke *et al.*, 2007). Por todo ello, es de interés realizar estudios para conocer tanto los parámetros cinéticos y termodinámicos de desnaturalización de las proteínas Cry, como para conocer el efecto que los tratamientos tecnológicos comúnmente aplicados en la industria tienen sobre las proteínas expresadas. Además, con el objeto de conocer la aplicabilidad y limitaciones de las técnicas que se usan habitualmente en su detección cuando se analizan alimentos procesados, resulta necesario realizar estudios con alimentos modelo elaborados con harina de maíz transgénico.

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente algunos kits para la detección de la proteína Cry1A(b) en grano y harina (Tabla 4). La mayor parte de los tests son técnicas de ELISA en placa, y en los últimos años se han comercializado varios tests que utilizan la técnica de inmunocromatografía. Estas técnicas son capaces de detectar esta proteína en grano a niveles inferiores al 0,9%. En un trabajo realizado por Ermolli *et al.* (2006a), se compararon 3 tests de ELISA comerciales para la detección de la proteína Cry1A(b), y todos los tests pudieron detectar 0,1% de harina de maíz transgénico en una mezcla con harina de maíz convencional.

Tabla 4: Tests inmunológicos comerciales para la detección de la proteína Cry1Ab

Casa comercial	Nombre comercial	Matriz	Tipo de ensayo	Punto de corte
Strategic Diagnostic	GMO Check Bt1	Harina y grano de maíz	ELISA	nd
" "	Trait Check Bt1	Grano de maíz	IC	1% Bt11 / 2% MON810
" "	Trait Check Bt1 Leaf/Seed	Hoja y semillas de maíz	IC	1%
" "	Trait Bt1/LL Combo	Grano de maíz	IC	1% Bt11 / 2% MON810
" "	Trait Triple Trait Corn	Grano de maíz	IC	1% Bt11 / 2% MON810
" "	Seed Check Cry1Ab	Hoja y grano de maíz	IC	nd
Ingenasa	30.AP.003.CRBS	Hojas y semillas, maíz y algodón	ELISA	nd
" "	30.AS.003.BG	Grano de maíz y algodón	IC	nd
" "	30.AS.003.LS	Hojas de maíz y algodón	IC	nd
Envirologix	QualiPlate Kit for Cry1Ab/3Bb1	Hoja y grano de maíz	ELISA	P / A
" "	QualiPlate Kit for Cry1Ab/1Ac	Hoja y grano de maíz	ELISA	P / A
" "	QuickStix Kit for Cry1Ab Bulk Grain	Grano y harina de maíz	IC	1%
" "	QuickStix Kit for Cry1Ab Leaf/Seed	Grano y harina de maíz	IC	5-10 ppb
" "	QuickStix Combo Kit for YieldGard	Hoja y grano de maíz	IC	P / A
Abraxis	Cry1Ab/Cry1Ac ELISA kit	Maíz y algodón	ELISA	1,5 ng/mL

ELISA: Enzyme Linked-Immunosorbent Assay; IC: Inmunocromatografía; nd: no disponible; P/A: presencia/ausencia.

Strategic Diagnostic: www.sdx.com; Ingenasa: www.ingenasa.es; Envirologix: www.envirologix.com; Abraxis: www.abraxiskits.com

III. Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIALES

Los granos y las hojas frescas de maíz transgénico (variedad DKC6575) que contenían el evento MON810, y no transgénico, fueron generosamente donados por R. Nasarre (Zaragoza, España). La proteína Cry1A(b) obtenida de *Bacillus thuringiensis* y activada mediante tripsinización fue amablemente cedida por el Profesor W.J. Moar (Auburn University, AL, EEUU). La leche en polvo desnatada fue suministrada por Reny Picot (Anelo, Asturias, España), y el huevo entero en polvo fue amablemente cedido por Ovosec S.A. (Huevos Mayer, S.A., Valladolid, España).

Los conjugados comerciales de IgG anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa, las IgG anti-IgG de conejo conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), la peroxidasa de rábano (250-503 U/mg), la agarosa, la β -lactoglobulina bovina, el ovomucoide, la ovoalbúmina, el ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (tampón MES), la pepsina porcina (4,23 unidades/mg), los adyuvantes de Freund completo e incompleto y el Sephadex G-100 fueron suministrados por Sigma (Poole, Reino Unido). La Sepharose 4B BrCN-activada, los geles de poliacrilamida, los tampones de dodecil sulfato sódico (SDS) y los marcadores de pesos moleculares proceden de Pharmacia Biotech (Upsala, Suecia). El test del ácido bicinocínico (BCA) y el estabilizador del conjugado de la peroxidasa son de Pierce (Rockford, IL, EEUU).

El 5,5-dietilbarbiturato sódico y el óxido de calcio fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España), y el 4-cloro-1-naftol por Merck (Darmstad, Alemania). El sustrato de la peroxidasa que contenía tetrametilbencidina (TMB) y los tests de ELISA Proteon proceden de ZEU-Inmunotec (Zaragoza, España). Las placas de ELISA F96 Maxisorp se obtuvieron de Nunc (Roskilde, Dinamarca) y las hojas de nitrocelulosa (Trans Blot Transfer Medium) de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU).

Las esferas de látex coloreadas de $0,280 \pm 0,005 \mu\text{m}$ (KI-030) proceden de Estapor (Pithiviers, Francia), las membranas de nitrocelulosa HiFlow Plus HFB12502, la membrana de 10.000 Pellicon2, y el papel de filtro Whatmann 3MM, de Millipore (Bedford, MA, EEUU), y las membranas de celulosa Absorbent Paper Type 197 y Accuwik Ultra 8"x10" de Pall Corporation (East Hills, NY, EEUU). Las membranas de diálisis de punto de corte de 12.000 se obtuvieron de Medicell (Londres, Reino Unido), y los discos de ultrafiltración de punto de corte de 10.000, y las fibras huecas de 1.000.000, de Amicon (Beberly, MA, EEUU).

El resto de los productos utilizados no señalados específicamente fueron reactivos de grado analítico obtenidos de diversas fuentes.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. OBTENCIÓN DE ANTISUEROS

En este trabajo se han obtenido antisueros en conejos frente a la β -lactoglobulina bovina, el ovomucoide y la proteína Cry1A(b) obtenida de *Bacillus thuringiensis*, según el siguiente protocolo. A cada conejo se le inyectó por vía subcutánea 1 mg de β -lactoglobulina bovina u ovomucoide (previamente purificadas por filtración en Sephadex G-100), ó 60 μg de proteína Cry1A(b), disueltos en 0,6 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 realizó una sangría de prueba y se determinó la presencia de anticuerpos por inmunodifusión doble e inmunoblotting, como se describe a continuación. Si la sangría resultaba positiva, los animales se sangraban por incisión en la vena auricular externa, utilizando xileno como vasodilatador, y si era negativa se repetía la inoculación de la

proteína con adyuvante incompleto. Para las sangrías sucesivas, se dejó recuperar a los animales durante 30 días, repitiendo las inoculaciones con adyuvante incompleto a los 15 días de cada sangría. La sangre obtenida se dejó coagular espontáneamente a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó a 500 g durante 10 minutos, y posteriormente se congeló en alícuotas a -20°C hasta su uso.

III.2.2. INMUNODIFUSIÓN DOBLE

La inmunodifusión doble se realizó según el método de Ouchterlony (1948) en geles de agarosa al 1% en tampón 5,5-dietilbarbiturato sódico 30 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4, preparados sobre portaobjetos. Las muestras se dejaron difundir durante 24 horas en una cámara húmeda en la que se introdujeron algunos cristales de timol como conservante.

Después del tiempo de difusión, los geles se lavaron al menos durante 48 horas con SSF, que se cambió varias veces y, finalmente, con agua destilada. Los inmunoprecipitados se tiñeron con una solución de colorante azul de Coomasie (0,25 g de colorante Azul de Coomasie tipo G, 450 mL de metanol, 60 mL de ácido acético y 490 mL de agua destilada) y posteriormente se decoloraron con un decolorante que contenía 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 inmunoprecipitados.

III.2.3. INMUNOELECTROFORESIS

La inmunoelectroforesis se realizó en geles de agarosa al 1,5% en tampón 5,5-dietilbarbiturato sódico 25 mM, pH 8,2 de 2 mm. Tras aplicar las muestras (8 μl /pocillo) en los pocillos practicados en el gel, la electroforesis se realizó a 14 V/cm, y utilizando Negro Amido para visualizar el frente de la misma.

Una vez completada la migración, se aplicaron los diferentes antisueros en ranuras realizadas a lo largo del gel entre los pocillos de las muestras. La inmunodifusión se desarrolló durante 24 horas en una cámara húmeda. A continuación, los geles se lavaron con SSF, durante 48 horas, se tiñeron utilizando una solución de colorante Azul de Coomasie y se destiñeron como se ha explicado anteriormente.

III.2.4. INMUNODOTTING

Las muestras de proteína (1 μ L) 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, en el caso de la β -lactoglobulina o la Cry1A(b), o de caseína al 3% (p/v) en el mismo tampón, en el caso del ovomucoide, 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 antisuero correspondiente en ovoalbúmina al 3% (p/v) en SSF, o en caseína al 1% (p/v) en el mismo tampón, según cada proteína, 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) o en caseína al 1% (p/v), según la proteína, 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 μ L de H₂O₂ al 30%.

III.2.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

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. 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 que contenían un gradiente de 8 a 25% de acrilamida o de High Density. En todos los geles se incluyó además un estándar que contenía varias proteínas de diferente peso molecular así como azul de bromofenol para visualizar el frente electroforético. Las electroforesis se realizaron en un equipo Phast System (Pharmacia, Upsala, Suecia) siguiendo las recomendaciones que el fabricante establece para cada tipo de gel.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con colorante Azul de Coomasie compuesto por 0,65 g de Azul de Coomasie tipo R, 450 mL de metanol, 60 mL de ácido acético, 60 mL de glicerol y 430 mL de agua destilada. Los geles se cubrieron totalmente con el colorante y se pusieron en agitación durante una hora. Después de este

tiempo, 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.

III.2.6. INMUNOTRANSFER

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 $2 \text{ mA/cm}^2 \text{ V}$ durante 45 minutos. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, la nitrocelulosa se incubó como se ha indicado en el caso del inmunodotting.

III.2.7. PREPARACIÓN DE INMUNOADSORBENTES

Para la preparación de inmunoadsorbentes, a 2,5 g de Sepharose 4B activada se le añadieron 20 mL de HCl 1 mM. El gel obtenido se lavó con 1 L de HCl 1 mM, utilizando un embudo de vidrio sinterizado, y después se equilibró con tampón bicarbonato sódico 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3. A continuación, a 7 g de la Sepharose 4B lavada y escurrida se le añadieron 7 mL de una solución de la proteína específica a insolubilizar (3 mg/mL) disuelta en el mismo tampón bicarbonato. La mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche en agitación moderada, y después el gel se lavó en una placa filtrante con alícuotas del mismo

tampón, que se recuperaron para medir la cantidad de proteína no ligada al gel. El gel se incubó con 5 mL de etanolamina 1M, pH 8,0, durante 30 minutos para bloquear los grupos activos que no hubieran reaccionado con las proteínas, y finalmente se lavó para eliminar la etanolamina y se equilibró con SSF.

III.2.8. AISLAMIENTO DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

Para aislar los anticuerpos específicos, un volumen de 25 mL del antisuero se aplicó a la columna que contenía el inmunoabsorbente con la proteína correspondiente insolubilizada, haciéndolo pasar a un flujo de aproximadamente 0,1 mL/min. La columna se lavó con tampón fosfato potásico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4 hasta que la absorbancia del eluido a 280 nm fue menor a 0,02. Después, los anticuerpos se eluyeron con un tampón glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8, en el caso de la β -lactoglobulina y el ovomucoide, y con tampón glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,5 que contenía dioxano al 10%, en el caso de la proteína Cry1A(b). Las fracciones eluidas fueron neutralizadas inmediatamente con volúmenes previamente calculados de tampón Tris 0,5 M, pH 8,0, que se depositaron en los tubos antes de recoger el eluido. Por último, los anticuerpos eluidos se dializaron frente a SSF y se concentraron por ultrafiltración utilizando membranas de punto de corte de 10.000. Los anticuerpos concentrados se congelaron a -20°C hasta su uso. La concentración de los anticuerpos purificados se determinó por espectrometría usando el coeficiente de extinción molar a 280 nm $E_{1\%} = 14$.

III.2.9. CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS CON PEROXIDASA

Una cantidad de 5 mg de peroxidasa de rábano se disolvió en 0,5 mL de agua destilada, protegiendo la solución de la luz con papel de aluminio. Se añadieron lentamente 80 μL de periodato sódico 25 mM y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, en agitación suave y protegida de la luz. A continuación, se añadieron 0,1 mL de una solución acuosa de etilenglicol al 1% (v/v), y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

La peroxidasa oxidada se dializó frente a 5 L de tampón acetato sódico 1 mM, pH 4,4 a 4°C toda la noche, utilizando una membrana de punto de corte de 12.000. Los anticuerpos se

dializaron frente a tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,2 y se concentraron con una célula de ultrafiltración hasta 10 mg/mL.

Se mezclaron 0,1 mL de la solución de peroxidasa y de anticuerpos dializados y se añadieron 50 μ L de tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,2. La mezcla se incubó 4 horas en agitación suave, a temperatura ambiente y protegida de la luz. A continuación, la mezcla se introdujo en un baño de hielo picado, se añadieron 50 μ L de tampón BH_4Na 0,1 M y se incubó 40 minutos a 4°C. Por último, la mezcla se dializó toda la noche a 4°C frente a tampón KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KCl 3 mM, NaCl 0,14 M pH 7,4 (PBS), y se dividió en alícuotas que se guardaron a -20°C hasta su uso.

III.2.10. TÉCNICAS DE ELISA EN PLACA

a. Técnica de ELISA no competitivo indirecto

Para la determinación del título de los antisueros se realizó un ELISA indirecto no competitivo, como se describe a continuación.

Las placas se tapizaron con 100 μ L/pocillo de una solución de proteína (5 μ g/mL) en tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6. Tras la incubación a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron 5 veces con 300 μ L/pocillo de agua destilada y se incubaron con 300 μ L/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v) en el caso de la β -lactoglobulina y la proteína Cry1A(b), y una solución de caseína al 1% (p/v) en el caso del ovomucoide, 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 con agua destilada, y después, las placas se incubaron con 100 μ L/pocillo de diferentes diluciones del antisuero correspondiente, a 37°C durante 1 hora. Tras 5 lavados con PBST, se añadieron 100 μ L/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 μ L/pocillo de una solución del sustrato comercial que contenía TMB, y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ L/pocillo de H_2SO_4 2M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia).

b. Técnica de ELISA competitivo indirecto

Las placas se tapizaron con 100 μL /pocillo de una solución de β -lactoglobulina bovina u ovomucoide (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tampón carbonato sódico 0,05 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 agua destilada en un lavador automático y se incubaron con 300 μL /pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v) en el caso de la β -lactoglobulina, y una solución de caseína al 1% (p/v) en el caso del ovomucoide, 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 3 veces con 300 μL /pocillo de agua destilada, y después, las placas se incubaron con 50 μL /pocillo de las diferentes soluciones estándar, o de las muestras problema diluidas en PBS, y 50 μL /pocillo de una dilución 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 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, y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL /pocillo de H_2SO_4 2M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA (Figura 1).

c. Técnica de ELISA tipo sándwich

Las placas se tapizaron con 100 μL /pocillo de una solución de anticuerpos anti- β -lactoglobulina bovina o anti-ovomucoide (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o anti-Cry1A(b) (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tampón carbonato sódico, 0,05 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 agua destilada y se incubaron con 300 μL /pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v) en el caso de la β -lactoglobulina y de la Cry1A(b), y una solución de caseína al 1% (p/v) en el caso del ovomucoide, en PBS a temperatura ambiente durante 2 horas, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con 300 μL /pocillo de agua destilada, y después, las placas se incubaron con 120 μL /pocillo de las diferentes soluciones estándar o de las muestras problema, a 37°C durante 1 hora.

Tras 5 lavados con PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBST), se añadieron 100 μL /pocillo de una dilución de anticuerpos específicos para cada proteína obtenidos en conejo y marcados con peroxidasa, que se mantuvieron a 37°C durante 1 hora, tras lo que la placa se lavó 5 veces con PBST. Por último, se añadieron 100 μL /pocillo de una solución de un sustrato comercial, y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL /pocillo de H_2SO_4 2M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA (Figura 2).

d. Preparación de estándares

Las soluciones de proteína para usar en las técnicas de ELISA se prepararon en PBS, determinando su concentración por espectrometría usando el coeficiente de extinción a 280nm de $E^{1\%} = 10,0$, $E^{1\%} = 6,0$ y $E^{1\%} = 5,0$, para la β -lactoglobulina bovina, el ovomucoide o la proteína Cry1A(b), respectivamente. Después, las soluciones de β -lactoglobulina bovina o Cry1A(b) se diluyeron en ovoalbúmina 0,5% (p/v), y la de ovomucoide en caseína 0,5% (p/v), todas en PBS con 0,05% de timerosal. De cada proteína se prepararon varias diluciones a una concentración 100 veces mayor a la usada en los ensayos, y se guardaron en alícuotas que se mantuvieron congeladas hasta su uso. En el momento del análisis, las soluciones de proteína se descongelaron y se diluyeron en PBS para su uso como estándares en las técnicas de ELISA.

e. Diseño de un estudio colaborativo para la evaluación de tests de ELISA

La metodología desarrollada para la preparación de los test de ELISA se transfirió a la empresa Zeu-Inmunotec (Zaragoza, España), la cual preparó dos prototipos de tests comerciales para la detección de β -lactoglobulina bovina (formato competitivo indirecto y sándwich) y dos para la detección de ovomucoide (formato competitivo indirecto y sándwich).

La evaluación de dichos tests se llevó a cabo por tres laboratorios: el grupo de Bioquímica de proteínas de la leche, de la Universidad de Zaragoza, que coordinó el estudio; la empresa Zeu-Inmunotec, y la Unidad de Calidad y Seguridad Alimentaria del Centro de Investigación y Tecnología Alimentaria de Aragón.

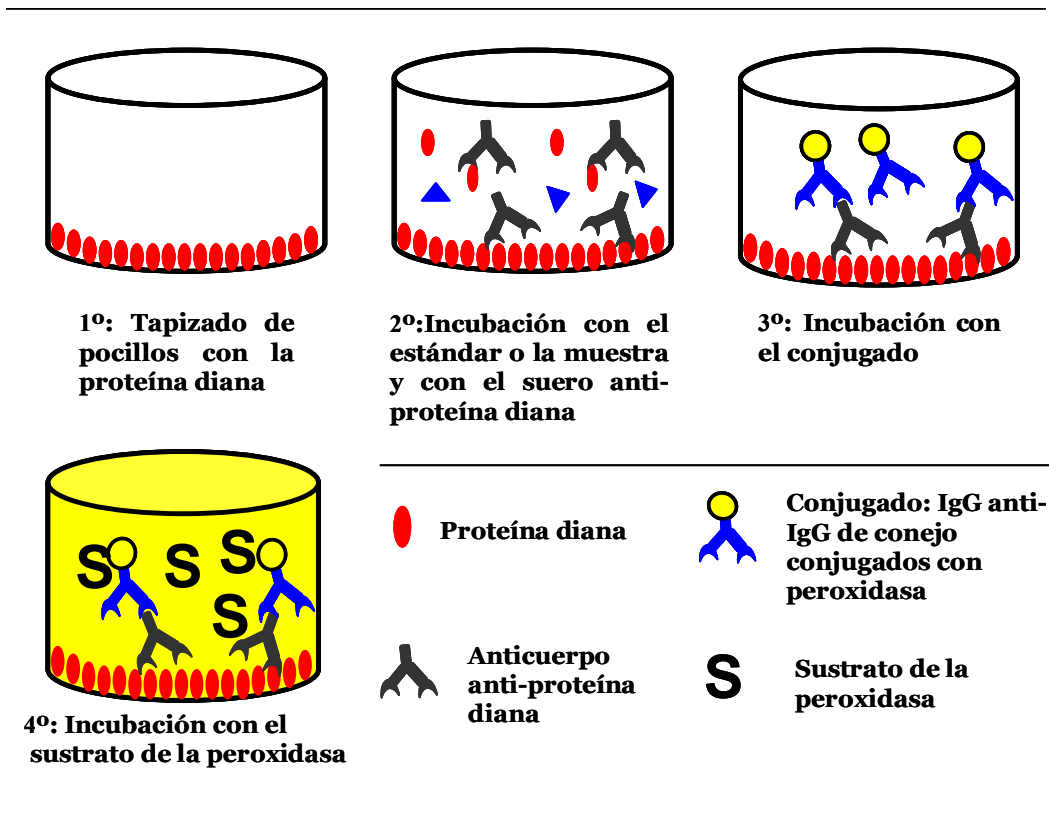


Figura 1: Esquema de la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto.

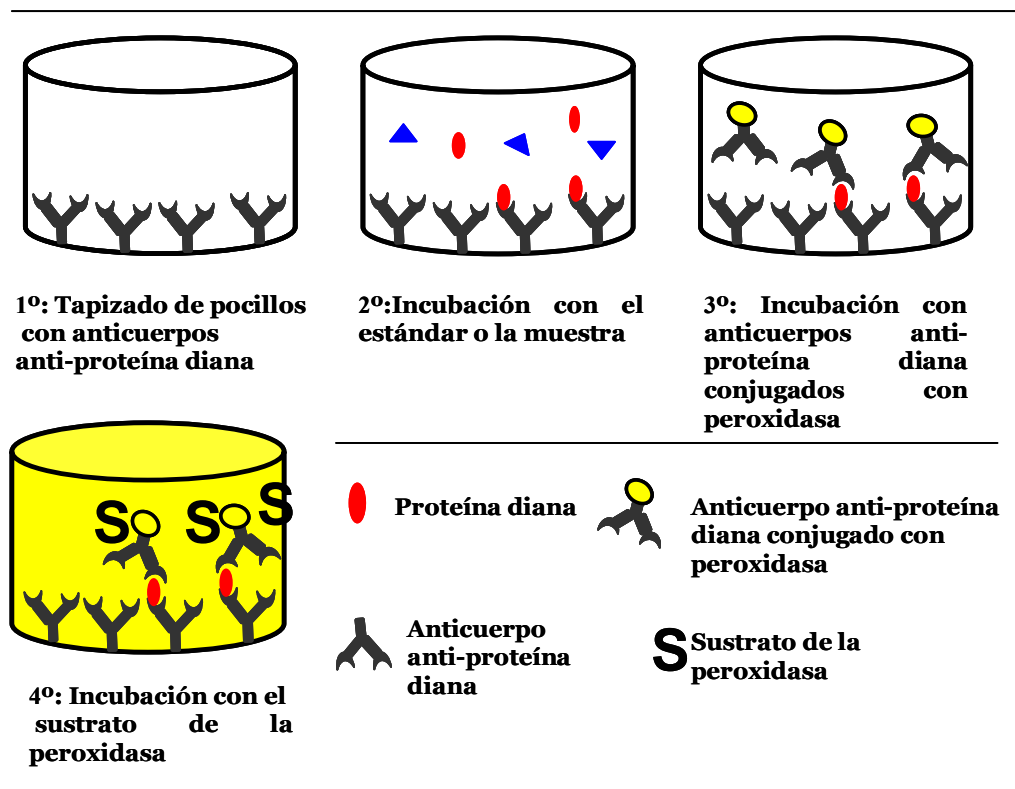


Figura 2: Esquema de la técnica de ELISA tipo sándwich.

En el estudio se analizaron alimentos modelo procesados (salchicha, pan y paté) que contenían diferentes cantidades de leche y de huevo en polvo. El coordinador suministró las muestras de alimentos, y Zeu-Inmunotec los cuatro kits (kits Proteon β -lactoglobulina competitivo y sándwich, y kits Proteon ovomucoide competitivo y sándwich) con sus instrucciones correspondientes. La extracción de las muestras se realizó como se indica en el apartado 2.14.a. Los datos de absorbancia de las muestras obtenidos en los tests por cada grupo se enviaron al coordinador para elaborar los resultados. La realización de los tests fue similar a la descrita en los apartados anteriores para cada uno de los formatos, con la excepción de los tiempos de incubación. En el formato tipo sándwich, todas las incubaciones se realizaron durante 30 minutos, y en el formato competitivo, durante 15 minutos.

III.2.11. INMUNOCROMATOGRAFÍA

En este trabajo se ha diseñado una técnica de inmunocromatografía para la detección de β -lactoglobulina, de ovomucoide y de la proteína Cry1A(b), tal y como se describe a continuación.

a. Tapizado de las microesferas con anticuerpos

Las microesferas de poliestireno de $0,288 \pm 0,005 \mu\text{m}$ de diámetro, carboxiladas y coloreadas se tapizaron con los anticuerpos específicos frente a la β -lactoglobulina, frente al ovomucoide o frente a la proteína Cry1A(b) aislados por inmunoadsorción. Para ello, 500 μL de microesferas (10%) se lavaron con 10 mL de tampón MES 10 mM, pH 6, y se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 x g, repitiéndose esta operación cinco veces. Posteriormente, el pellet obtenido se resuspendió en 5 mL del mismo tampón, sonicando la solución en un baño con hielo, y se le añadieron 50 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y 35 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS), para activar los grupos carboxilo de las microesferas. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, las microesferas se lavaron cinco veces con 10 mL de tampón MES 10 mM pH 7,5.

El pellet obtenido se resuspendió en 2,5 mL de tampón MES 10 mM, pH 7,5 y se añadieron 2,5 mL de los anticuerpos específicos (1 mg/mL) previamente dializados en el mismo tampón. La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y a continuación se

realizaron cinco lavados con 10 mL de tampón MES 10 mM pH 7,5, centrifugando tras cada lavado. Para estimar la cantidad de anticuerpos unidos a las esferas, se determinó la concentración de proteína mediante el método de BCA tras el primer lavado, y dicho valor se restó de la concentración inicial de proteína.

Para saturar los puntos de unión a proteínas que se encontraran libres en las microesferas, el pellet se resuspendió en 5 mL de una solución que contenía 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y etanolamina 30 mM disueltas en tampón MES 10 mM pH 7,5, y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras realizar tres lavados, el pellet se resuspendió en 5 mL de una solución de BSA al 0,1% en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,4 y se mantuvo a 4°C en agitación hasta su uso. Con el objeto de comprobar que los anticuerpos se habían unido a las microesferas, a 5 µL de esferas tapizadas o sin tapizar, diluidas ambas 1/10 en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,4, se les añadió 1 mL de IgG anti-IgG de conejo conjugados con FITC. Tras 30 minutos de incubación a 4°C en agitación, las esferas se lavaron 3 veces, se resuspendieron en 20 µL de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,4 y se observaron en un microscopio de fluorescencia (x 1.000 aumentos). Por otra parte, a 1 µL de las microesferas esferas tapizadas se les añadieron 50 µL de la proteína específica (1 mg/mL) o de agua destilada, y las soluciones se observaron al microscopio óptico (x 1.000 aumentos).

b. Preparación del soporte inmunocromatográfico

El soporte inmunocromatográfico estaba constituido por una membrana de nitrocelulosa HiFlow Plus HFB13502 de dimensiones 3 cm x 4 mm y de 5-10 µm de tamaño de poro, que se había secado previamente a 60°C durante 5 minutos. A una distancia de 1,2 cm de la base, se aplicaron manualmente en una fina línea los anticuerpos específicos frente a las distintas proteínas, β-lactoglobulina, ovomucoide o Cry1A(b) (1 mg/mL en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,4 que contenía un 3% de metanol), y a una distancia de 1,8 cm de la base, se aplicaron IgG anti-IgG de conejo obtenidas en cabra y disueltas en el mismo tampón. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Las membranas que contenían los anticuerpos anti-β-lactoglobulina, anti-ovomucoide o anti-proteína-Cry1A(b) se bloquearon probando diferentes concentraciones de varias proteínas, como ovoalbúmina, albúmina sérica bovina, caseína o IgG. En todos los casos, se colocaron en los extremos de las tiras de nitrocelulosa unas membranas adsorbentes de celulosa, Accuwick Ultra en el extremo inferior del soporte, y Absorbent Paper Type 197 en el superior,

y se sujetaron con cinta adhesiva alrededor. Las membranas se mantuvieron a temperatura ambiente, en un recipiente que contenía sílica gel.

c. Realización del análisis inmunocromatográfico

Para cada test, fue necesario optimizar el tampón en el que se diluyeron las microesferas tapizadas. Para ello, se ensayaron diluyentes que contenían diferente pH y concentración de NaCl, detergentes (SDS, Tween-20) y alcoholes (metanol, etanol), así como diferentes proporciones de microesferas y muestra. Para la realización del análisis cromatográfico, las microesferas tapizadas diluidas en el tampón correspondiente para cada proteína se mezclaron con la solución del extracto del alimento a analizar en un tubo de ensayo. A continuación, la tira reactiva se introdujo en el tubo, y se esperó 10 minutos hasta su observación visual. La aparición de una sola banda coloreada en el lugar de aplicación de las IgG anti-IgG de conejo indicaba la ausencia del analito en la muestra, mientras que la aparición de dos bandas coloreadas indicaba la presencia del analito en la muestra (Figura 3).

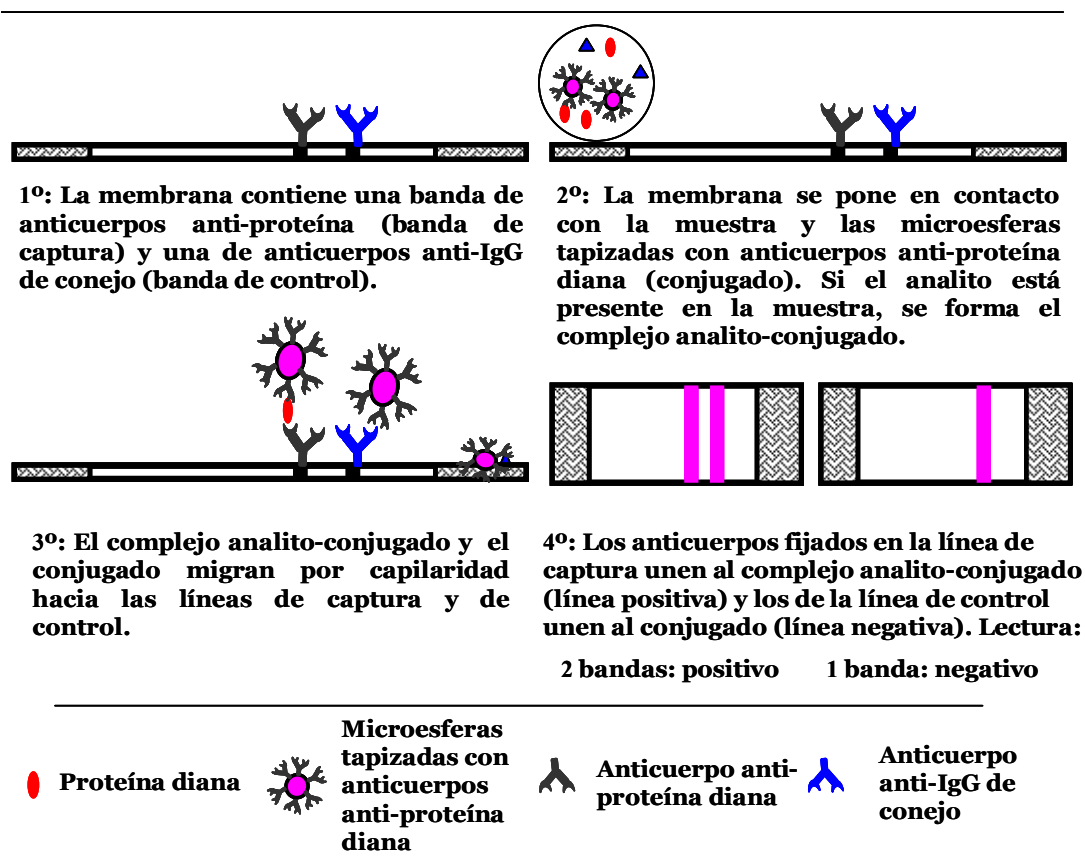


Figura 3: Esquema de la técnica de inmunocromatografía.

III.2.12. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Cry1A(b) DEL MAÍZ TRANSGÉNICO

Las hojas de maíz se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se cortaron en pequeñas porciones y se trituraron usando una picadora. Una porción de 200 g de hojas de maíz trituradas se mezcló con 1 L de tampón carbonato sódico 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 9,5, y la mezcla se agitó durante 2 horas. Entonces, la mezcla se filtró por lana de vidrio y el filtrado se centrífugo a 2.700 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró usando un cartucho de fibras huecas de punto de corte 1.000.000 para eliminar las partículas grandes, se concentró por ultrafiltración usando una membrana de 10.000 Pellicon2, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para aislar la proteína Cry1A(b) del extracto de hojas de maíz se preparó previamente un inmunoadsorbente que contenía los anticuerpos específicos anti-proteína Cry1A(b), previamente aislados, insolubilizados en Sepharose 4B, tal y como se ha indicado en la sección III.2.7. Posteriormente, se aplicó sobre el inmunoadsorbente un volumen de 25 mL del extracto concentrado de hojas de maíz transgénico, haciéndolo pasar a un flujo de aproximadamente 0,2 mL/min. La columna se lavó con tampón fosfato potásico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4 hasta que la absorbancia del excluido a 280 nm fue menor a 0,02. Después, los anticuerpos se eluyeron con un tampón glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,6 que contenía dioxano al 10%. Las fracciones eluidas fueron neutralizadas inmediatamente con volúmenes previamente calculados de tampón Tris 0,5 M, pH 8,0, que se depositaron en los tubos antes de recoger el eluido. La proteína eluida se dializó frente a SSF, se liofilizó y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Para conocer si la fracción purificada por inmunoadsorción correspondía con la proteína Cry1A(b), dicha fracción se sometió a una electroforesis, y las bandas obtenidas se recortaron del gel y se enviaron a la unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, para realizar un análisis de identificación de proteínas por huella peptídica por la técnica de MALDI-TOFF. Las proteínas de las bandas seleccionadas fueron reducidas, alquiladas y digeridas en el gel con tripsina como indican Sechi y Chait (1998). Los análisis para la identificación de proteínas se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, EEUU). El aparato operó en modo reflector positivo, con un voltaje de aceleración de 20.000 v. Las masas de los péptidos obtenidos se compararon con las masas de los péptidos teóricas indicadas en la base de datos NCBI nr para la proteína Cry1A(b), cuyo número de acceso es el

Gi|36244769 (6547598 secuencias; 2236320780 residuos) (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>).

Esta comparación se realizó con el motor de búsqueda MASCOT 2.1 (<http://www.matrixscience.com>), usando los siguientes parámetros:

- Carbamidometilcisteinas como modificación fija y oxidación de metioninas como modificación variable.
- Tolerancia de masa del péptido, 50 ppm.
- 1 punto de corte perdido para la tripsina.
- Tolerancia de masa de los fragmentos MS-MS de 0,3 Da.

Además, se determinó la reactividad cruzada que existe entre la proteína Cry1A(b) obtenida de *B. thuringiensis* y la obtenida de maíz transgénico utilizando una técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto. Para ello, una placa tapizada con la proteína procedente de *B. thuringiensis* se incubó con concentraciones crecientes de ambas proteínas. La reactividad cruzada entre estas dos proteínas se calculó mediante la ecuación:

$$RC (\%) = X_1 / X_2 \times 100$$

donde X_1 y X_2 corresponden a la concentración de proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis* y de maíz transgénico, respectivamente, a la que se obtiene el 50% de la absorbancia máxima.

III.2.13. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS EN PLANTA PILOTO

Se han preparado alimentos a base de maíz transgénico y no transgénico, y alimentos que contenían entre otros ingredientes leche y huevo en polvo. Los productos se han elaborado en la planta piloto de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza siguiendo los procedimientos habituales usados por los fabricantes en la industria alimentaria. Todos los alimentos elaborados fueron analizados por las técnicas inmunoquímicas previamente desarrolladas.

a. Productos elaborados con leche y huevo en polvo

Se han elaborado tres alimentos, pan, salchichas y paté, a los que se han añadido como ingredientes diferentes cantidades de leche y huevo en polvo, para obtener porcentajes de los mismos de 0,25 a 1%. Para obtener los porcentajes más bajos (0,005, 0,01, 0,05 y 0,1%), se mezcló la cantidad necesaria de muestra del 1% con la muestra del 0% de cada producto.

a.1. Salchichas

Las salchichas se elaboraron a partir de 3 kg de carne de cerdo, 3 kg de panceta de cerdo, 450 g de una mezcla comercial de especias de Anvisa (Arganda del Rey, Madrid, España), 900 g de almidón y 3 kg de hielo. Los ingredientes se mezclaron y se picaron y amasaron usando una cutter. A la mezcla amasada se le añadieron la leche y el huevo en polvo y se mezclaron usando un homogeneizador. La mezcla se embutió en tripas de celulosa (2,8 cm de diámetro), se introdujo en un horno y se cocinó hasta alcanzar una temperatura interna de 75°C. Las salchichas se envasaron al vacío y se calentaron a 90°C (temperatura interna) durante 1 minuto en un autoclave.

a.2. Pan

El pan se elaboró usando una máquina comercial (Deluxe: Bread and Dough Maker. Oster, EEUU). Para ello, una cantidad de 480 g de harina de trigo, 10 g de margarina, 20 g de azúcar, 5 g de sal, 8,8 g de levadura, 205 mL de agua, y la leche y el huevo en polvo se amasaron durante 30 minutos y se dejaron 1 hora a temperatura ambiente para la fermentación de la masa. Entonces, la masa se horneó a 95°C (temperatura interna) durante 40 minutos.

a.3. Paté

El paté se preparó con 1,6 kg de hígado de cerdo, 2,5 kg de grasa de cerdo, 100 g de sal, 11 g de pimienta, 2,8 g de azúcar, 166 g de harina de maíz, 166 g de margarina y 840 mL de

agua. La grasa de cerdo se picó, se calentó en agua a 85°C durante 30 minutos agitando de forma continua y se retiró del agua. Entonces, la grasa de cerdo, el hígado de cerdo y el resto de los ingredientes se mezclaron hasta obtener una pasta homogénea. A la pasta se le añadieron la leche y el huevo en polvo, y se mezclaron con una batidora. Una porción de 250 g de la mezcla se introdujo en recipientes de vidrio y se calentó a 120°C (temperatura interna) en un autoclave durante 1 hora.

b. Productos elaborados con maíz

b.1. Maíz nixtamalizado

El proceso de nixtamalización se llevó a cabo calentando en agua (100 mL) los granos enteros de maíz transgénico (34 g) y óxido de calcio (50 mg) a 85°C durante 60 minutos o a 100°C durante 5 minutos, dejando en ambos casos los granos de maíz en remojo durante 15 horas a temperatura ambiente. Después de descartar el líquido de cocción (nejayote), el grano cocido se lavó dos veces con agua y se secó a 40°C en una estufa.

b.2. Obtención de la harina de maíz

Los granos crudos y cocidos de maíz transgénico y no transgénico se molieron en un molino de martillos y se seleccionaron las partículas de harina que pasaron por un tamiz de 300 µm.

b.3. Tortillas de maíz

Para preparar las tortillas de maíz, se mezclaron 300 g de harina de maíz crudo y 160 mL de agua, y la mezcla se amasó hasta obtener una masa no pegajosa. Cada porción de 20,0 ± 0,1 g se colocó en un pocillo y, mediante una prensa manual se obtuvieron discos de 2,2 ± 0,1 mm de grosor y 11,0 ± 0,2 cm de diámetro.

Las tortillas a la plancha se prepararon calentando por ambas caras los discos de masa en una plancha a 200 ± 10°C durante diferentes tiempos, y las fritas por inmersión de los discos en aceite de girasol a 190 ± 10°C durante diferentes tiempos.

b.4. Farinetas

Las farinetas, conocidas también como polenta, porridge o gachas, se prepararon mezclando 100 g de harina de maíz crudo y 300 mL de agua. La mezcla se calentó en un hornillo mientras se agitaba manualmente con una espátula y se registraba de forma continua la temperatura de la mezcla con una sonda.

III.2.14. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

a. Extracción de proteínas en productos comerciales y en alimentos elaborados con leche y huevo en polvo

Para realizar la extracción de las proteínas presentes en los alimentos modelo, y en diferentes productos comerciales, una cantidad de 100 g se trituró previamente usando una picadora. Posteriormente, a 3 g de la muestra de alimento triturado se le añadieron 30 mL de SSF y la mezcla se mantuvo en agitación durante 15 minutos a 60°C. El extracto se clarificó mediante centrifugación a 3.000 x g durante 15 minutos y se guardó a -20°C hasta su análisis.

b. Extracción de proteínas en productos de maíz

A $4,0 \pm 0,1$ g de las muestras de tortillas fritas o a la plancha o de maíz nixtamalizado triturado se le añadieron 20 mL de tampón carbonato sódico 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 9,6, y a 10,0 g de las muestras de farinetas, 10 mL del mismo tampón, y se mantuvo en agitación durante 1 hora a 65°C. El extracto se clarificó mediante centrifugación a 13.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se neutralizó hasta un pH de 7,4, y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

III.2.15. TRATAMIENTO TÉRMICO DE LAS MUESTRAS

El tratamiento térmico de las muestras se realizó en tubos capilares de vidrio (1,5-1,6 mm de diámetro externo y 1,1-1,2 mm de diámetro interno) en los que se introdujo un volumen de 20 μ L. Tras sellar los extremos con un microsoplete, los capilares se introdujeron en un baño termostático con control automático de temperatura y se trataron a diferentes temperaturas.

Los capilares, preparados por duplicado, se extrajeron del baño y se enfriaron inmediatamente por inmersión en un baño de agua con hielo. Tras realizar las diluciones adecuadas, las muestras se analizaron por las técnicas de ELISA descritas anteriormente.

III.2.16. ANÁLISIS CINÉTICO Y TERMODINÁMICO

Se realizó un análisis cinético y se determinaron los parámetros cinéticos y termodinámicos de la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) obtenidos tras el tratamiento térmico en tubos capilares del extracto de las hojas de maíz.

a. Cálculo de los valores *D* y *Z*

Los valores *D* (tiempo requerido para lograr una desnaturalización del 90% a una temperatura determinada) se calcularon por análisis de regresión a partir de las rectas obtenidas al representar el logaritmo de la proteína inmunorreactiva, expresada como el porcentaje de la concentración inicial de proteína, frente al tiempo. Los valores *D* corresponden a la inversa de la pendiente de estas rectas.

El valor *Z* (grados necesarios para reducir el valor *D* en un ciclo logarítmico) se calculó por análisis de regresión a partir de la recta obtenida al representar el logaritmo del valor *D* frente a la temperatura. El valor *Z* corresponde al inverso de la pendiente de esa recta.

b. Análisis cinético y termodinámico

Orden de reacción. El proceso de desnaturalización de la proteína Cry1A(b) puede describirse con la ecuación general de velocidad de reacción

$$-dc/dt = k c^n \quad (1)$$

donde $-dc/dt$ representa la velocidad de reacción de la desnaturalización de la proteína, k la constante de desnaturalización, c la concentración de proteína a cada tiempo, y n el orden de reacción.

Para $n = 1$:

$$-dc/dt = kc ; -dc/c = k dt$$

e integrando se obtiene:

$$\ln (c_0/c_t) = kt \quad (2)$$

donde c_0 es la concentración inicial de proteína (para tiempo $t = 0$) y c_t la concentración de la proteína desnaturalizada a cada tiempo analizado. Cuando la desnaturalización sigue una cinética de primer orden, la representación gráfica de la ecuación 2 da lugar a una línea recta y el valor b de la intersección con la ordenada (a tiempo $t = 0$) está próximo a cero. Por análisis de regresión, el valor de la constante k se obtiene de la pendiente de las líneas.

Para $n \neq 1$, cuando la ecuación general 1 se integra, se obtiene:

$$(c_t/c_0)^{1-n} = 1 + (n-1) kt \quad (3)$$

Para reacciones que no son de primer orden la representación de los resultados de acuerdo a la ecuación 3 da lugar a líneas rectas, y de su pendiente se obtiene la constante k de velocidad.

La intersección de la ordenada b (a tiempo $t=0$) para una reacción que no es de primer orden debería estar próxima a 1, si el proceso sigue el orden de reacción estimado.

Análisis cinético. La temperatura y la constante de desnaturalización están relacionadas de acuerdo a la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{-E_A/R.T}$$

donde k representa la constante de velocidad para el proceso de desnaturalización, A la constante de Arrhenius, E_A la energía de activación aparente, R la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta. Tomando logaritmos neperianos, se obtiene:

$$\ln k = \ln A - (E_A/R) (1/T) \quad (4)$$

Cuando el logaritmo natural de la constante de desnaturalización frente al inverso de la temperatura absoluta se representa de acuerdo a la expresión (4), se obtiene una recta a partir de cuya pendiente es posible hallar el valor de la energía de activación E_A . Igualmente, se puede obtener la constante de Arrhenius de la ordenada en el origen $\ln A$. Conocidos estos dos valores, se pueden calcular los parámetros termodinámicos de la variación de la entalpía ($\Delta H^\#$), de la entropía ($\Delta S^\#$), y de la energía libre de activación ($\Delta G^\#$), aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\Delta H^\# = E_A - RT$$

$$\Delta S^\# = R[\ln A - \ln (K_B/h_p) - \ln T]$$

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\#$$

donde K_B es la constante de Boltzmann y h_p la constante de Planck.

III.2.17. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PROTEOLISIS CON PEPSINA PORCINA EN LA PROTEÍNA Cry1A(b) DEL MAÍZ TRANSGÉNICO

En este trabajo, se ha estudiado el efecto que tiene la hidrólisis con pepsina porcina sobre la proteína Cry1A(b) extraída del maíz transgénico. La proteína se disolvió en tampón HCl 84 mM, pH 2,0, a una concentración de 10 mg/mL. Para hidrolizar la proteína se utilizó pepsina porcina a una relación enzima/sustrato de 5% (p/p) y a una temperatura de 37°C. Se recogieron alícuotas a diferentes tiempos de incubación (0, 30, 120, y 240 minutos) deteniéndose la reacción de tres maneras diferentes. Las muestras que iban a ser analizadas por western-blotting se mezclaron con tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 2,5%, pH 8,0 y se hirvieron inmediatamente durante 5 minutos. Las muestras que iban a ser analizadas por

ELISA se diluyeron en PBS, y las que iban a ser analizadas por espectrometría de masas en tampón carbonato amónico 50 mM, pH 9,0.

III.2.18. DETERMINACIÓN DE MASAS MOLECULARES POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para el análisis por espectrometría de masas, se depositó 1 μ L de muestra en una placa portamuestras de MALDI-TOF, se dejó secar al aire y se depositaron 0,5 μ L de matriz, compuesta por ácido sinapínico (10 mgr/mL) en acetonitrilo 30%, TFA 0,3%, y se dejó secar de nuevo al aire.

La determinación de la distribución de los pesos moleculares de las biomoléculas presentes en la muestra se realizó utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF, Voyager STR de Applied Biosystems, midiendo en modo lineal positivo, con una voltaje aceleración de 20.000 v, y optimizando el tiempo de retardo y el gradiente de potencial según el rango de masa en el que se midió en cada caso.

Los espectros fueron calibrados externamente con calmix 3 (1 picomol de insulina, tioredoxina y apomioglobina) para el rango de masas bajo y con BSA (1 picomol) para el rango de masas alto. Se obtuvieron las masas medias de los péptidos + 1 Da, en el caso de que la carga fuera +1 (+H), o las masas medias de los péptidos + 2 Da partido por 2, en el caso de que la carga sea +2 (2+H).

IV. Resultados y Discusión

IV. RESULTADOS

IV.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTISUEROS

Los antisueros anti- β -lactoglobulina bovina, anti-ovomucoide y anti-proteína Cry1A(b) se obtuvieron por inoculación en conejos de β -lactoglobulina bovina u ovomucoide comerciales (previamente purificadas por filtración en Sephadex G-100), o de proteína Cry1A(b) obtenida de *B. thuringiensis*. La inmunorreactividad y especificidad de los antisueros obtenidos se comprobaron por las técnicas de inmunodifusión doble, inmunodotting e inmunoelectroforesis. En los tres casos, los antisueros obtenidos contenían anticuerpos frente a la proteína inoculada, y no se observaron reacciones cruzadas con otras proteínas de la leche, del huevo o del maíz, respectivamente. Como ejemplo, en las Figuras 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de los antisueros obtenidos frente a la β -lactoglobulina bovina por las técnicas de inmunodifusión doble e inmunodotting, respectivamente. La reacción positiva observada con la β -lactoglobulina y el lactosuero, y la ausencia de reacción con la α -lactalbúmina y la albúmina sérica bovinas indican que el antisuero obtenido contiene anticuerpos específicos frente a la β -lactoglobulina bovina pero no frente a las otras proteínas mayoritarias del lactosuero.

En la técnica de inmunoelectroforesis (Figura 6), la presencia de un arco único de precipitación cuando se enfrenta el lactosuero bovino con el antisuero anti- β -lactoglobulina, que tiene además la misma posición que el arco de precipitación correspondiente a la proteína pura indican que el antisuero es específico para dicha proteína.

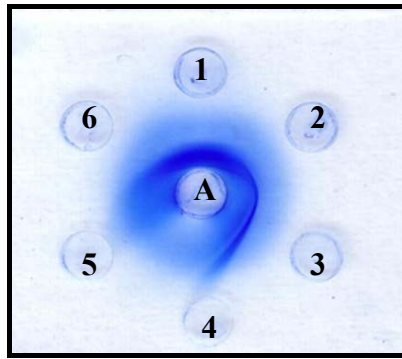


Figura 4: Inmunodifusión doble en gel de agarosa de:

- | | |
|--|--|
| 1: Lactosuero bovino | 4: α -Lactalbúmina bovina (1 mg/mL) |
| 2: β -Lactoglobulina bovina (0,5 mg/mL) | 5: α -Lactalbúmina bovina (0,5 mg/mL) |
| 3: β -Lactoglobulina bovina (0,25 mg/mL) | 6: Albúmina sérica bovina (1 mg/mL) |
| A: Antisuero anti- β -lactoglobulina bovina. | |

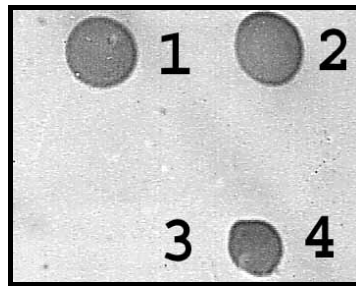


Figura 5: Inmunodotting obtenido utilizando un antisuero anti β -lactoglobulina bovina de:

- | | |
|---|---|
| 1: β -Lactoglobulina bovina (2 mg/mL) | 2: β -Lactoglobulina bovina (1 mg/mL) |
| 3: α -Lactalbúmina bovina (2 mg/mL) | 4: Lactosuero bovino |

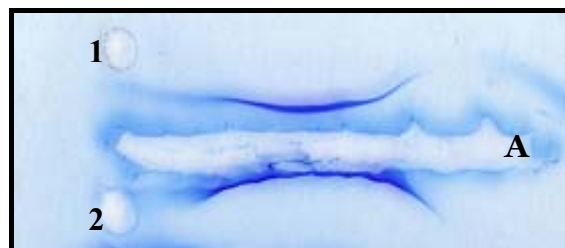


Figura 6: Inmunoelectroforesis en gel de agarosa de:

- | | |
|---|----------------------|
| 1: β -Lactoglobulina bovina (1 mg/mL) | 2: Lactosuero bovino |
| A: Antisuero anti- β -lactoglobulina bovina | |

La determinación del título de los antisueros se realizó mediante una técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto. El título de un antisuero se define como el inverso de la dilución correspondiente al 50% de la máxima absorbancia obtenida. Esta titulación es el paso previo al desarrollo de una técnica de ELISA tipo competitivo indirecto. En la Figura 7 se muestra un ejemplo de una curva de titulación obtenida con un antisuero anti- β -lactoglobulina bovina, cuyo título fue de 1/8.000. Los títulos obtenidos para los antisueros anti-ovomucoide y anti-Cry1A(b) fueron de 1/6.000 y 1/10.000, respectivamente.

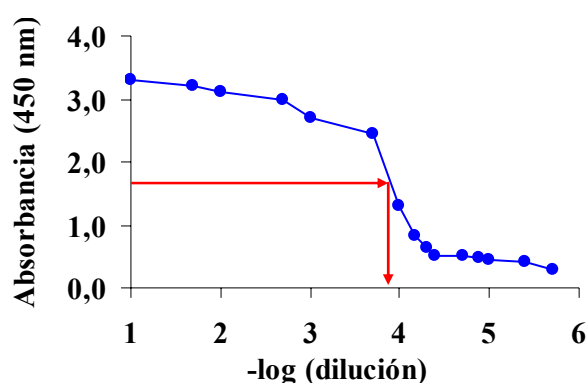


Figura 7: Curva de titulación de un antisuero frente a la β -lactoglobulina bovina.

IV.2. AISLAMIENTO Y CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CON PEROXIDASA

Los anticuerpos anti- β -lactoglobulina, anti-ovomucoide y anti-proteína Cry1A(b) presentes en los antisueros obtenidos se aislaron por inmunoadsorción, utilizando columnas que contenían las proteínas correspondientes insolubilizadas en Sepharose 4B. En la Figura 8 se muestra el perfil de una cromatografía del antisuero anti- β -lactoglobulina utilizando su correspondiente inmunoadsorbente.

El perfil presenta dos picos, el primer pico, eluido con SSF, contiene todos los componentes del antisuero que no interaccionan con el inmunoadsorbente, y el segundo, eluido con un tampón de pH 2,8, contiene los anticuerpos que interaccionan con la β -lactoglobulina. La inmunodifusión doble de las fracciones correspondientes al primer pico indicó la ausencia de anticuerpos anti- β -lactoglobulina, mientras que las fracciones

correspondientes al segundo pico dieron un resultado positivo. Las fracciones 27 a 31 del eluido se recogieron conjuntamente, se concentraron por ultrafiltración y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Los anticuerpos obtenidos por inmunoadsorción se conjugaron con peroxidasa por el método del periodato. Para determinar la actividad del conjugado, éste se incubó con el sustrato y se midió la absorbancia a 450 nm. Como puede observarse en la Figura 9, para los anticuerpos anti- β -lactoglobulina conjugados con peroxidasa, la absorbancia aumenta con el tiempo de incubación, hasta llegar a 2,4 en 15 minutos. Resultados similares se obtuvieron con los otros conjugados obtenidos, por lo que todos ellos se consideraron adecuados para ser usados en el desarrollo de técnicas de ELISA de tipo sándwich (Catty y Raykundalia, 1989).

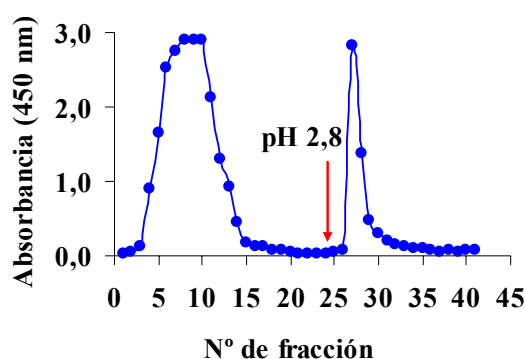


Figura 8: Cromatografía del antisuero anti- β -lactoglobulina utilizando una columna que contenía β -lactoglobulina insolubilizada en Sepharose 4B. Las fracciones recogidas fueron de 2 mL. La flecha indica la aplicación del tampón de pH 2,8.

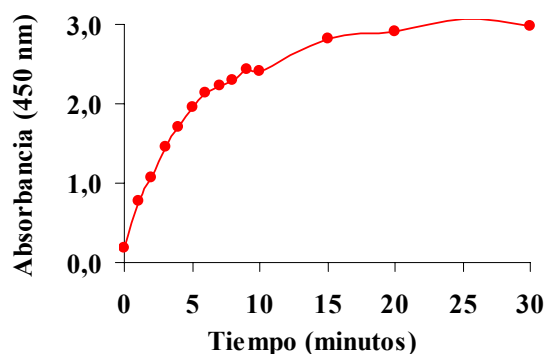


Figura 9: Determinación de la actividad de los anticuerpos anti- β -lactoglobulina conjugados con peroxidasa.

IV.3. ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS DEL EFECTO DEL PROCESADO EN LA β -LACTOGLOBULINA BOVINA Y EL OVOMUCOIDE.

En este trabajo se ha estudiado el efecto que el tratamiento térmico tiene sobre la desnaturalización de las proteínas alergénicas β -lactoglobulina y ovomucoide, presentes en la leche y en el huevo, respectivamente. El grado de desnaturalización de ambas proteínas se ha determinado midiendo la pérdida de inmunorreactividad con sus anticuerpos específicos utilizando dos formatos de la técnica de ELISA, uno de tipo sándwich y otro de tipo competitivo indirecto, previamente desarrollados. Para determinar el efecto que distintos tipos de procesado tienen sobre la β -lactoglobulina y el ovomucoide, se han elaborado tres alimentos modelo que contenían como ingrediente leche y huevo, entre otros, y la cantidad de proteína inmunorreactiva se ha cuantificado utilizando también ambos formatos. Además, utilizando estos alimentos modelo procesados se ha realizado un estudio colaborativo para evaluar y comparar las técnicas de ELISA en placa desarrolladas para la detección de β -lactoglobulina y ovomucoide. Estos alimentos han sido analizados también por una técnica cualitativa rápida de inmunocromatografía desarrollada para detectar la presencia de β -lactoglobulina y ovomucoide.

Por otra parte, con el objeto de comprobar si se cumple la normativa vigente de etiquetado de alérgenos, se han analizado diversos alimentos comerciales en cuya etiqueta se indicaba o no la presencia de leche, huevo o sus derivados como ingredientes, utilizando ambas técnicas de ELISA.

IV.3.1. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE ELISA EN PLACA PARA LA DETERMINACIÓN DE β -LACTOGLOBULINA

Las curvas de calibración obtenidas para la determinación de β -lactoglobulina utilizando las técnicas de ELISA de tipo competitivo indirecto y sándwich se muestran en las Figuras 10a y b, respectivamente. En ambas gráficas se representa la absorbancia a 450 nm de los estándares de β -lactoglobulina en PBS frente al logaritmo de la concentración de proteína. La recta obtenida fue lineal en un rango de concentraciones entre 15 ng/mL y 50 μ g/mL ($r^2 \geq 0,99$), para el formato competitivo indirecto, y entre 5 ng/mL y 50 ng/mL ($r^2 \geq 0,98$), para el formato de sándwich. El límite de detección, calculado como el valor medio de la

concentración de ocho réplicas del blanco (PBS) más tres veces la desviación estándar, fue de 12 ng/mL y 2 ng/mL, respectivamente.

La concentración de β -lactoglobulina en las muestras analizadas se determinó por intrapolación de los valores de la absorbancia en las curvas de calibración obtenidas para cada formato.

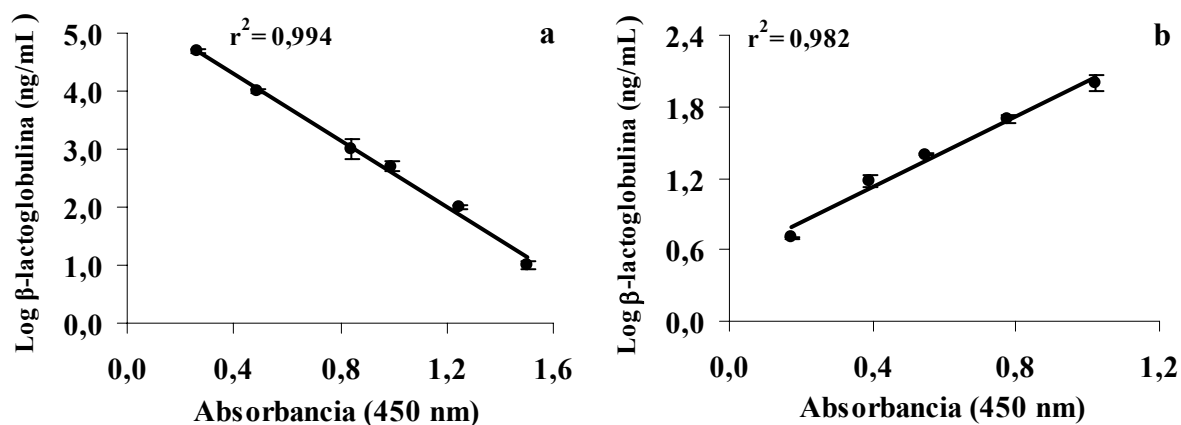


Figura 10: Curvas de calibración obtenidas para la determinación de β -lactoglobulina mediante las técnicas de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b). Los estándares contenían β -lactoglobulina pura en PBS.

IV.3.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA DESNATURALIZACIÓN DE LA β -LACTOGLOBULINA

En las Figuras 11a y b se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la β -lactoglobulina tratada en PBS y en leche a 80°C durante diferentes tiempos, y en las Figuras 11c y d los obtenidos al tratar la proteína a varias temperaturas durante 10 minutos. Las gráficas muestran los resultados de tres experimentos independientes en los que las muestras se analizaron por triplicado.

Utilizando el formato de sándwich, la cantidad de proteína inmunorreactiva calentada a 80°C en PBS o en leche disminuyó de forma rápida en los primeros cuatro minutos de tratamiento a alrededor del 40% y 30% del valor inicial, respectivamente. Después, la pérdida de inmunorreactividad fue más lenta, hasta alcanzar un valor del 25% tras 10 minutos de calentamiento en ambos medios, que se mantuvo estable durante los 60 minutos posteriores

de tratamiento (Figura 11b). Los tratamientos llevados a cabo a diferentes temperaturas durante 10 minutos mostraron que la cantidad de β -lactoglobulina inmunorreactiva disminuyó al 50-60% del valor inicial a 70°C en ambos medios. A temperaturas mayores, la inmunorreactividad disminuyó de forma más lenta, manteniéndose alrededor de un 20% de su valor inicial después de 10 minutos de tratamiento a temperaturas de 85, 90 y 95°C (Figura 11d).

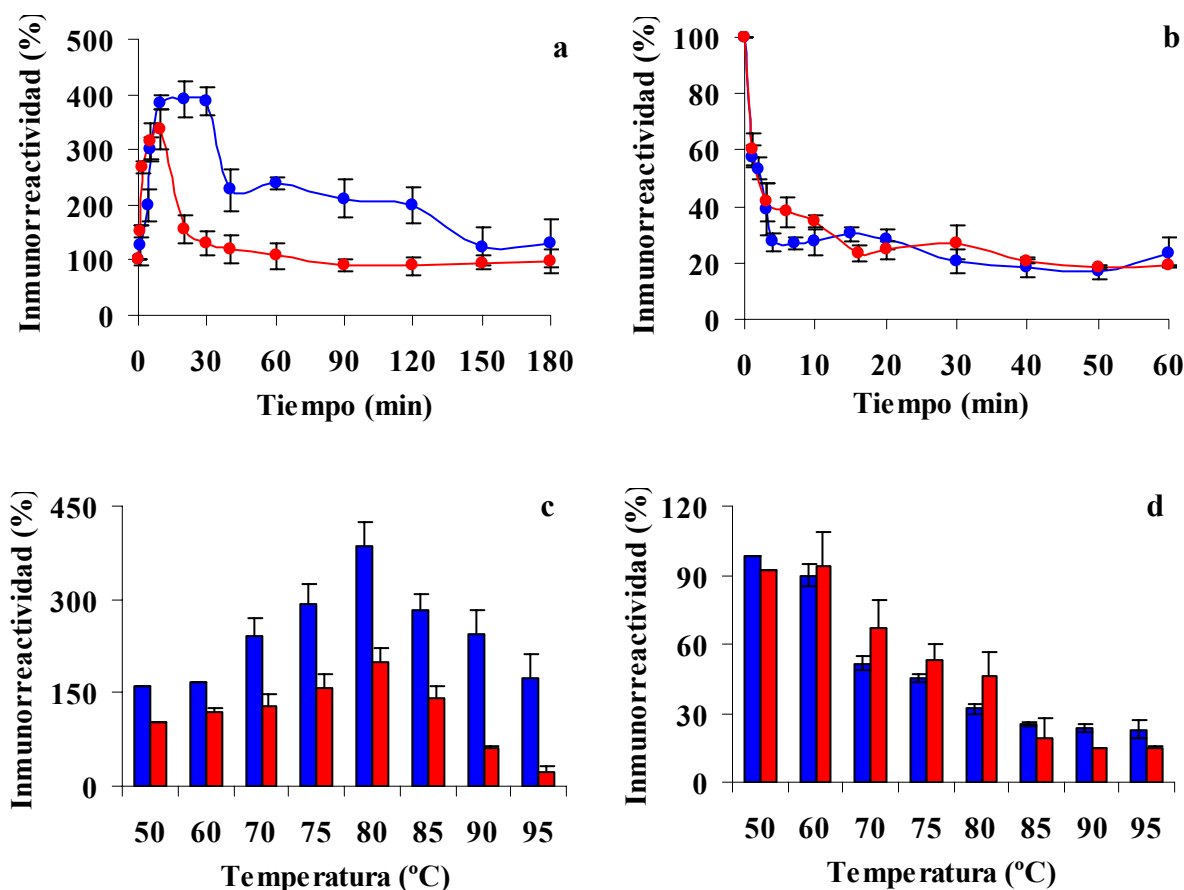


Figura 11: Efecto del tratamiento térmico a 80°C a lo largo del tiempo (a y b) o a varias temperaturas durante 10 minutos (c y d) en la inmunorreactividad de la β -lactoglobulina en leche (●) y en PBS (●; 200 μ g/mL), determinada mediante las técnicas de ELISA de tipo competitivo indirecto (a y c) o sándwich (b y d). Los valores de inmunorreactividad están expresados como porcentaje de la proteína inicial (100%).

Por el contrario, utilizando el formato competitivo indirecto, la cantidad medida de proteína inmunorreactiva calentada en tampón a 80°C aumentó hasta un 380% del valor inicial durante los primeros 20 minutos de tratamiento. Después, la inmunorreactividad se mantuvo estable, y empezó a disminuir a los 40 minutos de tratamiento, alcanzando un valor

del 200% a las 2 horas. (Figura 11a). De igual modo, la inmunorreactividad de la proteína calentada en leche también aumentó con el tiempo, aunque de forma menos pronunciada que en el caso de la tratada en PBS, posiblemente debido a las interacciones con otras proteínas de la leche (Figura 11a). Dicha inmunorreactividad alcanzó un 300% del valor inicial tras 5 minutos a 80°C, y disminuyó rápidamente alcanzando un valor del 120% a las 2 horas de tratamiento. Los tratamientos llevados a cabo a diferentes temperaturas durante 10 minutos mostraron que la inmunorreactividad de la β -lactoglobulina tratada en tampón y en leche aumentó a temperaturas superiores a 70°C, alcanzando un máximo a los 80°C, en el que la cantidad de proteína inmunorreactiva fue del 380% y 200% del valor inicial, respectivamente. A temperaturas superiores, la cantidad de proteína inmunorreactiva disminuyó, manteniéndose un 160% y 20% de su valor inicial para cada medio de tratamiento, respectivamente, tras un tratamiento a 95°C (Figura 11c).

IV.3.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL PROCESADO DE LOS ALIMENTOS SOBRE LA DESNATURALIZACIÓN DE LA β -LACTOGLOBULINA

Para estudiar el efecto que el procesado tiene sobre la β -lactoglobulina bovina se han elaborado tres alimentos modelo: salchicha (pasterizada), pan (horneado) y paté (esterilizado). Para cada alimento se analizaron muestras que contenían concentraciones de leche en polvo entre 0,01 y 1%. Todas las muestras se analizaron por triplicado en al menos dos experimentos independientes utilizando los dos formatos de ELISA.

La homogeneidad de las muestras de alimentos se comprobó analizando cinco muestras de cada alimento y concentración de leche en polvo por duplicado. El coeficiente de variación fue en todos los casos menor del 20%, por lo que este valor se consideró aceptable para el propósito de este estudio.

Para determinar el efecto matriz y evaluar la especificidad de los anticuerpos, se analizaron diferentes ingredientes básicos que no contenían leche o sus derivados (Tabla 5). Todos los ingredientes dieron unos valores de absorbancia ligeramente menores a los del blanco (PBS) cuando se analizaron con el formato competitivo, y ligeramente mayores a los del blanco cuando se analizaron con el formato de sándwich, indicando la presencia de interferencias. Para evitar estas interferencias, el valor medio de la concentración de todos los ingredientes más tres veces la desviación estándar se consideró como el punto de corte o concentración límite de β -lactoglobulina por encima de la cual una muestra de alimento se ha considerado positiva para la adición de leche en este estudio. Para la técnica de ELISA competitivo indirecto, este valor fue de 0,050 μ g de β -lactoglobulina/mL de extracto, y para

la técnica de ELISA tipo sándwich de 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Debido a que las muestras se extrajeron añadiendo 10 mL de tampón por gramo de alimento, los puntos de corte se han expresado como 0,50 y 0,05 μg de β -lactoglobulina/g de alimento, respectivamente. Asimismo, los resultados obtenidos para los alimentos modelo analizados se han expresado en este trabajo en las mismas unidades.

La concentración de β -lactoglobulina en la leche en polvo utilizada para la elaboración de los alimentos modelo fue de 28,5 y 114,1 mg/g, para el formato competitivo indirecto y el sándwich, respectivamente.

La concentración de β -lactoglobulina determinada en el análisis de los alimentos modelo utilizando ambos formatos se muestra en las Figuras 12 a y b. Para los tres alimentos modelo, las muestras que no contenían leche en polvo dieron concentraciones de β -lactoglobulina por debajo del punto de corte establecido para cada formato y, por lo tanto, un resultado negativo.

Las muestras de salchicha, pan y paté fueron positivas a porcentajes de leche en polvo añadida de 0,01, 0,05 y 0,1% (Figura 12b), respectivamente, cuando se analizaron con el formato tipo sándwich, mientras que hicieron falta porcentajes más altos, de 0,05, 0,25 y 0,5% (Figura 12a), respectivamente, para obtener un resultado positivo cuando se analizaron con el formato competitivo. Las muestras con menores porcentajes de leche en polvo que las indicadas anteriormente dieron un resultado falso negativo, y con mayores porcentajes dieron un resultado positivo, y la concentración de β -lactoglobulina inmunorreactiva se incrementó gradualmente con el porcentaje añadido.

Tabla 5: Reactividad cruzada de diversos ingredientes básicos analizados por los formatos de ELISA tipo competitivo indirecto y sándwich para la determinación de β -lactoglobulina. Los valores están expresados en μg de β -lactoglobulina/g de alimento.

	Competitivo indirecto	Sándwich
Ovoalbúmina	0,19	0,036
Lisozima	0,40	0,040
Albúmina sérica bovina	0,37	0,031
Extracto de carne	0,41	0,040
Gelatina de pescado	0,30	0,032
Proteínas solubles de trigo	0,29	0,030
Harina de trigo	0,10	0,038
Harina de maíz	0,17	0,034
Harina de arroz	0,16	0,032
Aceite de oliva	0,34	0,039
Aislado de proteínas de soja	0,17	0,037
Proteínas de guisante	0,21	0,037

Por otro lado, como puede observarse, el porcentaje de leche en polvo requerido para que apareciera un resultado positivo dependía de la intensidad del tratamiento térmico aplicado, siendo éste porcentaje mayor en el caso del paté (esterilizado), seguido del pan (horneado) y de la salchicha (pasterizada). Las concentraciones de β -lactoglobulina obtenidas en los alimentos modelo fueron mucho menores que las concentraciones estimadas a partir de la leche en polvo añadida como ingrediente para cada uno de los formatos, y sobre todo en los productos que recibieron un mayor tratamiento térmico. Así, se han estimado recuperaciones de entre el 0,5 y el 5%, correspondiendo los porcentajes mayores a las muestras de salchicha, y los menores a las de paté. Además, es remarcable que la concentración de β -lactoglobulina estimada en las muestras positivas que tenían el mismo porcentaje de leche en polvo fue mayor al utilizar el formato competitivo que el sándwich.

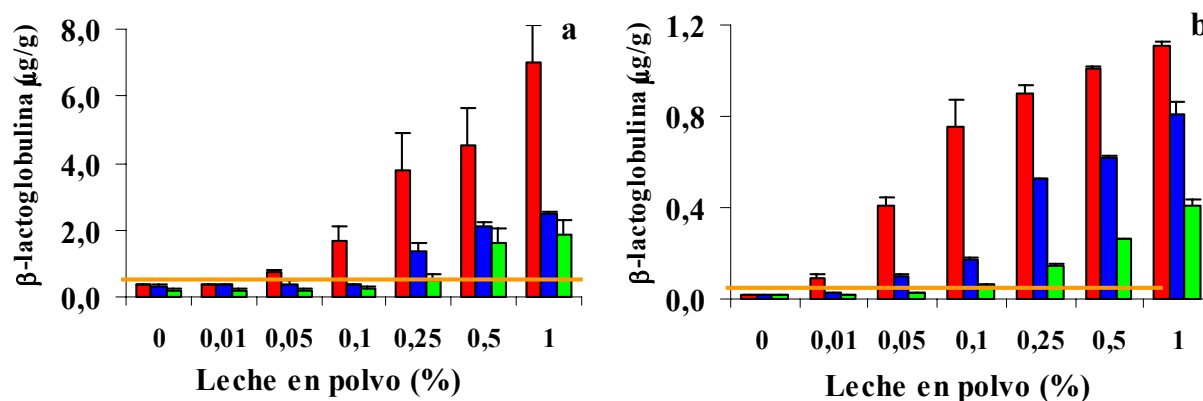


Figura 12. Concentración de β -lactoglobulina inmunorreactiva en alimentos modelo procesados (salchicha, ●; pan, ●; paté, ●) elaborados con diferentes porcentajes de leche desnatada en polvo analizados por el formato de ELISA competitivo (a) y sándwich (b). Los valores están expresados en μg de β -lactoglobulina/g de alimento. La línea horizontal indica el punto de corte de concentración establecido para cada formato, por encima del cual una muestra se consideró como positiva para la adición de leche.

IV.3.4. ESTUDIO COLABORATIVO PARA LA EVALUACIÓN DE DOS PROTOTIPOS DE TESTS COMERCIALES DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE β -LACTOGLOBULINA EN ALIMENTOS MODELO PROCESADOS

La metodología desarrollada en este trabajo se transfirió a la empresa Zeu-Inmunotec, la cual preparó dos prototipos de tests de ELISA comerciales (competitivo indirecto y sándwich) para la determinación de β -lactoglobulina bovina. En el estudio colaborativo se

analizaron los tres alimentos modelo que se habían elaborado con leche en polvo. La evaluación de los tests se llevó a cabo por tres laboratorios, y nuestro grupo actuó como coordinador.

Los puntos de corte de concentración para considerar una muestra positiva para adición de leche, calculados como se ha indicado en la sección anterior, así como los estándares usados en las curvas de calibración, se muestran en la Tabla 6. Para el formato competitivo, se obtuvo una relación lineal al representar la absorbancia de los estándares frente al logaritmo de la concentración de β -lactoglobulina (Figura 13a), y para el formato tipo sándwich, al representar la absorbancia frente a la concentración de proteína (Figura 13b).

Tabla 6: Concentración de los estándares y puntos de corte establecidos para los prototipos de tests de ELISA para la determinación de β -lactoglobulina.

Formato del test	Punto de corte ($\mu\text{g/g}$)	Estándares ($\mu\text{g/g}$)
Sándwich	0,05	0-0,05-0,10-0,25-0,50
Competitivo	0,50	0-0,50-1,0-5,0-10,0-50,0

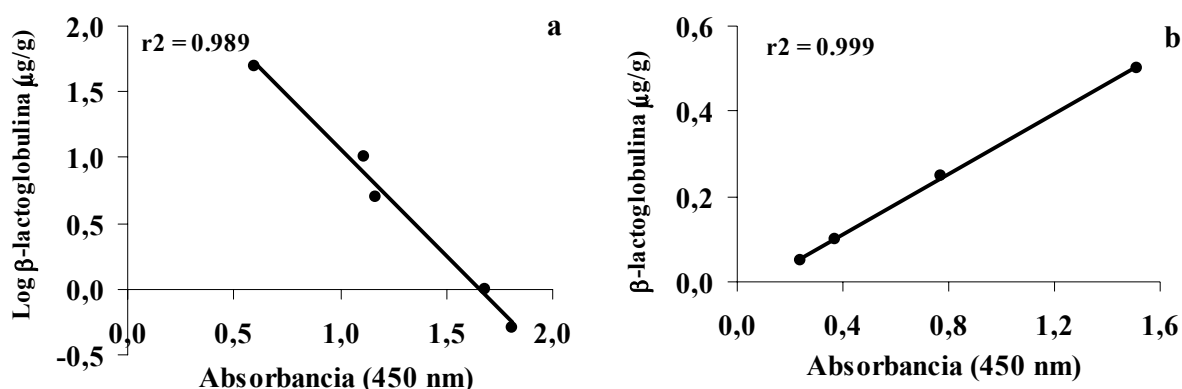


Figura 13: Curva de calibración obtenida para la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b) para la determinación de β -lactoglobulina utilizando estándares de proteína pura en PBS.

Los resultados individuales obtenidos por cada laboratorio, así como los valores medios y los coeficientes de variación se muestran en la Tabla 7. Las muestras que no contenían leche en polvo dieron concentraciones de β -lactoglobulina por debajo del punto de corte establecido para cada formato en los tres laboratorios. Para el formato de ELISA sándwich, las muestras de salchicha fueron positivas para los tres laboratorios a porcentajes de 0,005% de leche en polvo, y las muestras de pan a porcentajes de 0,05%. Para el formato competitivo, las muestras fueron positivas a porcentajes más altos, de 0,05 y 0,25%, respectivamente, de leche

en polvo para los mismos productos. Para las muestras de paté, en ambos formatos se obtuvo un resultado positivo en las muestras que contenían 0,25% de leche en polvo (Tabla 7).

Para las muestras con porcentajes de leche en polvo menores a las indicadas anteriormente, la concentración de β -lactoglobulina estuvo por debajo del punto de corte establecido para cada formato, resultando por tanto en falsos negativos, excepto para una muestra de pan que contenía 0,1% de leche, que fue positiva sólo para el laboratorio 3 utilizando el formato competitivo.

A porcentajes mayores que los indicados anteriormente, todas las muestras fueron positivas. La concentración de β -lactoglobulina inmunorreactiva se incrementó gradualmente con la cantidad de leche en polvo añadida, excepto en el caso de las salchichas analizadas por el formato de sándwich en los porcentajes superiores a 0,25%, que se mantuvo constante, lo que posiblemente se debe a un efecto de saturación en el ensayo.

Los coeficientes de variación para las salchichas y el pan fueron en la mayoría de las muestras mayores para el formato competitivo que para el sándwich (Tabla 7). Para las muestras de paté, los coeficientes de variación fueron muy altos al utilizar ambos formatos, debido posiblemente a interferencias con la matriz, producidas por el alto contenido en grasa de este producto.

IV.3.5. DETERMINACIÓN DE β -LACTOGLOBULINA EN ALIMENTOS COMERCIALES

Los resultados obtenidos al analizar diversos alimentos comerciales en los que se indicaba o no la presencia de leche o derivados en su etiqueta se muestran en la Figura 14. Del total de 30 productos comerciales en los que se indicaba en la etiqueta la presencia de leche o derivados, 23 y 26 dieron concentraciones de β -lactoglobulina por encima del punto de corte establecido para considerar una muestra como positiva para la adición de leche cuando se analizaron por el formato competitivo indirecto y el sándwich, respectivamente (Figura 14). Cuatro muestras (dos productos cárnicos y dos precocinados) en los que se indicaba la presencia de proteínas lácteas, dieron un resultado negativo con ambos formatos. Otras tres muestras, que dieron un resultado negativo sólo con el formato competitivo, correspondieron a un producto cárnico cocido y dos productos de pastelería, y la concentración estimada al analizarlos utilizando el formato de sándwich fue muy baja, menor de 0,10 $\mu\text{g/g}$.

De los 7 productos en los que su etiqueta indicaba “puede contener trazas de leche”, 3 y 5 dieron un resultado por encima del punto de corte establecido, para el formato competitivo y el sándwich, respectivamente. De los 29 productos en los no se indicaba la presencia de leche o derivados en la etiqueta, 4 dieron un resultado positivo. Tres de las muestras fueron positivas al analizarlos con ambos formatos, mientras que una muestra de chocolate fue positiva sólo con el formato competitivo, y una muestra de cereales sólo con el formato de sándwich.

Tabla 7: Resultados obtenidos por los tres laboratorios, valores de la media (\bar{X}) y coeficientes de variación (CV) en el análisis de alimentos modelo elaborados con diferentes porcentajes de leche desnatada en polvo, usando la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto y sándwich para la detección de β -lactoglobulina. Los resultados están expresados en μg de β -lactoglobulina/ g de alimento.

Leche en polvo (%)	Competitivo					Sándwich				
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	\bar{X}	CV	Lab 1	Lab 2	Lab 3	\bar{X}	CV
Salchicha										
0	0,35	0,30	0,32	0,32	8	0,00	0,04	0,00	0,01	173
0,005	0,37	0,33	0,12	0,27	49	0,05	0,05	0,07	0,05*	20
0,01	0,21	0,22	0,43	0,29	43	0,10	0,12	0,13	0,12*	13
0,05	0,91	0,69	0,89	0,83*	15	0,34	0,39	0,44	0,39*	13
0,1	1,53	0,88	1,12	1,18*	28	0,54	0,60	0,70	0,61*	13
0,25	3,88	1,94	2,06	2,63*	41	0,67	0,68	0,77	0,71*	8
0,5	3,34	3,08	2,81	3,07*	9	0,72	0,65	0,79	0,72*	10
1	8,28	3,45	11,69	7,81*	53	0,75	0,67	0,72	0,72*	6
Pan										
0	0,10	0,23	0,32	0,22	51	0,01	0,04	0,02	0,02	65
0,005	0,33	0,27	0,12	0,30	45	0,02	0,02	0,02	0,02	0
0,01	0,14	0,16	0,29	0,20	41	0,02	0,03	0,04	0,03	33
0,05	0,24	0,24	0,41	0,30	26	0,15	0,18	0,20	0,17*	14
0,1	0,37	0,39	0,50	0,42	17	0,20	0,30	0,29	0,26*	21
0,25	1,16	0,74	1,90	1,27*	46	0,34	0,54	0,43	0,44*	23
0,5	2,20	0,94	2,15	1,77*	40	0,42	0,58	0,60	0,53*	18
1	6,75	4,49	7,97	6,40*	28	0,55	0,72	0,63	0,63*	14
Paté										
0	0,27	0,14	0,14	0,18	41	0,00	0,00	0,01	0,00	173
0,005	0,37	0,23	0,30	0,30	23	0,00	0,00	0,01	0,00	173
0,01	0,10	0,22	0,33	0,22	53	0,00	0,00	0,02	0,02	173
0,05	0,15	0,32	0,36	0,27	40	0,03	0,00	0,03	0,02	87
0,1	0,14	0,32	0,45	0,30	51	0,00	0,01	0,03	0,02	115
0,25	1,44	1,06	0,55	1,02*	44	0,09	0,18	0,23	0,17*	43
0,5	1,67	1,82	1,29	1,59*	17	0,10	0,17	0,23	0,17*	39
1	4,42	2,91	4,70	4,01*	24	0,17	0,40	0,24	0,27*	44

(*) Muestras de alimentos con valores de concentración por encima del punto de corte establecido para cada formato.

Algunos de los alimentos comerciales que, por las técnicas de ELISA en placa, habían dado un resultado positivo, sin que la presencia de leche o derivados estuviera indicada en su etiqueta, o negativo, se analizaron también por las técnicas de inmunodotting (Figura 15a) y western-blotting (Figura 15b y c), utilizando los antisueros frente a la β -lactoglobulina. Como control se analizaron también algunos alimentos cuyo resultado coincidió con lo indicado en la etiqueta.

Los resultados obtenidos en las muestras analizadas por inmunodotting coincidieron con los de western-blotting, y se muestran junto a los obtenidos por las técnicas de ELISA en la Tabla 8. Como puede observarse, de los cinco productos analizados en los que se indicaba la presencia de leche o derivados en la etiqueta, dos productos (galletas a y patatas) dieron un resultado positivo al analizarlas por todas las técnicas, y tres productos (chopped, pan y fuet) sólo fueron positivos por la técnica de ELISA tipo sándwich. De los cuatro productos en los que no se indicaba la presencia de leche o derivados, una muestra (galletas b) dio un resultado negativo al analizarla por todas las técnicas. Otros dos productos (jamón de york y salami) dieron un resultado positivo en todas las técnicas, mientras que un producto (salchichas) dio positivo sólo al analizarlo mediante las técnicas de ELISA (Tabla 8).

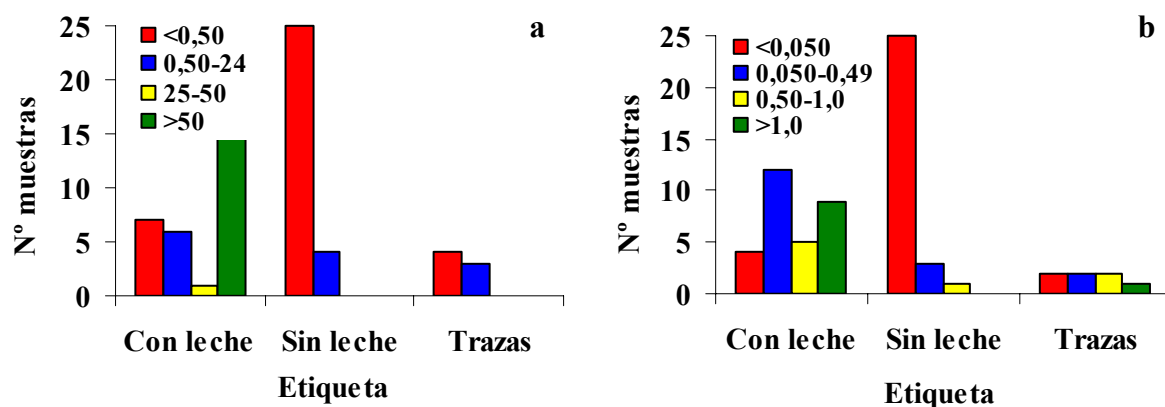


Figura 14: Análisis de alimentos comerciales mediante la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b). Los alimentos se han clasificado en tres grupos: productos en cuya etiqueta se indicaba o no la presencia de leche o derivados, y productos en los que se indicaba la presencia de trazas de leche. Cada grupo se dividió en los cuatro rangos de concentración de β -lactoglobulina que están indicados en la leyenda ($\mu\text{g}/\text{g}$).

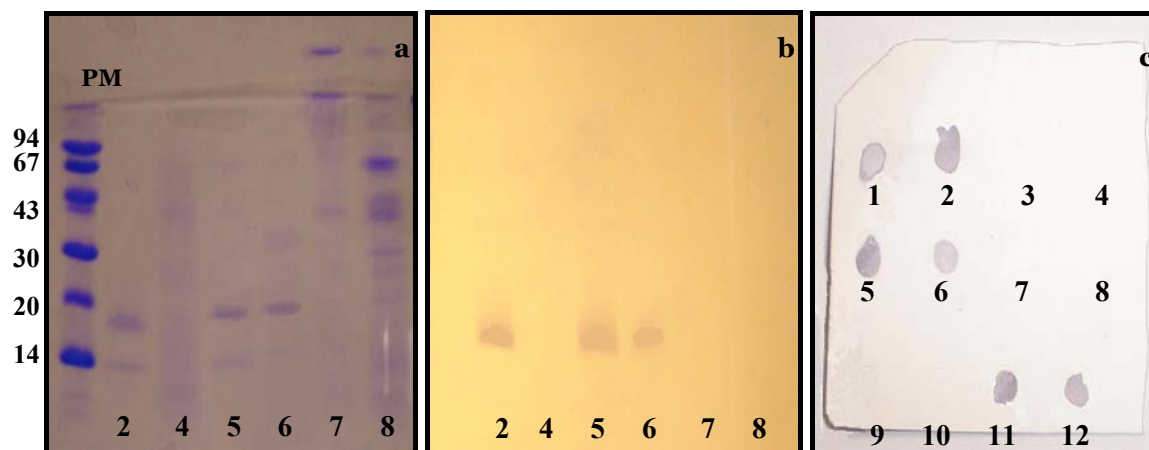


Figura 15: Electroforesis (a), western-blotting (b) e inmunodotting (c) utilizando un antisuero anti- β -lactoglobulina de alimentos comerciales en los que se indicaba (+) o no (-) la presencia de de leche o derivados en la etiqueta.

- 1: β -lactoglobulina(+) 2: Lactosuero(+) 3: Ovomucoide (-) 4: Pan de molde (+)
 5: Galletas a (+) 6: Patatas (+) 7: Chopped (+) 8: Fuet (+)
 9: Galletas b (-) 10: Salchichas (-) 11:York (-) 12: Salami (-)
 PM: Patrón de pesos moleculares (kDa)

Tabla 8: Resultados obtenidos en el análisis de alimentos comerciales mediante las técnicas de inmunodotting y western-blotting, ELISA tipo sándwich y ELISA tipo competitivo indirecto para la detección de β -lactoglobulina. +: resultado positivo, -: resultado negativo. Etiqueta: indica (+) o no (-) la presencia de leche o derivados en la etiqueta.

Producto	Etiqueta	ELISA Sándwich	ELISA Competitivo	Inmunodotting/ Western-blotting
Galletas a	+	+	+	+
Patatas	+	+	+	+
Pan	+	+	-	-
Chopped	+	+	-	-
Fuet	+	+	-	-
Galletas b	-	-	-	-
Salchichas	-	+	+	-
Jamón york	-	+	+	+
Salami	-	+	+	+

IV.3.6. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE INMUNOCROMATOGRAFÍA PARA LA DETECCIÓN DE β -LACTOGLOBULINA Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS PROCESADOS

Durante el desarrollo del test de inmunocromatografía para la detección de β -lactoglobulina se ensayaron diferentes condiciones de unión de los anticuerpos con las microesferas, tales como distintos pHs, diferentes relaciones entre la concentración de

anticuerpos y de microesferas, así como la utilización de diferentes bloqueantes tras la unión de los anticuerpos. Las condiciones óptimas para el tapizado y bloqueo de las esferas se han indicado en el apartado III.2.11. por ser comunes a todos los anticuerpos utilizados en esta tesis.

La cantidad de anticuerpos unidos a las microesferas se estimó determinando, por el método de BCA, la cantidad de proteína libre presente en la solución antes y después de la unión. El porcentaje de anticuerpos unidos a las microesferas en todos los casos fue superior al 85%. Además, las microesferas tapizadas y no tapizadas se incubaron con IgG anti-IgG de conejo conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). En las muestras de microesferas tapizadas se observó en el microscopio óptico la presencia de agregados coloreados (Figura 16a), y en el microscopio de fluorescencia la presencia de puntos fluorescentes (Figura 16b), que no se observaron en las microesferas no tapizadas (Figuras 16c y d), lo que indica que las microesferas tapizadas tienen anticuerpos unidos en su superficie.

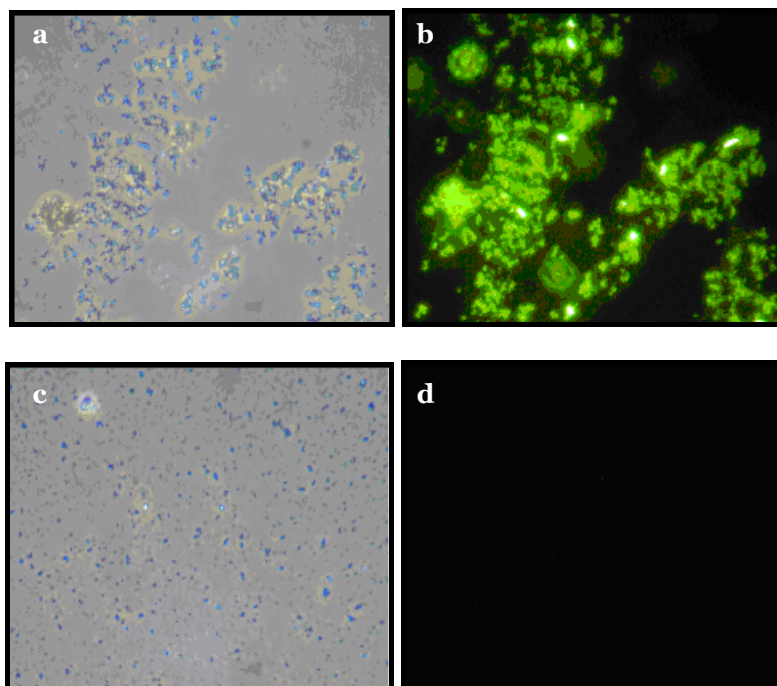


Figura 16: Imágenes obtenidas en el microscopio óptico (a y c) y en el microscopio de fluorescencia (b y d) de las microesferas tapizadas con anticuerpos anti- β -lactoglobulina (a y b) o sin tapizar (c y d), tras incubación con IgG anti-IgG de conejo conjugadas con FITC.

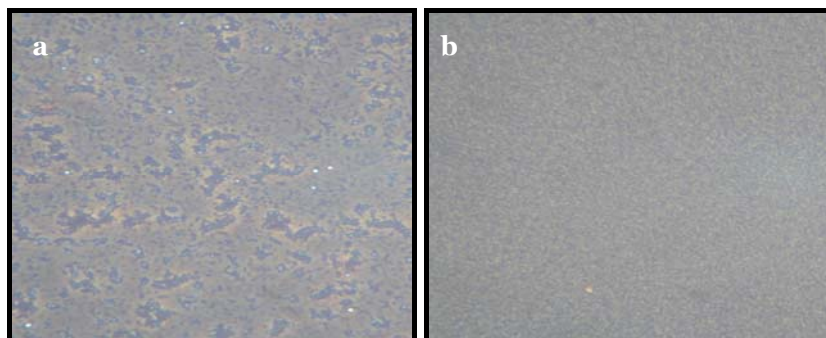


Figura 17: Imágenes obtenidas en el microscopio óptico de las microesferas tapizadas con anticuerpos anti- β -lactoglobulina incubadas con una solución que contenía (a) o no (b) β -lactoglobulina.

Por otra parte, cuando las microesferas tapizadas se incubaron con una solución que contenía β -lactoglobulina, se observaron al microscopio óptico agregados coloreados (Figura 17a), que no se observaron en ausencia de proteína (Figura 17b). La presencia de estos agregados es el resultado de la interacción entre la proteína y sus anticuerpos específicos unidos a las esferas.

En la preparación de la membrana de nitrocelulosa se probaron diferentes condiciones de inmovilización de los anticuerpos y de soluciones de bloqueo de los restantes puntos de unión a proteínas de la membrana. La aplicación de los anticuerpos a la membrana se ensayó a diferentes concentraciones, y en presencia o no de diferentes concentraciones de NaCl, metanol y SDS. El bloqueo de la membrana se ensayó con diferentes proteínas: ovoalbúmina, IgG y albúmina sérica bovina. Finalmente, en la preparación del diluyente para la muestra se probaron tampones con diferente pH y concentración de NaCl, detergentes (SDS, Tween-20) y alcoholes (metanol, etanol), así como diferentes proporciones de microesferas y muestra.

Las condiciones óptimas para la realización del test se obtuvieron cuando, tras aplicar los anticuerpos a la membrana, ésta se bloqueó con una solución de ovoalbúmina al 1% en tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7,4, durante 15 minutos en agitación. Después, se realizaron dos lavados de 15 minutos mediante inmersión de la membrana en tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7,5, que contenía SDS al 0,01%, y se dejó secar. Las microesferas tapizadas se diluyeron 1/60 en tampón Tris 0,5 M, pH 8,3, que contenía NaCl 0,5 M, EDTA 20 mM, y Tween-20 al 1%, y se mezclaron 80 μ L de dicha solución con 20 μ L del extracto del alimento a analizar en un tubo de ensayo.

El límite de detección del test de inmunocromatografía se determinó como la menor concentración de β -lactoglobulina en PBS con la que se obtuvo una banda coloreada en la zona de aplicación de los anticuerpos anti- β -lactoglobulina. Dicha concentración fue de 0,5 μ g

de proteína/mL. En todos los análisis realizados se observó la presencia de una banda coloreada en la zona de aplicación de las Ig anti-IgG de conejo, utilizada como control. En la Figura 18 se muestran las tiras de inmunocromatografías obtenidas inmediatamente tras el análisis de una muestra sin proteína y de una solución de 1 µg/mL de β-lactoglobulina.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunocromatografía en el análisis de los alimentos modelo elaborados con leche en polvo se muestran en la Tabla 9. Las muestras elaboradas sin leche en polvo dieron en todos los casos un resultado negativo. Se obtuvo un resultado positivo en las muestras de salchichas, pan y paté que contenían al menos un porcentaje de leche en polvo de 0,1, 0,5 y 1%, respectivamente, y a porcentajes menores las muestras dieron un resultado negativo.

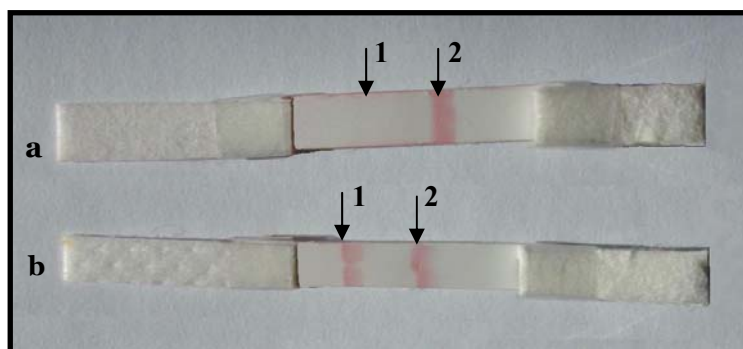


Figura 18: Inmunocromatografías correspondientes a una solución sin (a) y con (b) 1 µg/mL de β-lactoglobulina. Las flechas indican las zonas de aplicación de las IgG anti β-lactoglobulina (1) y de las Ig anti-IgG de conejo (2).

Tabla 9: Resultados obtenidos en el análisis de alimentos modelo elaborados con leche en polvo mediante la técnica de inmunocromatografía para la detección de β-lactoglobulina. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

Leche en polvo(%)	Salchicha	Pan	Paté
0	-	-	-
0,005	-	-	-
0,01	-	-	-
0,05	-	-	-
0,1	+	-	-
0,25	+	-	-
0,5	+	+	-
1	+	+	+

IV.3.7.DESARROLLO DE TÉCNICAS DE ELISA EN PLACA PARA LA DETERMINACIÓN DE OVOMUCOIDE

Las curvas de calibración obtenidas para la determinación de ovomucoide mediante las técnicas de ELISA en placa, de tipo competitivo indirecto y sándwich, se muestran en las Figuras 19a y b, respectivamente. En ambas gráficas se representa la absorbancia a 450 nm de los estándares de ovomucoide en PBS frente al logaritmo de la concentración. La recta obtenida fue lineal en un rango de concentraciones entre 50 ng/mL y 5 µg/mL ($r^2 \geq 0,99$), para el formato competitivo indirecto, y entre 20 ng/mL y 500 ng/mL ($r^2 \geq 0,99$), para el formato sándwich. El límite de detección, calculado como el valor medio de la concentración de ocho réplicas del blanco (PBS) más tres veces la desviación estándar, fue de 23 ng/mL para el formato competitivo y de 19 ng/mL para el formato sándwich, respectivamente.

La concentración de ovomucoide en las muestras analizadas se determinó por intrapolación de los valores de la absorbancia en las curvas de calibración obtenidas para cada formato.

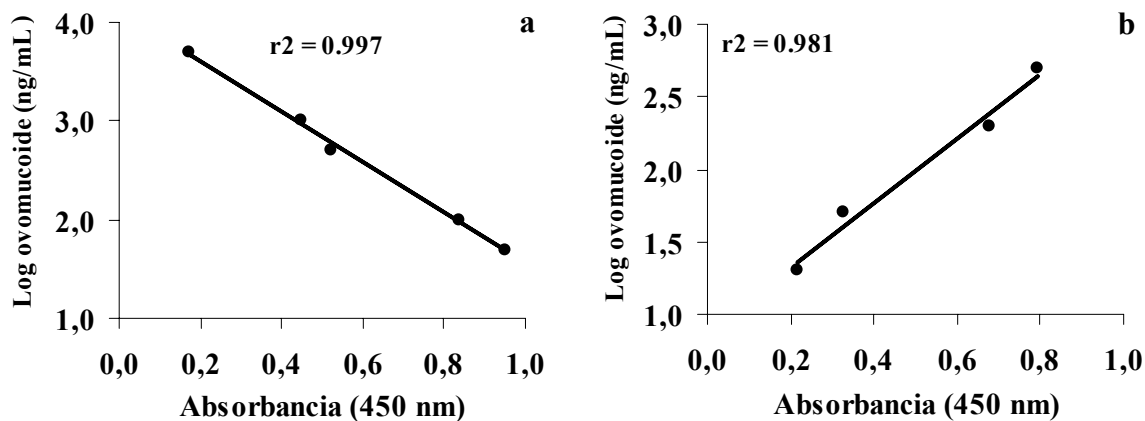


Figura 19: Curvas de calibración obtenidas para la determinación de ovomucoide mediante la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b). Los estándares contenían ovomucoide puro en PBS.

IV.3.8. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA DESNATURALIZACIÓN DEL OVOMUCOIDE

En la Figura 20a se muestran resultados obtenidos en la determinación del ovomucoide tratado en PBS a 90°C a diferentes tiempos, y en la Figura 20b los obtenidos al tratar la proteína durante 15 minutos a varias temperaturas. Las gráficas muestran los resultados de tres experimentos independientes en los que las muestras se analizaron cada una por triplicado.

Como puede observarse, la cantidad de proteína inmunorreactiva disminuyó al aumentar la temperatura o el tiempo de tratamiento, y el valor de la concentración determinada en todas las muestras por el formato competitivo fue ligeramente superior a la obtenida por el formato sándwich (Figura 20a). Así, durante el calentamiento a 90°C, la concentración de ovomucoide disminuyó de forma marcada en los 15 primeros minutos, hasta aproximadamente un 40% y un 30% de la concentración inicial, para el formato competitivo y el sándwich, respectivamente. Después, la concentración descendió más lentamente, quedando un 18% y un 10% tras 30 minutos de tratamiento, respectivamente.

En los tratamientos realizados a diferentes temperaturas durante 15 minutos, la disminución de proteína inmunorreactiva fue de aproximadamente un 15% tras el tratamiento a 70°C para ambos formatos, y de un 70% y un 76% a 95°C para el formato competitivo y el sándwich, respectivamente.

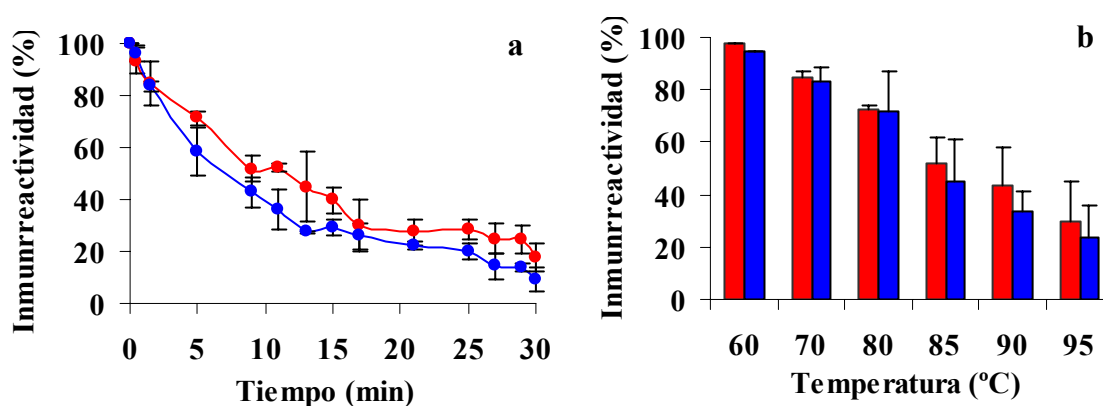


Figura 20: Efecto del tratamiento térmico a 90°C a lo largo del tiempo (a) o a varias temperaturas durante 15 minutos (b) en la inmunorreactividad del ovomucoide (500 µg/mL en PBS) determinada mediante la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto (●) y sándwich (●). Los valores de inmunorreactividad están expresados como porcentaje de la proteína inicial (100%).

IV.3.9. ESTUDIO COLABORATIVO PARA LA EVALUACIÓN DE DOS PROTOTIPOS DE TESTS COMERCIALES DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE OVOMUCOIDE EN ALIMENTOS PROCESADOS

La metodología desarrollada para la detección de ovomucoide se transfirió también a la empresa Zeu-Inmunotec, la cual preparó dos prototipos de tests de ELISA comerciales (competitivo indirecto y sándwich) para la determinación de ovomucoide. El estudio colaborativo se llevó a cabo de forma simultánea al realizado con los tests para la determinación de la β -lactoglobulina. Se analizaron los tres alimentos modelo (salchicha, pan y paté) que contenían concentraciones de huevo en polvo entre 0,005 y 1%. La evaluación se llevó a cabo por tres laboratorios, y nuestro grupo actuó como coordinador.

Antes de realizar el estudio colaborativo, se determinó en nuestro laboratorio el punto de corte o concentración límite de ovomucoide por encima de la cual una muestra se consideró positiva para la adición de huevo, tal y como se ha indicado en el apartado IV.3.1.3. para la β -lactoglobulina, utilizando diferentes ingredientes básicos que no contenían huevo o derivados (Tabla 10). Este valor fue de 0,40 y 0,20 μg de ovomucoide/g de alimento, para las técnicas de ELISA tipo competitivo indirecto y sándwich, respectivamente.

Tabla 10: Reactividad cruzada de diversos ingredientes básicos analizados por los formatos de ELISA tipo competitivo indirecto y sándwich para la determinación de ovomucoide. Los valores están expresados en μg de ovomucoide/g de alimento.

	Competitivo indirecto	Sándwich
Albúmina sérica bovina	0,03	0,11
Extracto de carne	0,11	0,14
Gelatina de pescado	0,02	0,11
Proteínas solubles de trigo	0,20	0,18
Harina de trigo	0,15	0,13
Harina de maíz	0,27	0,15
Harina de arroz	0,15	0,11
Aceite de oliva	0,01	0,12
Aislado de proteínas de soja	0,03	0,13
Proteínas de guisante	0,01	0,11
Leche	0,11	0,14
Lactosuero	0,06	0,19
Caseína	0,25	0,11

Los puntos de corte de concentración de ovomucoide para considerar una muestra positiva, así como los estándares usados en las curvas de calibración, se muestran en la Tabla 11. En ambos formatos, se obtuvo una relación lineal al representar la absorbancia de los estándares frente al logaritmo de la concentración de ovomucoide (Figura 21).

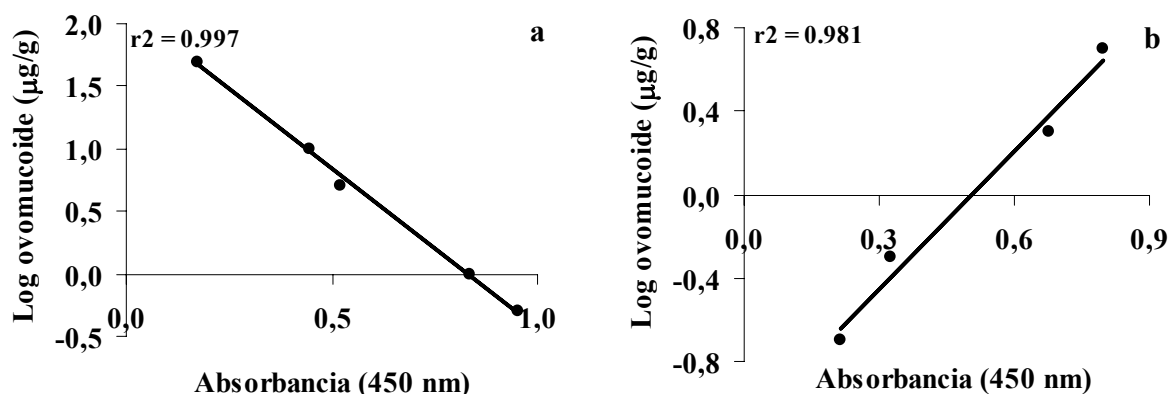


Figura 21: Curva de calibración obtenida para la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b) para la determinación de ovomucoide utilizando estándares de proteína pura en PBS.

Tabla 11: Concentración de los estándares y puntos de corte establecidos para los prototipos de tests de ELISA para la determinación de ovomucoide.

Formato del test	Punto de corte (µg/g)	Estándares (µg/g)
Sándwich	0,20	0-0,20-0,50-2,0-5,0
Competitivo	0,40	0-0,50-1,0-5,0-10,0-50,0

La homogeneidad de las muestras de alimentos se comprobó como se ha indicado anteriormente, analizando cinco muestras de cada alimento y concentración de huevo en polvo por duplicado. El coeficiente de variación fue en todos los casos menor del 18%, por lo que este valor se consideró aceptable para el propósito de este estudio.

La concentración de ovomucoide en el huevo en polvo utilizado para la elaboración de los alimentos modelo fue de 32,1 y 21,0 mg/g, para el formato competitivo indirecto y el sándwich, respectivamente.

Los resultados individuales obtenidos por cada laboratorio para la cuantificación de ovomucoide en alimentos modelo, así como los valores medios y los coeficientes de variación se muestran en la Tabla 12. Para los tres alimentos, las muestras que no contenían huevo en polvo dieron concentraciones de ovomucoide por debajo del punto de corte establecido para cada formato en los tres laboratorios y, por lo tanto, un resultado negativo.

Para ambos formatos de ELISA, las muestras de salchicha fueron positivas para los tres laboratorios a porcentajes de 0,005% de huevo en polvo, y las muestras de pan a porcentajes de 0,05%. Para las muestras de paté, sólo utilizando el formato competitivo las muestras que contenían al menos un 0,25% de huevo en polvo dieron un resultado por encima del punto de

corte establecido (Tabla 12). Las muestras con menores porcentajes de huevo en polvo que las indicadas dieron un resultado falso negativo, y con mayores porcentajes dieron un resultado positivo, con excepción de la muestra de 0,1% de pan analizada mediante el ELISA tipo sándwich, que fue negativa para el laboratorio 2. La concentración de ovomucoide inmunorreactivo se incrementó gradualmente con la cantidad de huevo en polvo añadido, excepto en el caso de las salchichas analizadas por el formato de sándwich en los porcentajes superiores a 0,25%, lo que posiblemente se debe a un efecto de saturación.

Tabla 12: Resultados obtenidos por los tres laboratorios, valores de la media (\bar{X}) y coeficientes de variación (CV) en el análisis de alimentos modelo elaborados con diferentes porcentajes de huevo en polvo, usando la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto y sándwich para la detección de ovomucoide. Los resultados están expresados en μg de ovomucoide/ g de alimento.

Huevo en polvo (%)	Competitivo					Sándwich				
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	\bar{X}	CV	Lab 1	Lab 2	Lab 3	\bar{X}	CV
Salchicha										
0	0,20	0,09	0,22	0,17	41	0,13	0,14	0,15	0,14	7
0,005	0,72	0,41	0,53	0,55*	28	0,36	0,34	0,34	0,35*	3
0,01	2,05	1,36	0,49	1,30*	60	0,52	0,68	0,56	0,59*	14
0,05	1,62	9,88	4,93	5,48*	76	0,57	0,75	1,03	0,78*	30
0,1	17,18	19,36	15,27	17,27*	12	1,42	0,95	1,32	1,23*	20
0,25	30,73	27,97	34,32	31,01*	10	1,99	1,11	1,21	1,44*	34
0,5	35,00	35,63	43,38	38,01*	12	1,47	1,38	1,55	1,47*	6
1	42,81	45,68	42,16	43,55*	4	1,95	1,06	1,52	1,51*	29
Pan										
0	0,21	0,15	0,21	0,19	18	0,16	0,19	0,27	0,16	28
0,005	0,12	0,10	0,13	0,12	13	0,14	0,14	0,15	0,14	4
0,01	0,17	0,11	0,22	0,17	33	0,14	0,14	0,16	0,15	8
0,05	0,48	0,64	0,56	0,56*	14	0,21	0,25	0,26	0,26*	11
0,1	0,53	0,56	0,62	0,57*	8	0,20	0,18	0,30	0,23*	28
0,25	2,91	5,09	2,47	3,49*	40	0,95	0,80	0,91	0,88*	9
0,5	2,71	4,80	8,26	5,26*	53	1,24	1,72	1,29	1,42*	19
1	12,52	31,57	10,12	18,07*	65	1,52	1,81	1,61	1,65*	9
Paté										
0	0,07	0,20	0,04	0,10	82	0,14	0,14	0,15	0,14	4
0,005	0,03	0,17	0,09	0,10	73	0,14	0,14	0,16	0,14	8
0,01	0,10	0,11	0,11	0,10	8	0,13	0,14	0,15	0,14	7
0,05	0,21	0,14	0,07	0,14	50	0,14	0,14	0,16	0,15	8
0,1	0,07	0,36	0,08	0,17	97	0,15	0,14	0,14	0,14	4
0,25	0,66	1,51	0,42	0,85*	66	0,14	0,15	0,15	0,15	4
0,5	2,07	1,77	1,11	1,65*	30	0,16	0,15	0,16	0,16	4
1	1,09	5,27	0,98	2,45*	100	0,14	0,15	0,15	0,15	4

(*) Muestras de alimentos con valores de concentración por encima del punto de corte establecido para cada formato.

Por otro lado, se observó que el porcentaje de huevo en polvo requerido para dar un resultado positivo dependía de la intensidad del tratamiento térmico aplicado, siendo éste porcentaje mayor en el caso del paté (esterilizado), seguido del pan (horneado) y de la salchicha (pasterizada). Las concentraciones de ovomucoide obtenidas en los alimentos modelo fueron mucho menores que las concentraciones teóricas estimadas a partir del huevo en polvo añadido como ingrediente para cada uno de los formatos, sobre todo en los productos que recibieron un mayor tratamiento térmico. Así, se han estimado recuperaciones de entre el 45 y el 5%, correspondiendo los porcentajes mayores a las muestras de salchicha, y los menores a las de paté. Además, es remarcable que la concentración de ovomucoide obtenida en las muestras positivas que tenían el mismo porcentaje de huevo en polvo fue mayor en el formato competitivo que en el sándwich, sobre todo en los porcentajes más altos. Los coeficientes de variación para las salchichas y el pan fueron en la mayor parte de los casos mayores para el formato competitivo que para el sándwich (Tabla 12).

IV.3.10. DETERMINACIÓN DE OVOMUCOIDE EN ALIMENTOS COMERCIALES

Los resultados obtenidos al analizar diversos alimentos comerciales en los que se indicaba o no la presencia de huevo o derivados en su etiqueta se muestran en la Figura 22. Del total de 12 productos comerciales analizados en los que se indicaba en la etiqueta la presencia de huevo o derivados, 7 y 8 dieron concentraciones de ovomucoide por encima del punto de corte establecido para considerar una muestra como positiva para la adición de huevo cuando se analizaron por el ELISA tipo competitivo indirecto y el sándwich, respectivamente (Figura 22). Los cuatro alimentos que dieron un resultado negativo en ambos ensayos fueron muestras de galletas, pasta, salsa y albóndigas. Una muestra de empanada dio negativo sólo con el ensayo competitivo, y la concentración estimada para este producto por el formato de sándwich estuvo en el rango de entre 2,0 y 5,0 μg de ovomucoide/g de alimento.

Los siete productos en los que se indicaba la presencia de trazas de huevo, y los 39 productos en los que no se indicaba la presencia de huevo o derivados en la etiqueta, dieron en todos los casos una concentración de ovomucoide por debajo del punto de corte establecido al analizarlos por ambos formatos.

Algunos de los alimentos comerciales que, por las técnicas de ELISA en placa, habían dado un resultado negativo, estando indicada la presencia de huevo o derivados en su

etiqueta, se analizaron también por las técnicas de inmunodotting (Figura 23a) y western-blotting (Figura 23b y c), utilizando los antisueros frente al ovomucoide. Como control se analizaron también algunos alimentos cuyo resultado por las técnicas de ELISA coincidió con lo indicado en la etiqueta.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas de inmunodotting y western-blotting fueron similares, y se muestran junto a los obtenidos por las técnicas de ELISA en la Tabla 13. Como puede observarse, de los cuatro productos en los que se indicaba la presencia de huevo o derivados, dos muestras (flan y surimi) dieron un resultado positivo, y dos muestras (galletas y albóndigas) un resultado negativo en todas las técnicas. Los tres productos (huesito, patatas y hamburguesa) en los que no se indicaba la presencia de huevo o derivados dieron un resultado negativo al analizarla mediante todas las técnicas.

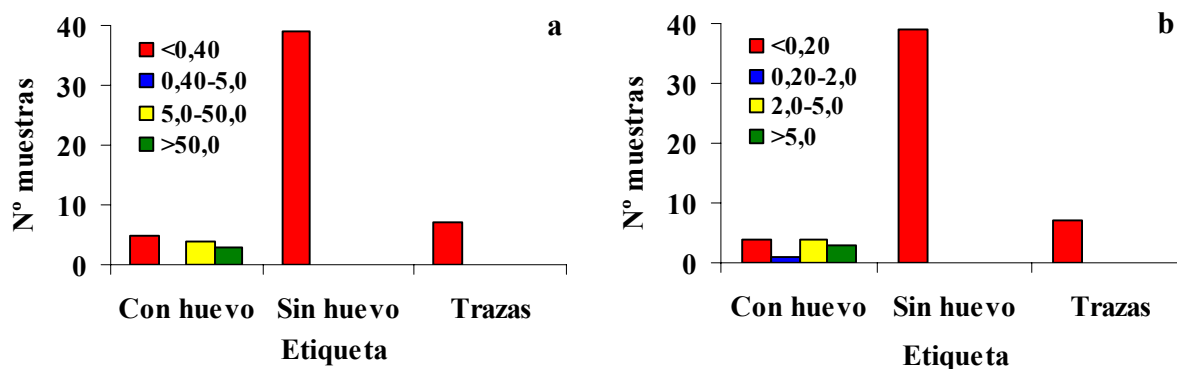


Figura 22: Análisis de alimentos comerciales mediante la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b). Los alimentos se han clasificado en tres grupos: productos en cuya etiqueta se indicaba o no la presencia de huevo o derivados, y productos en los que se indicaba la presencia de trazas de huevo. Cada grupo se dividió en los cuatro rangos de concentración de ovomucoide indicados en la leyenda ($\mu\text{g}/\text{g}$).

Tabla 13: Resultados obtenidos en el análisis de alimentos comerciales mediante las técnicas de inmunodotting y western-blotting, ELISA tipo sándwich y ELISA tipo competitivo indirecto para la detección de ovomucoide. +: resultado positivo, -: resultado negativo. Etiqueta: indica (+) o no (-) la presencia de huevo o derivados en la etiqueta.

Producto	Etiqueta	ELISA Sándwich	ELISA Competitivo	Inmunodotting/ Western-blotting
Flan	+	+	+	+
Surimi	+	+	+	+
Albóndigas	+	-	-	-
Galletas	+	-	-	-
Galleta de chocolate	-	-	-	-
Patatas	-	-	-	-
Hamburguesa	-	-	-	-

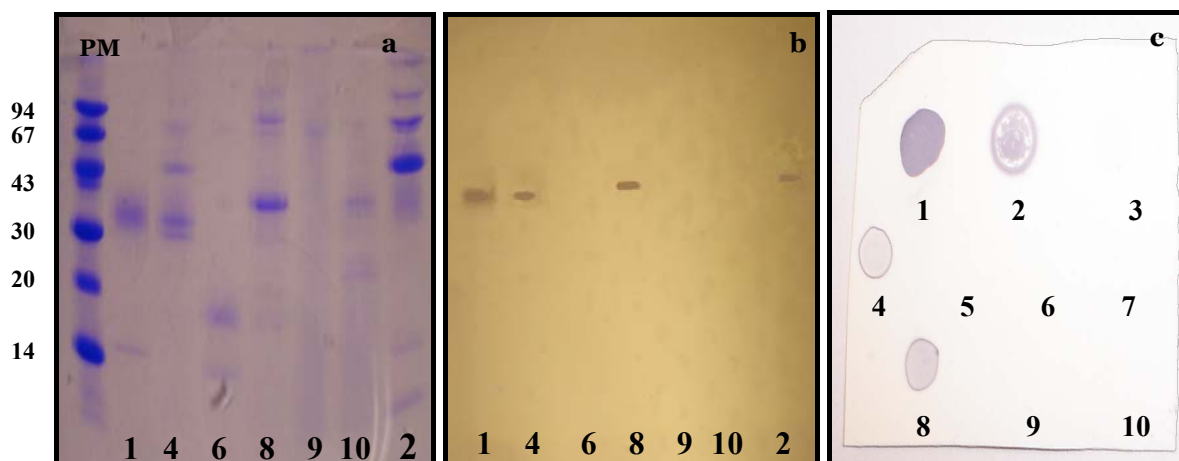


Figura 23: Electroforesis (a), western-blotting (b) e inmunodotting (c) utilizando un antisuero anti-ovomucoide de alimentos comerciales en los que se indicaba (+) o no (-) la presencia de huevo o derivados en la etiqueta.

1: Ovomucoide (+)

2: Huevina (+)

3: β -lactoglobulina (-)

4: Flan (+)

5: Galletas de chocolate (-)

6: Galletas (+)

7: Patatas (-)

8: Surimi (+)

9: Albóndigas (+)

10: Hamburguesa (-)

PM: Patrón de pesos moleculares (kDa)

IV.3.11. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE INMUNOCROMATOGRAFÍA PARA LA DETECCIÓN DE OVOMUCOIDE Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS MODELO PROCESADOS

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de inmunocromatografía para la detección de ovomucoide en alimentos. Las condiciones óptimas para el tapizado de las microesferas y la aplicación de los anticuerpos en la membrana fueron las mismas que las indicadas en el caso de los anticuerpos anti- β -lactoglobulina.

Las condiciones óptimas para la realización del test inmunocromatográfico para la detección de ovomucoide se obtuvieron cuando, tras aplicar los anticuerpos a la membrana, ésta se bloqueó con una solución de caseína al 1% en tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7,5, durante 15 minutos en agitación. Después, se realizaron dos lavados de 15 minutos mediante inmersión de la membrana en tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7,5, que contenía SDS al 0,01%, y se dejó secar. Las microesferas tapizadas se diluyeron 1/50 en tampón Tris 0,5 M,

NaCl 0,5 M, pH 9,2, que contenía hexano y metanol al 0,1%, y BSA al 0,1%, y se mezclaron 70 μ L de dicha solución con 30 μ L del extracto del alimento a analizar.

El límite de detección del test de inmunocromatografía para ovomucoide fue de 50 ng de proteína/mL. En todos los análisis realizados se observó la presencia de una banda coloreada en la zona de aplicación de las IgG anti-IgG de conejo, utilizada como control.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunocromatografía en el análisis de los alimentos modelo elaborados con huevo en polvo se muestran en la Tabla 14. Las muestras elaboradas sin huevo en polvo dieron en todos los casos un resultado negativo. Se obtuvo un resultado positivo en las muestras de salchichas, pan o paté que contenían al menos un porcentaje de leche en polvo de 0,01, 0,05 y 0,5%, respectivamente, y a porcentajes menores las muestras dieron un resultado negativo.

Tabla 14: Resultados obtenidos mediante la técnica de inmunocromatografía para la detección de ovomucoide en el análisis de alimentos modelo elaborados con huevo en polvo. +: resultado positivo, -: resultado negativo.

Huevo en polvo(%)	Salchicha	Pan	Paté
0	-	-	-
0,005	-	-	-
0,01	+	-	-
0,05	+	+	-
0,1	+	+	-
0,25	+	+	-
0,5	+	+	+
1	+	+	+

IV.4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y LA PROTEOLISIS SOBRE LA PROTEÍNA Cry1A(b) DE MAÍZ TRANSGÉNICO

En este trabajo se ha estudiado el efecto que el tratamiento térmico tiene sobre la proteína Cry1A(b) expresada en el maíz transgénico, y se han determinado los parámetros cinéticos y termodinámicos de su desnaturalización. Además, se ha estudiado el efecto que tienen diferentes formas de procesado de la harina de maíz sobre dicha proteína. El grado de desnaturalización se ha determinado midiendo la pérdida de reactividad de la proteína Cry1A(b) con sus anticuerpos específicos utilizando técnicas inmunoquímicas.

Por otra parte, se ha estudiado también el efecto que tiene la proteólisis con pepsina en la proteína Cry1A(b). Este estudio se ha llevado a cabo incubando la proteína con el enzima y caracterizando los fragmentos obtenidos por electroforesis, técnicas inmunoquímicas y espectrometría de masas. Para llevar a cabo este estudio, fue necesario previamente aislar la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico.

IV.4.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Cry1A(b) DEL MAÍZ TRANSGÉNICO

El aislamiento de la proteína Cry1A(b) se realizó a partir de un extracto de hojas de maíz transgénico utilizando una columna con anticuerpos anti-proteína Cry1A(b) insolubilizados en Sepharose 4B. En la Figura 24 se muestra el perfil de dicha cromatografía. El perfil presenta dos picos; el primer pico, eluido con SSF, contiene todos los componentes del extracto que no interaccionan con el inmunoadsorbente, y el segundo, eluido con un tampón de pH 2,6 que contenía dioxano al 10%, los que interaccionan con el mismo. Las fracciones del segundo pico, se recogieron conjuntamente, se dializaron frente a SSF, se concentraron por ultrafiltración y se caracterizaron mediante electroforesis y western-blotting (Figura 25). Como puede observarse, la proteína producida por *B. thuringiensis* utilizada como referencia muestra una única banda de aproximadamente 70 kDa, mientras que la fracción aislada del maíz transgénico muestra 6 bandas de diferente intensidad, cuyos pesos moleculares varían entre 10 y 70 kDa.

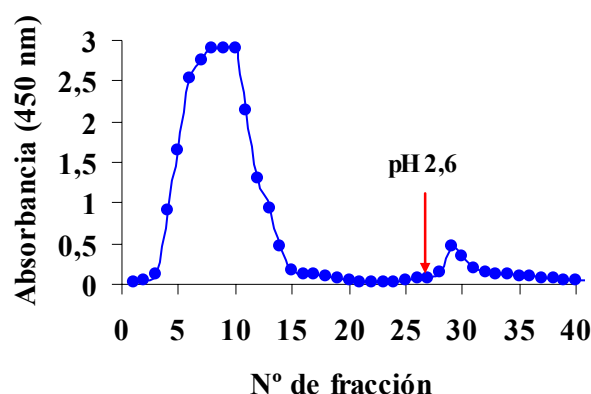


Figura 24: Cromatografía del concentrado de hojas de maíz transgénico utilizando una columna que contenía anticuerpos anti-proteína Cry1A(b) insolubilizados en Sepharose 4B. Las fracciones recogidas fueron de 2 mL. La flecha indica la aplicación del tampón de pH 2,6 con un 10% de dioxano.

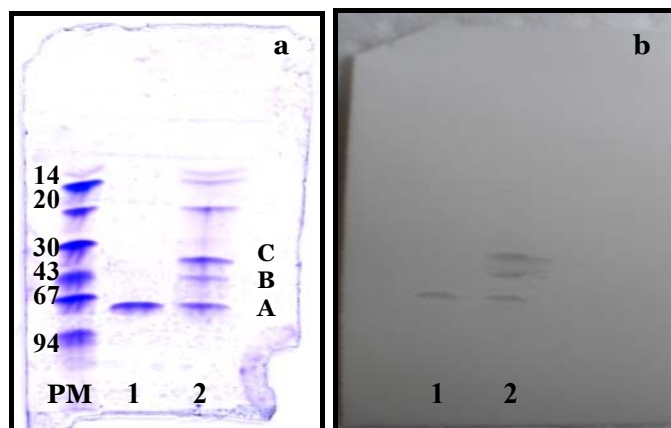


Figura 25: Electroforesis (a) y western-blotting (b) utilizando un antisuero anti-proteína Cry1A(b) de la proteína Cry1A(b) procedente de *B. thuringiensis* (1) y de la fracción aislada de maíz transgénico (2). PM: patrón de pesos moleculares (kDa).

El análisis de la fracción aislada realizado por western-blotting utilizando el antisuero anti-proteína Cry1A(b) mostró una reacción positiva con la proteína procedente de *B. thuringiensis*, y con las tres bandas de mayor peso molecular de la proteína aislada del maíz transgénico. Las tres bandas se recortaron del gel y se realizó de cada una un análisis de identificación de proteínas por huella peptídica por la técnica de MALDI-TOFF, comparando los péptidos obtenidos con los péptidos teóricos indicados en la base de datos NCBIInr para la proteína Cry1A(b). En todos los casos las proteínas identificadas superaron la puntuación de Mascot estimada para que la probabilidad fuera ≤ 0.05 , es decir que las coincidencias no se debieran al azar (Tabla 15).

Tabla 15: Datos obtenidos en el análisis de identificación de péptidos por huella peptídica por la técnica de MALDI-TOFF de las tres bandas de la electroforesis para la identificación de la proteína Cry1A(b) obtenida del maíz transgénico.

Banda (1)	Puntuación de Mascot (2)	Nº péptidos coincidentes (3)	Cobertura de secuencia (4)
A	248	29 (75)	50
B	241	28 (72)	48
C	196	23 (63)	38

1.- A, B y C, bandas indicadas en la Figura 25.

2.- Puntuación de Mascot para la identificación de proteínas ($p \leq 0.05$).

3.- Nº de péptidos coincidentes entre la secuencia de la proteína Cry1A(b), obtenida de la base de datos NCBIInr, número de acceso Gi|36244769 (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>), y entre paréntesis el número de péptidos buscados.

4.- Porcentaje de la secuencia de aminoácidos que cubren los péptidos coincidentes.

Además, se determinó la reactividad cruzada que existe entre la proteína Cry1A(b) obtenida de *B. thuringiensis* y la obtenida de maíz transgénico utilizando una técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto. Para ello, una placa tapizada con la proteína procedente de *B. thuringiensis* se incubó con concentraciones crecientes de ambas proteínas. En la Figura 26 se muestra la absorbancia frente a la concentración de cada proteína, expresada como porcentaje de la absorbancia máxima. La reactividad cruzada entre estas dos proteínas se calculó mediante la ecuación:

$$RC (\%) = X_1 / X_2 \times 100$$

donde X_1 y X_2 corresponden a la concentración de proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis* y de maíz transgénico, respectivamente, a la que se obtiene el 50% de la absorbancia máxima. La reactividad cruzada entre ambas proteínas fue del 95%, lo que indica que entre ellas existe una identidad inmunológica. Por lo tanto, estos anticuerpos resultan adecuados para ser usados en técnicas inmunoquímicas para la determinación de la proteína presente en el maíz transgénico.

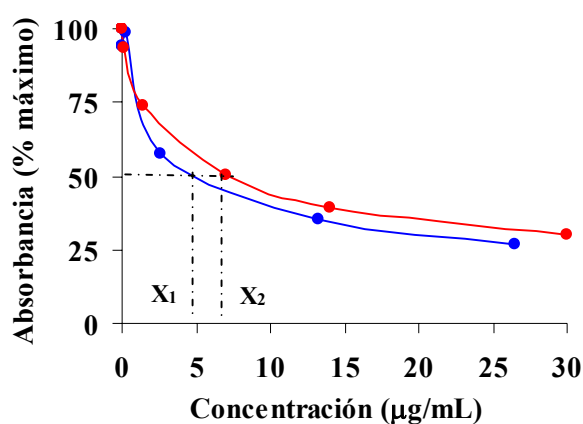


Figura 26: Reactividad cruzada de la proteína Cry1A(b) procedente de *B. thuringiensis* (●) y de la aislada de maíz transgénico (●) utilizando una técnica de ELISA competitiva indirecta y placas tapizadas con la proteína de *B. thuringiensis*.

IV.4.2. DESARROLLO DE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA Cry1A(b)

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de ELISA en placa de tipo sándwich y una técnica de inmunocromatografía para la determinación de la proteína Cry1A(b).

Para la técnica de ELISA tipo sándwich, la curva de calibración obtenida al representar la relación entre la absorbancia y el logaritmo de la concentración de los estándares de la proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis* en PBS fue lineal en el rango de concentraciones de 10 a 500 ng/mL ($r^2 \geq 0,98$). Los coeficientes de variación en cada punto fueron menores del 5% (Figura 27). El límite de detección, definido como la media de la concentración de ocho réplicas del blanco (PBS) más tres veces su desviación estándar fue de 7,4 ng/mL. La concentración de Cry1A(b) en las muestras analizadas se determinó por intrapolación de los valores de la absorbancia en las curva de calibración obtenida en cada placa. El análisis de los extractos de maíz no transgénico dio valores de absorbancia por debajo del límite de detección establecido, lo que indica que los anticuerpos utilizados no reaccionan con otros componentes del maíz.

Para la técnica de inmunocromatografía, las condiciones óptimas para la realización del test se obtuvieron utilizando la membrana sin bloquear. Las microesferas tapizadas se diluyeron 1/20 en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,5, que contenía BSA al 0,5%, y se mezclaron 55 μ L de dicha solución con 45 μ L del extracto de la muestra a analizar. El límite de detección del test de inmunocromatografía se determinó como la menor concentración de la proteína Cry1A(b) pura en PBS con la que se obtuvo una banda coloreada en la zona de aplicación de los anticuerpos anti-proteína Cry1A(b), que fue de 10 ng/mL. En todos los análisis realizados se observó la presencia de una banda coloreada en la zona de aplicación de las IgG anti-IgG de conejo, utilizada como control. Con esta técnica, se analizaron también extractos de maíz no transgénico, los cuales dieron un resultado negativo.

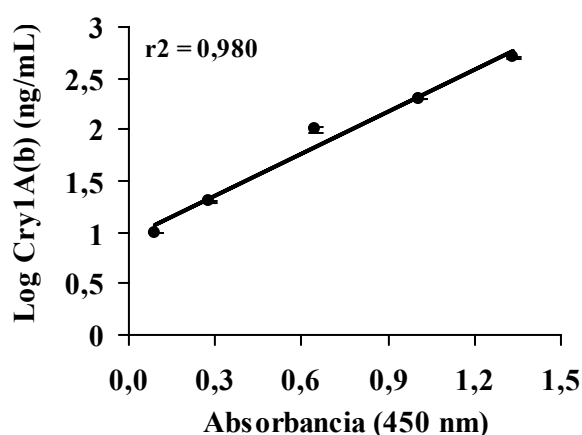


Figura 27: Curva de calibración obtenida para la determinación de la proteína Cry1A(b) utilizando una técnica de ELISA tipo sándwich.

IV.4.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA PROTEÍNA Cry1A(b) EXPRESADA EN EL MAÍZ TRANSGÉNICO: DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y TERMODINÁMICOS DE DESNATURALIZACIÓN

Para estudiar el efecto que el tratamiento térmico tiene sobre la proteína Cry1A(b), se calentó un extracto concentrado de hojas de maíz transgénico en tubos capilares, y la cantidad de proteína inmunorreactiva se determinó usando la técnica de ELISA desarrollada.

Previamente, se realizaron experimentos para determinar un rango de temperaturas apropiado para estudiar la desnaturalización de la proteína Cry1A(b). Se observó que la proteína Cry1A(b) se desnaturalizaba muy despacio a 65°C, obteniéndose tras 1 hora solo un 20% de desnaturalización. Por el contrario, a temperaturas por encima de 77°C la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) fue muy rápida, y los intervalos demasiado cortos para permitir tomar muestras de forma adecuada para realizar un estudio cinético. Por lo tanto, el rango de temperaturas escogido fue de 69 a 77°C. Para cada temperatura de tratamiento los tiempos se seleccionaron para tomar muestras a intervalos regulares para alcanzar al menos una reducción de los valores de concentración de un ciclo logarítmico.

La representación gráfica del porcentaje de proteína inmunorreactiva en función del tiempo, para cada temperatura estudiada, se muestra en la Figura 28. Con estos datos se calculó el tiempo de reducción decimal D, que se corresponde con la inversa de la pendiente de la ecuación de la recta obtenida, y representa el tiempo necesario para que se desnaturalice el 90% de la proteína. En la Tabla 16 y la Figura 29 se muestra como el valor D disminuyó a medida que aumentó la temperatura de tratamiento. La pendiente de la recta obtenida al representar el logaritmo de los valores D frente a la temperatura corresponde al inverso del valor Z, el cual representa el número de grados (°C) necesarios para reducir en un ciclo logarítmico el valor D. Este valor fue de 9,0°C.

Los valores de concentración de la proteína Cry1A(b) inmunorreactiva durante el tratamiento térmico a diferentes tiempos y temperaturas se sometieron a un análisis cinético asumiendo un orden de reacción $n=1,5$. La representación gráfica de la relación $(C_t/C_0)^{1-n}$ frente al tiempo de tratamiento dio lugar a una recta cuya pendiente corresponde a la constante de velocidad de desnaturalización (k) para cada temperatura (Figura 30). Los coeficientes de correlación de las rectas obtenidas para cada temperatura fueron mayores de 0,96, y el punto de corte con el eje de ordenadas a tiempo cero fue de aproximadamente 1 (Tabla 17). Estos resultados indican que el valor $n=1,5$ resulta apropiado para describir el

proceso de desnaturalización a las temperaturas estudiadas, ya que otros órdenes de reacción ensayados ($n=1$ y $n=2$) proporcionaron peores ajustes.

Cuando el logaritmo natural de la constante k se representó frente a la inversa de la temperatura absoluta (Figura 31), se obtuvo una relación lineal en el rango de temperaturas estudiado ($r^2 \geq 0,96$), que permitió calcular el valor de la energía de activación. Dicho valor se calculó a partir de la pendiente de la recta de regresión, y fue de 266,15 kJ/mol (Tabla 17). El alto valor de la energía de activación de la proteína Cry1A(b) indica que durante la desnaturalización tiene lugar la ruptura de un gran número de enlaces.

A partir del valor de la energía de activación, y siguiendo las ecuaciones descritas en el apartado III.2.15.b, se calcularon los parámetros termodinámicos: el incremento de la entalpía de activación (ΔH^\ddagger), de la entropía de activación (ΔS^\ddagger) y de la energía libre de activación (ΔG^\ddagger) (Tabla 17). Para la proteína estudiada, estos parámetros se encuentran dentro del rango habitual para una proteína globular (Sánchez *et al.*, 1992; Wehbi *et al.*, 2005). Los valores obtenidos de entalpía y entropía son prácticamente iguales para todas las temperaturas estudiadas. Sin embargo, los valores de la energía libre de Gibbs se van reduciendo aproximadamente 1 kJ/mol al incrementar 2°C la temperatura de tratamiento.

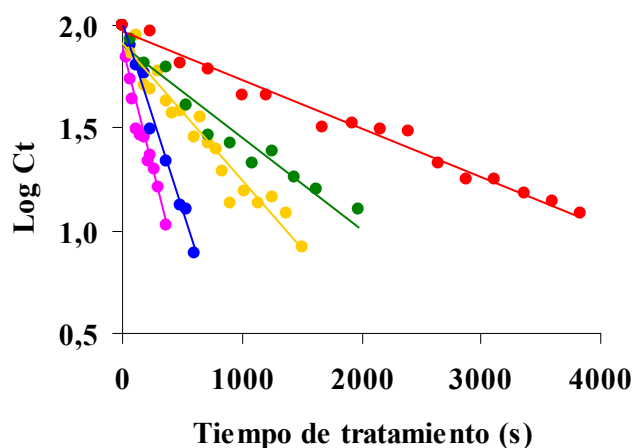


Figura 28: Efecto del tratamiento térmico sobre la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico a diferentes temperaturas (●69°C, ●71°C, ●73°C, ●75°C, ●77°C). C_t es la concentración de proteína inmunorreactiva a cada tiempo de tratamiento expresada como porcentaje de la concentración inicial.

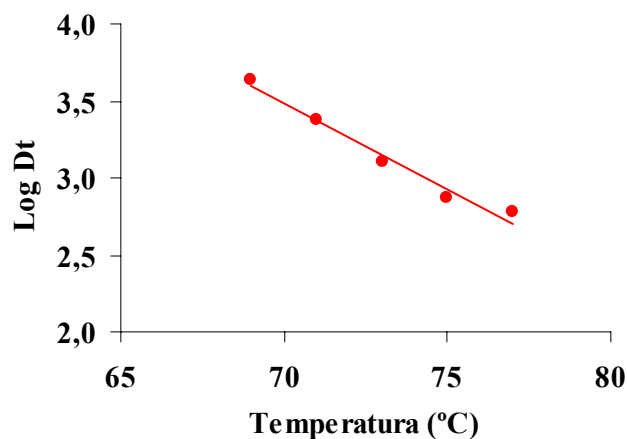


Figura 29: Variación del parámetro D en función de la temperatura (°C) para la pérdida de inmunorreactividad de la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico.

Tabla 16: Valores D y Z para la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico a diferentes temperaturas.

D69 (s)	D71 (s)	D73 (s)	D75 (s)	D77 (s)	Z (°C)
4.338	2.350	1.272	734	601	9,0

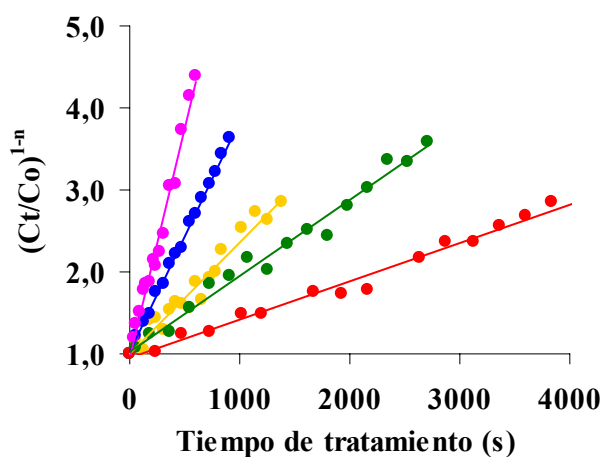


Figura 30: Desnaturalización de la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico frente al tiempo asumiendo un orden de reacción de $n = 1,5$. C_t es la concentración de proteína inmunorreactiva a cada tiempo de tratamiento, y C_0 es la concentración inicial de proteína, ● 69°C, ● 71°C, ● 73°C, ● 75°C, ● 77°C.

Tabla 17: Parámetros cinéticos y termodinámicos de la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico asumiendo un orden de reacción de $n = 1,5$.

T ^a (°C)	k (s ⁻¹ x 10 ⁴)	b	r ²	ΔH [#] (kJ/ mol)	ΔS [#] (kJ /mol)	ΔG [#] (kJ /mol)
69	5,74	0,951	0,982	263,31	0,4698	102,65
71	8,77	1,065	0,985	263,29	0,4697	101,71
73	15,36	1,047	0,961	263,28	0,4697	100,77
75	32,54	0,961	0,968	263,26	0,4696	99,83
77	43,22	0,963	0,979	263,25	0,4696	98,89
E _A =				266,15 kJ/ mol		

Los parámetros mostrados son la constante de la velocidad de desnaturalización (k), la ordenada en el origen (b), el coeficiente de correlación (r²), la energía aparente de activación (E_A), el incremento de la entalpía (ΔH[#]), de la entropía (ΔS[#]), y de la energía libre de activación (ΔG[#]).

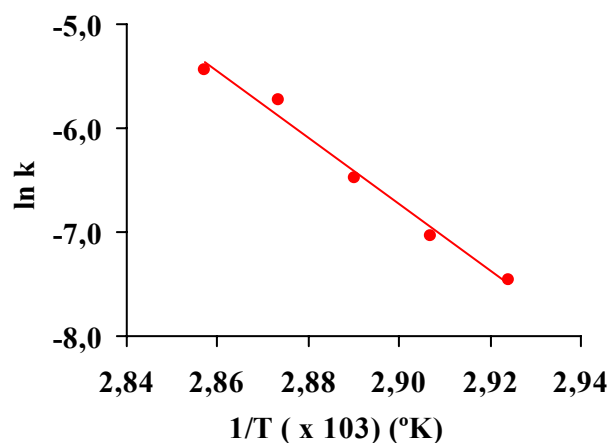


Figura 31: Variación de la constante de velocidad k con el inverso de la temperatura absoluta para el proceso de desnaturalización de la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico para un orden de reacción de $n = 1,5$.

IV.4.4. ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS DEL EFECTO DEL PROCESADO SOBRE LA PROTEÍNA Cry1A(b)

El efecto que el procesado tiene sobre la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) se ha estudiado en este trabajo utilizando las técnicas de ELISA tipo sándwich y de inmunocromatografía desarrolladas. Para ello, se prepararon diferentes productos (maíznixtamalizado, farinetas, tortillas fritas y a la plancha) con maíz transgénico y se determinó la concentración de proteína Cry1A(b) inmunorreactiva a diferentes tiempos de procesado. Todas las muestras de alimentos se analizaron por triplicado en al menos tres experimentos independientes.

La curva de calibración obtenida a partir de los estándares de Cry1A(b) en PBS se ajustó a una ecuación potencial en el rango de 10 ng/mL a 200 ng/mL ($r^2 \geq 0,99$). La elección de una curva potencial en vez de lineal se debió a que se obtuvo un mejor ajuste en el rango de concentración de proteína más bajo, rango en el que se encontraban los alimentos analizados (Figura 32). También se analizaron productos elaborados de forma similar con maíz no transgénico, los cuales dieron valores de absorbancia por debajo del límite de detección establecido. La concentración de la proteína Cry1A(b) determinada en harina de maíz transgénico sin procesar fue de 0,28 µg/g, similar a la concentración descrita para semillas de maíz que contienen el evento MON810 (AGBIOS, 2004). El mínimo porcentaje de maíz transgénico detectado en una mezcla con maíz convencional usando la técnica de ELISA fue del 2%.

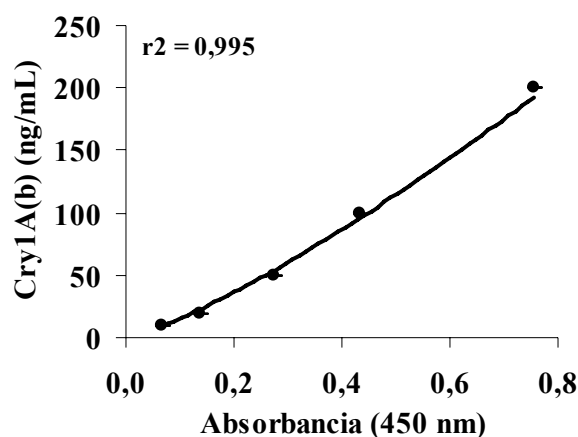


Figura 32: Curva de calibración obtenida para la determinación de la concentración de la proteína Cry1A(b) utilizando una técnica de ELISA tipo sándwich.

El efecto de la nixtamalización en la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) se estudió utilizando dos tratamientos térmicos diferentes a la misma concentración de óxido de calcio. La cantidad de proteína inmunorreactiva determinada en la harina obtenida después de cocinar el grano a 100°C durante 5 minutos y a 85°C durante 60 minutos fue de un 70% y un 40% del valor inicial, respectivamente.

Para la elaboración de las farinetas, se mezcló harina procedente de maíz transgénico y agua, y se calentó en un hornillo mientras se agitaba manualmente. La temperatura de la mezcla se incrementó gradualmente con el tiempo hasta alcanzar 70°C, temperatura a la cual aumentó mucho la viscosidad de la mezcla debido a la gelatinización del almidón. Después, la temperatura se incrementó lentamente y no superó los 82°C tras 10 minutos de

calentamiento. La concentración de proteína Cry1A(b) inmunorreactiva no cambió significativamente hasta que la mezcla alcanzó una temperatura de 75°C, pero disminuyó un 90% tras tres minutos a esa temperatura (Figura 33).

La desnaturalización de la proteína Cry1A(b) también se determinó en tortillas a la plancha y fritas elaboradas con maíz transgénico (Figura 34). La concentración de proteína inmunorreactiva disminuyó hasta el 62 y el 8% del valor inicial en tortillas calentadas en una plancha a 180°C durante 10 y 20 segundos, respectivamente, y no se pudo detectar proteína en tortillas calentadas durante 25 segundos o más. En el caso de las tortillas fritas, la proteína Cry1A(b) se desnaturalizó rápidamente, quedando alrededor de un 65% de proteína inmunorreactiva tras 5 segundos a 190°C, y no se detectó proteína a tiempos más prolongados de tratamiento.

Los resultados obtenidos en el análisis de las tortillas y las farinetas mediante la técnica de inmunocromatografía se muestran en las Tablas 18 y 19, respectivamente. Previamente, se analizaron los mismos alimentos elaboradas con harina de maíz no transgénico, y en todos los casos el resultado obtenido fue negativo. Como puede observarse, se obtuvo un resultado positivo en las muestras de tortilla a la plancha tratadas hasta 20 segundos, en las de tortilla frita tratadas hasta 5 segundos y en las farinetas tratadas hasta 9 minutos. Las muestras tratadas a tiempos más largos dieron un resultado negativo.

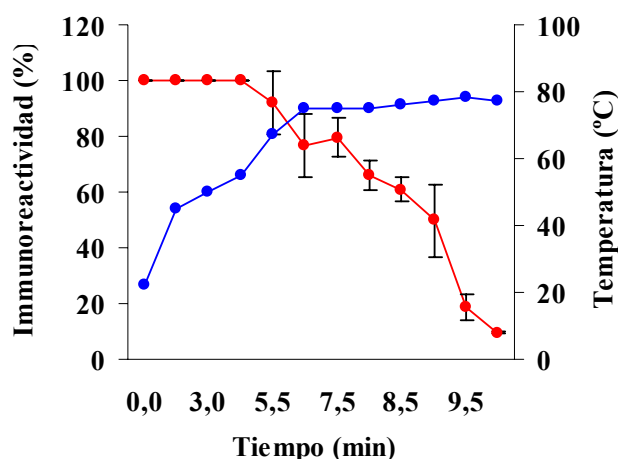


Figura 33: Cambios en la concentración de la proteína Cry1A(b) (●) y en la temperatura durante la preparación de farinetas elaboradas con harina de maíz transgénico. Los valores corresponden a la concentración de proteína inmunorreactiva determinada mediante una técnica de ELISA tipo sándwich, y están expresados como porcentaje de la concentración de proteína en la muestra sin tratar (100%).

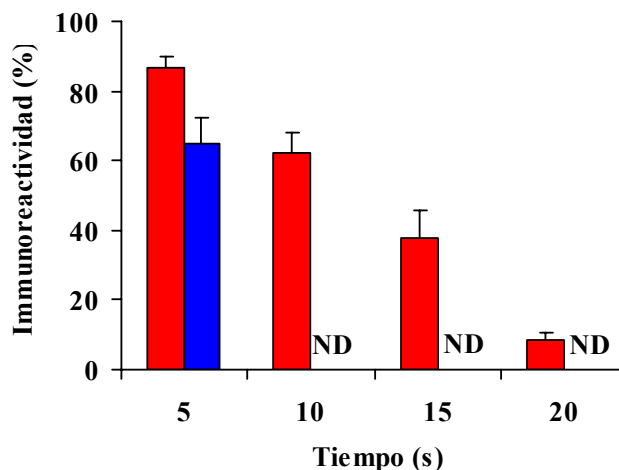


Figura 34: Determinación de la proteína Cry1A(b) en tortillas a la plancha (●) y fritas (●) elaboradas con harina de maíz transgénico, después de un tratamiento durante diferentes tiempos a 180°C y a 190°C, respectivamente. Los valores corresponden a la concentración de proteína inmunorreactiva determinada mediante una técnica de ELISA tipo sándwich, y están expresados como porcentaje de la concentración de proteína en la muestra sin tratar (100%). ND: No detectado.

Tabla 18: Resultados obtenidos en el análisis de tortillas elaboradas con maíz transgénico mediante la técnica de inmunocromatografía basada en la detección de la proteína Cry1A(b). +: resultado positivo, -: resultado negativo.

TIEMPO (segundos)	TORTILLA PLANCHA (180°C)	TORTILLA FRITA (190°C)
5	+	+
10	+	-
15	+	-
20	+	-
25	-	-

Tabla 19: Resultados obtenidos en el análisis de farinetas elaboradas con maíz transgénico mediante la técnica de inmunocromatografía basada en la detección de la proteína Cry1A(b). +: resultado positivo, -: resultado negativo.

TIEMPO (minutos)	TEMPERATURA (°C)	FARINETA
0,0	22,4	+
2,5	45,0	+
3,0	50,0	+
4,0	55,0	+
5,5	67,0	+
7,0	75,0	+
7,5	75,0	+
8,5	81,3	+
9,0	77,3	+
9,5	78,6	-
10,0	77,2	-

IV.4.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIDRÓLISIS CON PEPSINA SOBRE LA PROTEÍNA Cry1A(b)

Para a cabo este estudio, la proteína aislada del maíz transgénico se incubó con pepsina, y se extrajeron muestras a diferentes tiempos de tratamiento. Dichas muestras se analizaron por electroforesis, para ver los fragmentos resultantes de la proteólisis, y posteriormente se realizó un western-blotting para comprobar la reactividad de los fragmentos obtenidos con los antisueros obtenidos frente a la proteína Cry1A(b). Mediante la técnica de electroforesis (Figura 35a y b) se observó que la proteína Cry1A(b) se degrada en los primeros 30 minutos de tratamiento, dando lugar a péptidos de entre 6 y 8 kDa, aunque también se observó una banda muy débil de unos 34 kDa. Sin embargo, los péptidos observados por electroforesis no se pudieron visualizar mediante la técnica de western-blotting al incubarlos con el antisuero anti-proteína Cry1A(b).

Además, se analizó mediante la técnica de espectrometría de masas la proteína sin tratar y la tratada con pepsina durante 30 minutos (Figura 36). En el primer caso, se observaron varios picos de masas moleculares entre 13 y 67 kDa, mientras que, en la muestra tratada, todos los picos observados tenían masas moleculares menores de 8,5 kDa.

La concentración de proteína Cry1A(b) inmunorreactiva a diferentes tiempos de tratamiento se determinó mediante la técnica de ELISA tipo sándwich. Los resultados obtenidos (Figura 37) indican que la pepsina proteoliza la proteína rápidamente, ya que su inmunorreactividad disminuye a un 27% del valor inicial en los primeros 30 minutos de tratamiento, manteniéndose estos niveles tras 4 horas.

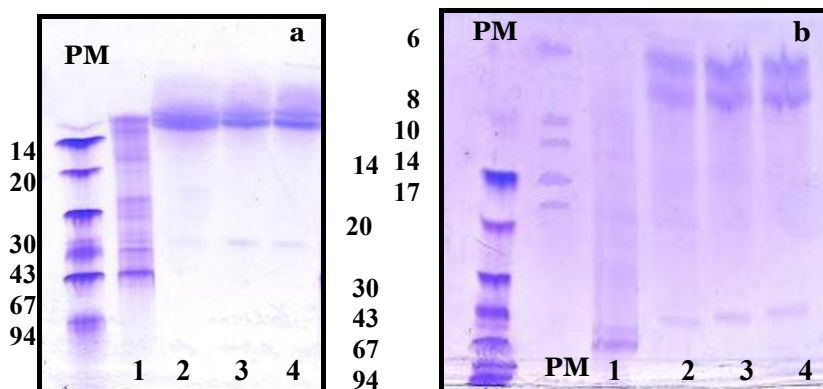


Figura 35: Electroforesis en gel de poliacrilamida de gradiente 8-25% (a) y de alta densidad (b) de la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico sometida a hidrólisis con pepsina a pH 2,0 durante 0 minutos (1), 30 minutos (2), 2 horas (3) y 4 horas (4). PM: patrón de pesos moleculares (kDa).

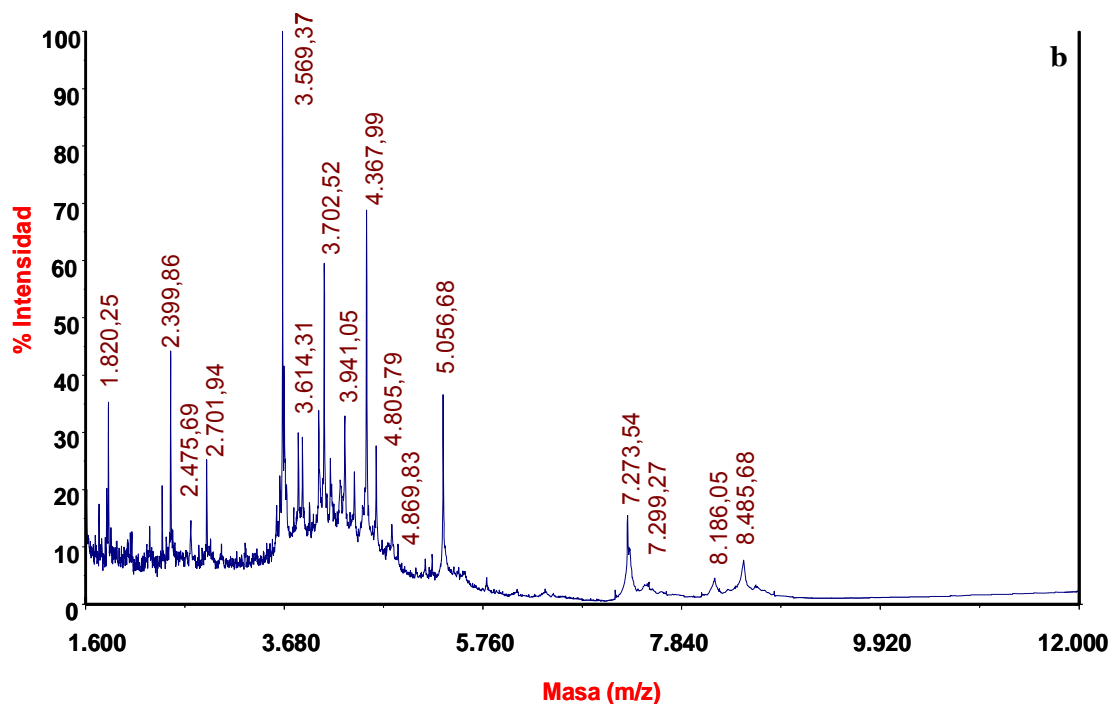
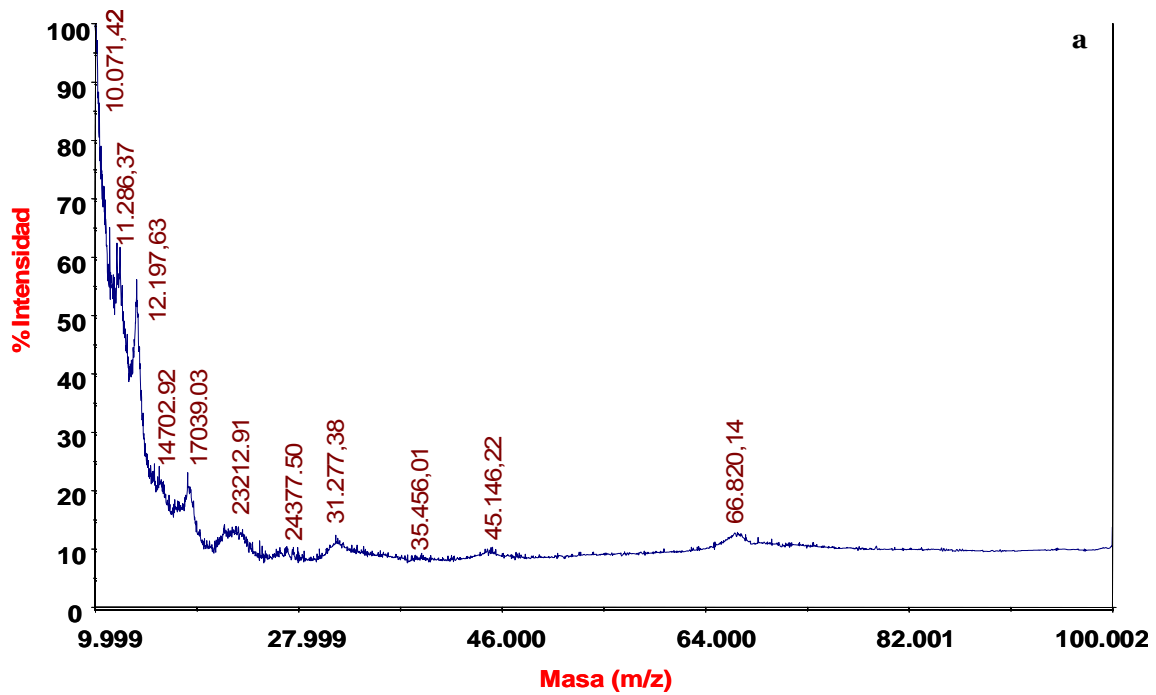


Figura 37: Perfil obtenido por la técnica de espectrometría de masas de la proteína Cry1A(b) sin tratar (a) y tratada con pepsina durante 30 minutos (b).

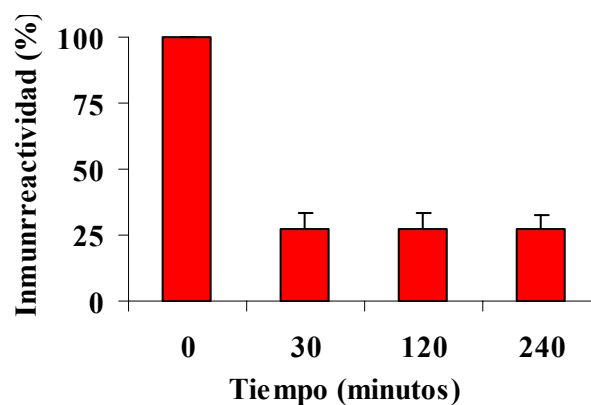


Figura 38: Determinación de la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico, después de un tratamiento con pepsina a pH 2,0 a diferentes tiempos. Los valores corresponden a la concentración de proteína inmunorreactiva determinada mediante una técnica de ELISA tipo sándwich, y están expresados como porcentaje de la concentración de proteína en la muestra sin tratar (100%).

V. Discusión

V. DISCUSIÓN

V.1. ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS DEL EFECTO DEL PROCESADO EN LA β -LACTOGLOBULINA BOVINA Y EL OVOMUCOIDE.

Las proteínas del huevo y de la leche tienen un alto valor nutritivo, debido a su equilibrada composición en aminoácidos y sus buenas propiedades tecnológicas. Por ello, la leche, el huevo, y sus derivados son muy utilizados como ingredientes en la industria alimentaria en la elaboración de muchos alimentos. Sin embargo, las proteínas de la leche y del huevo constituyen una de las principales causas de alergia alimentaria, tanto en niños, con una prevalencia de alrededor del 7-8% en niños menores de dos años (Matsumura *et al.*, 1975; Cant *et al.*, 1985; Zarkadas *et al.*, 1999; Kanny *et al.*, 2001), como en adultos estimándose una prevalencia en este grupo de alrededor del 2% (Bock *et al.*, 1978; Bernhisel-Broadbent *et al.*, 1994; Høst, 1997; Besler *et al.*, 2002).

Hasta el momento, la única manera eficaz de prevenir la aparición de reacciones alérgicas es no consumir el alimento que las causa, por lo que resulta muy importante para un individuo alérgico conocer si un alimento contiene él o los ingredientes frente a los que es sensible, para evitar así su consumo. Con este objetivo, en el año 2003 se publicó una lista de alimentos que pueden producir alergias o intolerancias, entre los que se incluyen la leche, el huevo, y sus derivados, los cuales deben estar correctamente indicados en la etiqueta de todos los productos alimentarios que los contengan (Directiva 2003/89/EC, Real Decreto 2220/2004). A pesar de ello, estos ingredientes alergénicos pueden encontrarse en los

alimentos sin estar indicados en la etiqueta, debido a una contaminación durante el transporte o el procesado.

Las medidas establecidas por los órganos oficiales para proteger al consumidor alérgico deben estar dirigidas a controlar que se cumple la normativa vigente de etiquetado de alérgenos en alimentos. Además, estas medidas deberían ir siempre acompañadas de un plan de prevención de la contaminación de alérgenos a nivel industrial, en el que se establezcan una serie de puntos críticos de riesgo de contaminación, y la forma de evitarlos. Para cumplir este objetivo, tanto el sector industrial como la administración necesitan disponer de técnicas analíticas sensibles y específicas para la detección de alérgenos en alimentos procesados.

Debido a que las alergias alimentarias están causadas por proteínas, las técnicas más usadas para la detección de alimentos alergénicos se basan en la determinación de proteínas contenidas en los mismos, siendo las técnicas inmunoquímicas las de elección, dada su alta sensibilidad y especificidad, así como su rapidez, sencillez y bajo coste. En este trabajo se han desarrollado dos técnicas inmunoquímicas cuantitativas de ELISA en placa (tipo competitivo indirecto y sándwich), y una técnica cualitativa rápida de inmunocromatografía, para la detección de leche y huevo, basadas en la determinación de las proteínas β -lactoglobulina y ovomucoide, respectivamente.

La selección de estas proteínas como indicadoras de la presencia de leche y huevo se ha realizado en base a los siguientes criterios. En primer lugar, se trata de proteínas cuantitativamente importantes, ya que la β -lactoglobulina es la proteína mayoritaria del lactosuero bovino, y el ovomucoide la segunda proteína mayoritaria de la clara del huevo. En segundo lugar, ambas proteínas presentan una alta termorresistencia, como ha sido observado en diferentes trabajos al analizarlas por calorimetría diferencial (Matsuda, 1982; Kella y Kinsella, 1988; Relkin y Launay, 1990; Puyol *et al.*, 1994). Además, la β -lactoglobulina y el ovomucoide son también unas de las proteínas más alergénicas de la leche y del huevo, respectivamente (Poms *et al.*, 2004).

En el caso de la β -lactoglobulina, el límite de detección de la técnica de ELISA tipo sándwich (2 ng/mL) es menor que el de la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (12 ng/mL). Los límites de detección son del orden de los indicados en otros trabajos para la determinación de β -lactoglobulina utilizando la técnica de ELISA en placa (Mariager *et al.*, 1994; Karamonova *et al.*, 2003), y menores que los obtenidos con otras técnicas inmunoquímicas, como el western-blotting (Molina *et al.*, 1998).

Para el ovomucoide, los límites de detección obtenidos en este trabajo para ambos formatos de ELISA son similares, de 23 ng/mL para el formato competitivo y de 19 ng/mL

para el sándwich, y del mismo orden que los indicados en otros trabajos para la detección del ovomucoide utilizando la técnica de ELISA en placa (Hirose *et al.*, 2004; Julià *et al.*, 2007).

Cuando estas técnicas inmunoquímicas van a ser aplicadas en alimentos, hay que considerar que los tratamientos tecnológicos, fundamentalmente los tratamientos térmicos, que se aplican de forma habitual en la industria alimentaria, pueden dar lugar a una desnaturalización y/o agregación de las proteínas seleccionadas como diana, modificando su reactividad con los anticuerpos usados en los inmunoensayos. Por ello, es necesario llevar a cabo estudios para conocer el efecto que tienen los tratamientos tecnológicos sobre las proteínas de la leche y del huevo que se utilizan como diana en las técnicas inmunoquímicas, con el objeto de conocer sus limitaciones cuando van a ser aplicadas en la detección de alérgenos en alimentos procesados (Besler *et al.*, 2001).

En este trabajo se ha estudiado el efecto que tienen los tratamientos térmicos sobre la desnaturalización de la β -lactoglobulina bovina y del ovomucoide. Para ello, cada proteína se calentó en tubos capilares, y la cantidad de proteína inmunorreactiva se determinó utilizando las técnicas de ELISA. En ambas proteínas, se han observado cambios en la inmunorreactividad por efecto del tratamiento térmico, que indican una alteración en su conformación.

En el caso de la β -lactoglobulina, los resultados obtenidos al tratar la proteína pura o la leche han sido muy diferentes dependiendo del formato de ELISA utilizado. Así, al analizar la leche tratada a 80°C por la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto, la cantidad de proteína inmunorreactiva aumentó hasta un 300% en los primeros 5 minutos, disminuyendo después hasta valores del 120% a las dos horas de tratamiento, que se mantuvieron estables tras 3 horas a esa temperatura. Asimismo, en los tratamientos llevados a cabo calentando la leche a diferentes temperaturas durante 10 minutos, la inmunorreactividad de la proteína aumentó a temperaturas superiores a 70°C, alcanzando un máximo a los 80°C, y a temperaturas superiores, la concentración disminuyó, manteniéndose hasta un 20% de su valor inicial a los 95°C. Al tratar la proteína disuelta en tampón en las mismas condiciones, el aumento en la inmunorreactividad de la β -lactoglobulina fue mayor que en la leche, probablemente debido a que en este medio interacciona con otras proteínas, enmascarando algunos epítomos que reaccionan con los anticuerpos.

Sin embargo, al determinar la β -lactoglobulina por la técnica de ELISA de tipo sándwich, la concentración de proteína inmunorreactiva tratada a 80°C disminuyó a lo largo del tiempo, manteniéndose niveles estables del 20% tras una hora de calentamiento. Igualmente, en los tratamientos durante 10 minutos, la cantidad de proteína disminuyó con la

temperatura de tratamiento, manteniéndose alrededor de un 20% después de 10 minutos a 95°C.

En el caso del ovomucoide, la cantidad de proteína inmunorreactiva disminuyó durante el tratamiento térmico de forma similar al determinarla por ambos formatos de ELISA. Así, durante el calentamiento a 90°C, la concentración de ovomucoide disminuyó de forma marcada en los 15 primeros minutos, y más lentamente a tiempos mayores, quedando aproximadamente un 15% de proteína tras 30 minutos de tratamiento. En los tratamientos realizados durante 15 minutos, la disminución de proteína inmunorreactiva fue mayor al aumentar la temperatura, quedando un 25% de proteína tras el tratamiento a 95°C.

La disminución de la inmunorreactividad de la β -lactoglobulina por efecto del tratamiento térmico ha sido observada también por otros autores que determinaron dicha proteína mediante técnicas de inmunodifusión (Lyster, 1970; Levieux, 1980). Así, en el trabajo de Levieux (1980) se obtuvo una disminución en la concentración de β -lactoglobulina de un 60% tras un tratamiento de la leche de 10 minutos a 80°C, y en el realizado por Lyster (1970), de un 45% tras 10 minutos a 78°C.

El hecho de que quede una pequeña cantidad de β -lactoglobulina residual tras los tratamientos térmicos ha sido observado también en otros trabajos. Negroni *et al.* (1998), usando anticuerpos monoclonales que reconocían la forma nativa de la β -lactoglobulina, observaron que alrededor del 20% de la proteína se mantenía tras un tratamiento a 100°C durante 5 minutos. Asimismo, Lyster (1970) observó que, tras 35 minutos a 78°C, se mantenía una inmunorreactividad residual de la β -lactoglobulina del 15%.

La disminución de la inmunorreactividad del ovomucoide por efecto del tratamiento térmico ha sido observada también por otros autores (Matsuda *et al.*, 1982; Gu *et al.*, 1989; Julià *et al.*, 2007). Nuestros resultados son similares a los indicados por Julià *et al.* (2007), quienes, usando una técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto, estimaron que la inmunorreactividad del ovomucoide disminuyó un 90% tras 30 minutos de tratamiento a 90°C. En otros trabajos, se ha observado una menor pérdida de inmunorreactividad del ovomucoide tratado térmicamente. Así, Matsuda *et al.* (1982) indicaron que un tratamiento a 90°C durante 120 minutos disminuyó la inmunorreactividad del ovomucoide un 60%, y Gu *et al.* (1989) observaron que la inmunorreactividad sólo disminuyó un 16% tras 100 minutos a 90°C.

Las diferencias existentes en los resultados obtenidos al estimar la pérdida de inmunorreactividad de la β -lactoglobulina y del ovomucoide en los diferentes trabajos se

pueden deber a las diferentes condiciones de tratamiento, así como a la diferente población de anticuerpos y a las diferentes técnicas empleadas para su cuantificación.

La disminución en la concentración de β -lactoglobulina y ovomucoide por efecto del tratamiento térmico se debe que la desnaturalización de las proteínas da lugar a la destrucción de epítomos conformacionales, dependientes de su estructura, y por tanto, a la pérdida de reactividad de los anticuerpos dirigidos frente a esos epítomos (Lyster, 1970; Levieux, 1980; Mainer, 1997). Por otro lado, la cantidad residual de β -lactoglobulina y ovomucoide que permanece tras tratamientos intensos indica que ambas proteínas mantienen una baja pero significativa inmunorreactividad frente a algunos anticuerpos. Estos anticuerpos reconocen epítomos lineales o secuenciales que no son afectados por el tratamiento térmico, permitiendo así la detección de la proteína parcialmente desnaturalizada (Lyster *et al.*, 1970; Matsuda *et al.*, 1982; Gu *et al.*, 1989; Husband *et al.*, 2001; Julià *et al.*, 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta situación da lugar a una infravaloración en la cuantificación de ambas proteínas tratadas térmicamente cuando se usan estándares de proteína nativa.

Por el contrario, los resultados obtenidos con el formato competitivo para la determinación de β -lactoglobulina están de acuerdo con los descritos por Karamonova *et al.* (2003), quienes, usando un formato similar y anticuerpos policlonales, observaron un marcado incremento en la inmunorreactividad de las variantes A y B de la β -lactoglobulina al calentarlas. En dicho trabajo, se indicó que la cantidad de β -lactoglobulina inmunorreactiva calentada durante 10 minutos aumentaba con la temperatura de tratamiento, alcanzando un máximo a 90°C y 80°C para las variantes A y B, que representaba una concentración de unas 14 y 18 veces mayor, respectivamente, que la proteína sin tratar. A temperaturas superiores, observaron que la concentración de ambas variantes disminuyó hasta alcanzar a 130°C un valor similar al de la proteína sin tratar, y valores menores por encima de esa temperatura (Karamonova *et al.*, 2003).

El aumento o la disminución de la inmunorreactividad de la β -lactoglobulina por efecto del tratamiento térmico según el formato utilizado podría explicarse teniendo en cuenta las siguientes consideraciones. Cuando se inmuniza un animal con una proteína en su estado nativo, la mayor parte de los anticuerpos obtenidos reaccionan con epítomos conformacionales localizados en áreas superficiales de la molécula, y que dependen de su estructura (van Regenmortel, 1992). Por ello, la destrucción de esos epítomos da lugar a una disminución en la inmunorreactividad, como se ha observado en el ovomucoide. Sin embargo, los anticuerpos contenidos en el antisero obtenido en este trabajo frente a la β -lactoglobulina parecen reconocer tanto a la forma nativa como a la desnaturalizada, a pesar de haber sido

obtenidos por inoculación de la forma nativa, como también ha sido observado por otros autores al obtener anticuerpos policlonales o monoclonales frente a la misma proteína (Venien *et al.*, 1997; Negroni *et al.*, 1998; Karamonova *et al.*, 2003). Este comportamiento particular de la β -lactoglobulina parece deberse a que la emulsificación de la β -lactoglobulina con los adyuvantes oleosos usados para la inmunización induce la desnaturalización de la proteína cuando ésta se adsorbe en la interfase aceite-agua, dando lugar a cambios en su conformación previos a la inoculación (Husband *et al.*, 2001).

Por todo lo expuesto, las diferencias en la inmunorreactividad de la β -lactoglobulina por efecto del tratamiento térmico observadas en este trabajo al utilizar los formatos competitivo y sándwich podrían explicarse asumiendo que la población de anticuerpos usados es diferente en cada formato. En el caso de la técnica de tipo competitivo indirecto se utilizó el antisuero directamente, que contiene anticuerpos que reaccionan con la forma nativa y anticuerpos que reaccionan con la forma desnaturalizada de la proteína. Sin embargo, en la técnica de ELISA tipo sándwich, los anticuerpos anti- β -lactoglobulina bovina utilizados se aislaron utilizando un inmunoabsorbente que contenía la proteína nativa insolubilizada, por lo que parece probable que se hayan seleccionado aquellos anticuerpos que reconocen de forma más específica a la proteína en ese estado.

La falta de materiales de referencia para la mayoría de los alérgenos, incluidos la leche y el huevo, hace que no sea posible llevar a cabo una adecuada validación de las técnicas desarrolladas para su determinación. Por ello, el análisis de alimentos modelo que contengan los ingredientes alergénicos, y que sean procesados en condiciones similares a las que se utilizan en la industria alimentaria, permitiría conocer las limitaciones que dichas técnicas tienen cuando van a ser aplicadas en la detección de alérgenos en alimentos procesados. En este trabajo, y con el objeto de evaluar los tests desarrollados, se prepararon tres alimentos modelo, salchicha, pan y paté, que contenían, entre otros ingredientes, leche desnatada y huevo en polvo, y se procesaron en una planta piloto en condiciones de elaboración similares a las usadas en la industria alimentaria. El efecto que los distintos tipos de procesado usados (pasterización, horneado y esterilización) tienen sobre la desnaturalización de la β -lactoglobulina y del ovomucoide se determinó midiendo la cantidad de proteína inmunorreactiva que quedaba en el producto tras su procesado. Para cada proteína, se usaron dos prototipos de test comerciales (competitivo indirecto y sándwich) que habían sido fabricados por Zeu-Inmunotec, siguiendo los protocolos de trabajo que habían sido fijados en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio. Estos prototipos fueron objeto de un ensayo colaborativo realizado por tres laboratorios que fue coordinado por nuestro grupo. Con este estudio se pretendía conocer qué formato de ELISA resultaba más sensible y

específico para detectar la β -lactoglobulina y el ovomucoide, y por tanto, la presencia de leche y huevo, en alimentos complejos procesados.

Antes de realizar el estudio colaborativo, y para conocer la especificidad de los anticuerpos, se analizaron en nuestro laboratorio una serie de ingredientes básicos que no contenían ni leche ni huevo, utilizando los cuatro tests de ELISA. La mayoría de los alimentos dieron unos valores de absorbancia inferiores o superiores a los del blanco (PBS), para los formatos de tipo competitivo o sándwich, respectivamente. Este hecho indica que hay interferencias debido a reacciones inespecíficas de los anticuerpos con otros componentes de los alimentos. Las interferencias fueron mayores, especialmente para algunos ingredientes, a la vez que mostraron una mayor variabilidad, al utilizar los formatos de tipo competitivo que los de sándwich, y sobre todo en el caso de la β -lactoglobulina.

Este hecho podría deberse a que en los tests competitivos las interferencias son producidas al reaccionar de forma inespecífica los componentes de la muestra con los anticuerpos en solución, mientras que en los de tipo sándwich es necesario que la interacción tenga lugar con los anticuerpos fijados a la placa y con los anticuerpos marcados que se añaden en una etapa posterior. Para evitar el problema que produce la existencia de estas interferencias, se determinó un punto de corte o concentración límite de β -lactoglobulina u ovomucoide por encima de la cual una muestra de alimento se consideró como positiva para la adición de leche o huevo. Este valor se calculó como la media de la concentración de los ingredientes básicos más tres veces su desviación estándar. En los ensayos competitivos, este valor fue el doble para el ovomucoide y diez veces mayor para la β -lactoglobulina que el obtenido para los ensayos de tipo sándwich, resultando por tanto estos últimos más específicos.

Al analizar las muestras de los alimentos modelo que no contenían ni leche ni huevo en polvo, todas dieron valores de concentración de β -lactoglobulina u ovomucoide por debajo del límite estimado. Este hecho indica que los puntos de corte establecidos para considerar una muestra como positiva resultaron adecuados en todos los casos para evitar las interferencias producidas por la matriz de los alimentos.

Para las muestras analizadas que contenían leche o huevo en polvo, se observó que el porcentaje de ambos ingredientes necesario para dar un resultado positivo con los dos formatos usados dependía de la intensidad del tratamiento térmico aplicado, siendo mayor para el paté (esterilizado), seguido del pan (horneado) y de la salchicha (pasterizada). Además, para el mismo porcentaje de leche o huevo en polvo añadidos a las muestras consideradas como positivas, las concentraciones de β -lactoglobulina y ovomucoide fueron mayores para la salchicha, seguidas del pan y del paté. Este hecho se debe a que el tratamiento térmico da lugar a la desnaturalización y/o agregación de la β -lactoglobulina y del

ovomucoide, y como consecuencia, a una pérdida de su inmunorreactividad, que es mayor cuanto mayor es la intensidad del tratamiento. Esto también explica que las concentraciones de β -lactoglobulina y ovomucoide determinadas en los alimentos modelo fueran mucho menores que las estimadas a partir de la leche y el huevo en polvo añadidos como ingredientes, sobre todo en el caso de los productos sometidos a un tratamiento más intenso. El hecho de que las recuperaciones hayan sido mayores para el ovomucoide que para la β -lactoglobulina se debe probablemente a su mayor termorresistencia.

Las recuperaciones obtenidas en nuestro trabajo para el ovomucoide en el producto sometido al tratamiento térmico menos intenso, la salchicha, son similares a la obtenidas en otros trabajos en alimentos elaborados con huevo en polvo, como galletas (Watanabe *et al.*, 2005b; Matsuda *et al.*, 2006) y mermelada (Watanabe *et al.*, 2005b). En los productos sometidos a un tratamiento térmico más intenso, las recuperaciones fueron menores que las indicadas en el trabajo de Matsuda *et al.*, (2006) utilizando técnicas de ELISA para la detección de proteínas del lactosuero y de ovoalbúmina, en alimentos modelo como salchichas, preparados cárnicos o mermelada, que variaron entre un 63 y un 89% para la leche, y entre un 67 y un 95% para el huevo.

Al analizar los alimentos modelo que contenían leche con los tests para la determinación de β -lactoglobulina, el ensayo de tipo sándwich resultó tener una mayor sensibilidad que el competitivo, ya que dio un resultado positivo a porcentajes más bajos de leche añadida, del orden de diez veces menor en las muestras de salchicha y de cinco veces menor en las de pan. Para el paté, ambos formatos mostraron una sensibilidad similar, resultando las muestras positivas a una concentración de leche en polvo del 0,25%. Las diferencias en la sensibilidad de los tests podrían deberse en parte a que las interferencias con otros componentes del alimento son mayores en el formato competitivo, dificultando la detección de la β -lactoglobulina cuando se encuentra en una baja concentración.

En el caso de los tests para la determinación de ovomucoide, ambos formatos mostraron una sensibilidad similar en las muestras de salchicha y de pan, dando un resultado positivo a porcentajes de huevo añadido de 0,005 y 0,05%, respectivamente. Sin embargo, para las muestras de paté, sólo con el ensayo competitivo se pudo detectar el ovomucoide, a concentraciones de huevo añadido del 0,25% o superiores, mientras que no se detectó con el ELISA de tipo sándwich, a pesar de que en este ensayo se probaron diferentes condiciones de extracción, como la utilización de hexano para eliminar la grasa, y tampones con agentes desnaturalizantes como SDS.

Los porcentajes de huevo en polvo detectados en nuestro trabajo son similares a los indicados por Leduc *et al.* (1999) mediante un ELISA competitivo, que fueron de 0,03% en

productos cárnicos crudos y pasterizados (70°C, 2 horas), y de 0,125% en los esterilizados (115°C, 90 minutos). En el trabajo realizado por Matsuda *et al.*, (2006), se detectó la adición de una cantidad de 0,001% de leche y huevo en todos los productos, a pesar de estar sometidos a distintos tipos de procesado. Este porcentaje es similar al obtenido en nuestro trabajo en el producto pasterizado (salchicha), pero menor que el detectado en el producto horneado (pan), y el esterilizado (paté). Estas diferencias se pueden atribuir a que los productos elaborados en el trabajo de Matsuda *et al.* (2006) habían sido sometidos a tratamientos térmicos menos intensos que los aplicados en nuestro trabajo.

Por otra parte, hay que destacar que la concentración de β -lactoglobulina y ovomucoide estimada en los productos que dieron un resultado positivo fue mayor en el formato competitivo que en el sándwich, a pesar de que los extractos de alimentos analizados fueron los mismos en todos los tests. Estas diferencias se pueden atribuir a la diferentes población de anticuerpos utilizados y a las características intrínsecas de cada formato (Yeung, 2006).

Diferentes estudios han mostrado que los resultados cuantitativos obtenidos al usar diferentes tests inmunoquímicos pueden variar ampliamente. En el trabajo de Matsuda *et al.* (2006), compararon dos tests de ELISA para determinar proteínas de huevo y dos tests para determinar proteínas lácteas en alimentos procesados, y encontraron diferencias en la concentración media para una misma muestra de hasta el 127% y el 198%, respectivamente. En un estudio de validación interlaboratorial de cinco tests comerciales para la determinación de cacahuete en alimentos, la variación en la concentración obtenida en las mismas muestras entre los diferentes tests varió entre el 44% y el 191% para las diferentes concentraciones (Poms *et al.*, 2005).

Por otra parte, los coeficientes de variación obtenidos para un mismo test en el estudio colaborativo, al analizar las muestras de salchicha y de pan, fueron en la mayor parte de los casos mayores cuando se usaron los formatos de tipo competitivo que los de sándwich. Esta mayor variabilidad puede atribuirse a las diferentes pendientes de las curvas de calibración obtenidas en cada formato, que fueron mayores en el caso del ELISA de tipo competitivo. Así, para una pequeña variación en los valores de absorbancia, la variación en los valores de concentración es mayor en el formato competitivo que en el sándwich. Para las muestras de paté, los coeficientes de variación fueron muy altos en todas las muestras, debido posiblemente a interferencias con la matriz, producidas por el alto contenido en grasa de este producto. Esta variabilidad podría explicar las diferencias en los porcentajes de leche en polvo detectados en el estudio colaborativo y el realizado previamente en nuestro laboratorio con este producto.

En un estudio interlaboratorial llevado a cabo por Poms *et al.* (2005) para la

determinación de proteínas de cacahuete añadidas a muestras de galleta a niveles de 2,5, 5 y 10 ppm, los valores de reproducibilidad descritos, expresados como la desviación estándar interlaboratorial relativa (RSD_R) fueron de 127,0%, 73,6% y 58,2%, respectivamente, para el mismo test de ELISA. Sánchez *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio interlaboratorial para validar un test ELISA para determinar proteínas de soja en muestras de leche, y encontraron valores de RSD_R entre 14,0 y 74,5 %. En el estudio llevado a cabo por Matsuda *et al.* (2006) para la detección de proteínas de leche y huevo en alimentos procesados, los valores de RSD_R para los dos tests de ELISA usados fueron muy bajas, menores de 17% en todas las muestras analizadas.

En los últimos años, la técnica de inmunocromatografía se está implantando ampliamente a nivel comercial en el ámbito alimentario, de manera que la mayoría de las empresas que comercializan tests inmunoquímicos la han incorporado ya en sus catálogos para la detección, en agua y en alimentos, de plaguicidas, micotoxinas, bacterias y sus toxinas, etc. El éxito alcanzado por esta técnica se debe fundamentalmente a su rapidez y sencillez, que unidos a su alta sensibilidad la hacen ideal como técnica de cribado en los laboratorios de control de calidad, como control de contaminación o verificación de limpieza *in situ* durante la producción, o incluso para ser usada a nivel casero (home test) (Van Herwijnen, 2006).

El límite de detección de la técnica de inmunocromatografía desarrollada en este trabajo para la detección de β -lactoglobulina es más alto que el obtenido para las técnicas de ELISA en placa. En el análisis de los alimentos modelo utilizando este test se detectó la adición de leche en polvo a porcentajes de 0,05%, 0,5% y 1%, en las muestras de salchicha, pan y paté, respectivamente. Estos porcentajes fueron entre 2 y 5 veces mayores que los detectados con la técnica de ELISA de tipo competitivo, y entre 10 y 20 veces mayores que los detectados con la de tipo sándwich.

Para el ovomucoide, el límite de sensibilidad de la inmunocromatografía fue ligeramente más alto que el obtenido por las técnicas de ELISA. En el análisis de los alimentos modelo, se detectó la adición de huevo en polvo a porcentajes de 0,01%, 0,05% y 0,5%, en las muestras de salchicha, pan y paté. El porcentaje detectado en el pan coincidió con el detectado por las técnicas de ELISA, y fue dos veces menor que el detectado en las muestras de salchicha y paté usando el ELISA de tipo competitivo.

Hasta la fecha, sólo se han encontrado dos artículos de investigación en los que se hayan desarrollado tests de inmunocromatografía para la detección de alérgenos alimentarios, y ambos están diseñados para la detección de cacahuete (Wen *et al.*, 2005; van Hengel *et al.*, 2006). Al comenzar este estudio, estaba disponible a nivel comercial un test para la detección

de huevo (Tabla 2), concretamente de las proteínas de la clara del huevo, y dos tests para la detección de leche, concretamente de caseína y de leche (Tabla 1). Los dos tests de inmunocromatografía desarrollados en este trabajo han sido objeto de una patente por parte de la Universidad de Zaragoza, y la empresa Zeu-Inmunotec los tiene ya disponibles a nivel comercial.

En estudios realizados con individuos alérgicos a la leche o al huevo, se ha indicado que es muy difícil establecer la dosis de un determinado alimento que da lugar a una reacción alérgica, dada la gran variabilidad que existe en la sensibilidad de los diferentes individuos. A pesar de ello, se ha indicado que la sensibilidad de los tests de detección de alérgenos debería estar comprendida entre 1 y 10 ppm de las proteínas diana seleccionadas (Poms *et al.*, 2004). Por lo tanto, y teniendo en cuenta que no existe un límite establecido por la legislación, ni unas muestras de referencia para realizar una comparación, los tests desarrollados en este trabajo tendrían la sensibilidad suficiente para detectar, en alimentos procesados, la cantidad de leche o huevo necesaria para proteger a la mayoría de las personas sensibilizadas a esos alimentos. Sin embargo, dado que pueden existir personas con una elevada sensibilidad a la leche o al huevo, la ausencia total de riesgo en esos casos sería imposible de asegurar.

Por otra parte, con el objeto de comprobar si se cumple la legislación de etiquetado de alérgenos, en este trabajo se analizaron diversos alimentos comerciales en los que se indicaba o no la presencia de leche, huevo, o sus derivados en la etiqueta, utilizando los tests de ELISA desarrollados.

El porcentaje de productos comerciales que ha dado un resultado positivo con los tests para la detección de β -lactoglobulina, sin declarar la presencia de leche o derivados en su etiqueta, ha sido del 14%. Este porcentaje es mayor que el indicado por el Standing Committee for Food Stuffs of the European Commission (1997), al analizar 838 muestras “sin leche”, provenientes de 6 países de la Unión Europea, que fue del 2,3%. Sin embargo, Hefle y Lambrecht (2004), al analizar alimentos en los que no se declaraba la presencia de leche, encontraron que todas las muestras de chocolate negro, y el 12% de las 27 muestras de sorbetes, zumos de frutas y refrescos analizadas contenían caseína. La presencia de proteínas lácteas sin declarar en los alimentos puede deberse a una contaminación entre líneas durante el procesado, a una incorrecta limpieza de los equipos compartidos, e incluso a la adición de ingredientes lácteos intencionadamente, sin haberlos declarado en la etiqueta.

En el caso de los 39 productos comerciales analizados en cuya etiqueta no se indicaba la presencia de huevo o sus derivados, ninguna de las muestras dio una concentración de ovomucoide por encima del punto de corte establecido en los tests, al igual que se ha indicado en otros trabajos en los que se ha determinado la presencia de proteínas de la clara en

diferentes productos procesados como pasta, salsas, productos cárnicos, galletas y pan (Yeung *et al.*, 2000; Baumgartner *et al.*, 2002; Immer *et al.*, 2003). En cambio, Hefle *et al.* (2001) detectaron la presencia de proteínas de huevo en el 55% de las 22 muestras de pasta analizadas que no contenían huevo según la etiqueta, hecho que se debe probablemente a que han sido fabricados en la misma línea de producción que la pasta con huevo, sin una adecuada limpieza entre ambas producciones.

Por otra parte, algunas de las muestras que incluían como ingrediente leche, huevo, o sus derivados en la etiqueta, o trazas de estos, dieron un resultado negativo al utilizar los tests para la detección de β -lactoglobulina y ovomucoide. Estos resultados pueden deberse a que se han añadido fracciones que no contienen dichas proteínas, como lactosa, la fracción caseína de la leche o la yema del huevo, o a que la cantidad añadida es tan baja, o la desnaturalización debida al tratamiento térmico tan fuerte, que no puede ser detectada por los tests utilizados. Además, puede deberse incluso a que se haya producido un cambio en la formulación sin que se hayan cambiado las etiquetas.

Es de destacar que, para el consumidor alérgico, lo más importante es que en la etiqueta de los alimentos se indique la presencia de los ingredientes frente a los que es sensible, para así evitar su consumo. Sin embargo, es también importante que lo declarado en la etiqueta refleje la formulación utilizada, ya que, si no, se restringe la gama de productos para el consumidor alérgico. Asimismo, es importante no abusar del etiquetado preventivo indicando la presencia de “trazas” o “puede contener”, ya que su uso indiscriminado supone también una restricción en la elección de productos para esta población. Por ello, este etiquetado preventivo sólo debería usarse como último recurso cuando, debido a las características del proceso de fabricación, y a pesar de seguir unas buenas prácticas de fabricación y haber realizado una correcta evaluación del riesgo, no se pueda garantizar la ausencia de los componentes alergénicos (Deibel *et al.*, 1997).

V.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y LA PROTEOLISIS SOBRE LA PROTEÍNA Cry1A(b) DE MAÍZ TRANSGÉNICO

El cultivo de vegetales transgénicos resistentes a insectos ha aumentado mucho en los últimos años, representando aproximadamente el 18% (20,3 millones de hectáreas) de todos los cultivos transgénicos en 2007, de los cuales aproximadamente el 60% correspondió al maíz (James, 2007). El maíz transgénico resistente a lepidópteros, que tiene insertado el gen

que codifica la proteína Cry1A(b), fue el primero que se aprobó en la Unión Europea, el 22 de Abril de 1998 (Decisión de la Comisión 98/294/CE). Posteriormente, se han introducido otros genes que codifican proteínas de la misma familia. Actualmente, cuatro de las seis variedades de maíz aprobadas en la Unión Europea contienen el gen que codifica la proteína Cry1A(b) (http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_print_en.efm).

En los últimos años se ha cuestionado la utilización de vegetales transgénicos desde algunos sectores de la sociedad, acusándolos de representar un peligro para el medio ambiente o para la salud de los consumidores. Una de las principales causas de desconfianza al consumo de alimentos transgénicos es que las nuevas proteínas expresadas puedan dar lugar a alergias (Lack, 2002). Sin embargo, el consumo en algunos países de vegetales transgénicos desde más de una década, sin que se hayan indicado casos de alergia, hace que no parezca probable su aparición. Además, antes de comercializar un alimento transgénico, éste es sometido a procesos de evaluación individual de riesgos en lo que afecta a la seguridad de los consumidores (EFSA, 2004). Las estrategias para determinar la potencial alergenicidad de un alimento transgénico incluyen comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada con la de las proteínas con potencial alergénico conocidas, además de estudiar el historial de utilización de dicha proteína, y determinar su reactividad con IgE de individuos con alergia conocida a la fuente de origen del gen (FAO/WHO, 2001; Kleter y Kuiper, 2002; García *et al.*, 2003). Además, dado que la mayoría de las proteínas alergénicas muestran una alta resistencia a los tratamientos tecnológicos usados habitualmente en la industria alimentaria, así como una alta resistencia a la degradación por las proteasas digestivas, estos estudios deben incluirse también a la hora de determinar la potencial alergenicidad de las nuevas proteínas expresadas en los cultivos transgénicos destinados a la alimentación humana.

El rechazo del consumo de alimentos transgénicos por parte de un sector de la población, con argumentos medio ambientales o sanitarios, se ha manifestado en peticiones a los gobiernos de mayores medidas reguladoras, que han dado lugar al desarrollo en la Unión Europea de una normativa que obliga declarar en la etiqueta la presencia de OGMs en los alimentos. Este etiquetado trata de dar a los consumidores la información necesaria para que puedan seleccionar los alimentos que van a consumir (Ahmed, 2002).

La necesidad de controlar que se cumple la normativa sobre el etiquetado de alimentos transgénicos impuesta por la legislación europea ha dado lugar a que, en los últimos años, se hayan desarrollado métodos analíticos para la detección de las proteínas recombinantes. La detección de estas proteínas se ha llevado a cabo fundamentalmente mediante técnicas inmunoquímicas, como la técnica de ELISA en placa y la de inmunocromatografía (Anklam *et*

al., 2002; Stave, 2002). Los resultados han mostrado que estas técnicas son específicas y tienen la sensibilidad adecuada para determinar la presencia de transgénicos a los niveles establecidos por la legislación cuando se analizan muestras de grano y harina (Walschus *et al.*, 2002; Roda *et al.*, 2006). Sin embargo, existen pocos estudios hasta el momento acerca del efecto que el procesado de los alimentos tiene en la desnaturalización de las nuevas proteínas contenidas en los alimentos transgénicos. Estos estudios permitirían conocer cómo afecta dicho procesado al reconocimiento de dichas proteínas por parte de los anticuerpos usados en los ensayos.

En este trabajo se ha estudiado el efecto que los tratamientos térmicos y el procesado de los alimentos, así como el efecto que la pepsina tienen sobre la proteína Cry1A(b) expresada en el maíz transgénico. Este estudio se ha llevado a cabo fundamentalmente determinando la pérdida de reactividad de la proteína Cry1A(b) con sus anticuerpos específicos utilizando técnicas inmunoquímicas.

Los límites de detección obtenidos en este trabajo para la técnica de ELISA y la de inmunocromatografía desarrolladas, de 7,4 y 10 ng/mL, respectivamente, son muy similares. Estos límites son del mismo orden a los indicados en otros trabajos para la detección de proteínas Cry utilizando técnicas de ELISA (Vázquez *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 2002), y superiores a los obtenidos en inmunoensayos en los que usaron anticuerpos monoclonales (Walschus *et al.*, 2002), inmunofluorescencia (Roda *et al.*, 2006), o inmunosensores (Volpe *et al.*, 2006). La mínima fracción de maíz transgénico detectada en una mezcla con maíz convencional mediante estas técnicas fue del 2%, valor que está por encima del obtenido en otros trabajos usando técnicas inmunoquímicas (Walschus *et al.*, 2002; Ermolli *et al.*, 2006b; Roda *et al.*, 2006; Fantozzi *et al.*, 2007), y del que marca la legislación. No obstante, dada la finalidad de nuestro estudio, la sensibilidad obtenida se consideró adecuada para realizar los estudios de termorresistencia y resistencia a la proteólisis de la proteína Cry1A(b).

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de los tratamientos térmicos sobre la proteína Cry1A(b) indican que se trata de una proteína termosensible, ya que sólo se necesitan tratamientos de 2 minutos a 75°C y a 77°C para desnaturalizar un 50% y un 70% de la proteína, respectivamente. El alto valor de la energía de activación obtenido para la proteína Cry1A(b) (266,15 kJ/mol) indica que se rompen un gran número de enlaces de baja energía durante su desnaturalización.

Además, los altos valores del incremento de la entalpía de activación obtenidos para la proteína Cry1A(b), de aproximadamente 263 kJ/mol, indican que esta proteína sufre un considerable cambio en su conformación durante su desnaturalización (Sánchez *et al.*, 1992;

Anema y McKenna, 1996; Wehbi *et al.*, 2005). Los valores positivos hallados para la variación de la entropía de activación indican que no hay un proceso de agregación significativo, ya que si esto ocurriera los valores de la entropía serían negativos. Por lo tanto, estos valores son característicos de una reacción en la que la desnaturalización de la proteína predomina sobre la agregación durante el calentamiento de la misma. Se observó que la energía libre de activación disminuyó ligeramente, conforme aumentaba la temperatura, como ha sido descrito también para la desnaturalización de otras proteínas globulares (Dannenbergh y Kessler, 1988; Sánchez *et al.*, 1992; Domínguez *et al.*, 2001; Wehbi *et al.*, 2005).

Hasta la fecha, sólo existe un trabajo en el que se han determinado los parámetros termodinámicos de desnaturalización de una proteína de la familia Cry, concretamente de la proteína Cry3A. Mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido, Potekhin *et al.* (1999) estudiaron la desnaturalización térmica de la δ -endotoxina Cry3A de *Bacillus thuringiensis var. tenebrosus* y su fragmento activo de 55 kDa obtenido por hidrólisis con tripsina. A pH 3,0, la temperatura del pico máximo de dicho fragmento fue de 70,3°C, la entalpía de 832 kJ/mol y la energía de activación de 468 kJ/mol.

Perferoen (1998) estudió el efecto del tratamiento térmico en la actividad insecticida de la proteína Cry9C, expresada en maíz, y de la proteína Cry1A(b) de *Bacillus thuringiensis* expresada en *E.coli*, y encontró considerables diferencias entre ellas. No se observó un descenso en la actividad insecticida de la proteína Cry9C tras un tratamiento de 90°C durante 10 minutos, mientras que la proteína Cry1A(b) perdió completamente su actividad tras un tratamiento de 10 minutos a 80°C. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Perferoen, ya que aproximadamente el 90% de la proteína Cry1A(b) se desnaturaliza tras un tratamiento a 77°C durante 10 minutos ($D_{77} = 601$ s). Estos resultados indican que la pérdida de estructura de la proteína Cry1A(b) es paralela a la pérdida de la actividad insecticida.

Existen diferentes inmunoensayos, basados en la determinación de la proteína Cry1A(b), que se han usado para determinar la presencia de vegetales transgénicos, como soja y maíz. Estas técnicas tienen una sensibilidad suficiente cuando se analizan materiales sin procesar, como grano y harina (Walschus *et al.*, 2002; Ermolli *et al.*, 2006b; Roda *et al.*, 2006; Fantozzi *et al.*, 2007). Sin embargo, la baja termorresistencia de la proteína Cry1A(b) observada en este trabajo podría limitar la utilidad de este tipo de ensayos cuando se van a analizar alimentos procesados (Terry *et al.*, 2002).

El estudio de termorresistencia de la proteína Cry1A(b) realizado en este trabajo se llevó a cabo utilizando un extracto de hojas, y no del grano de maíz transgénico, debido a la mayor concentración de proteína Cry1A(b) presente en las hojas, y a que viscosidad de las

soluciones de harina hacían difícil su manejo, al coagular en los capilares donde se trataba térmicamente. Sin embargo, el estudio del efecto del procesado sobre la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) se ha realizado utilizando alimentos modelo elaborados con harina de maíz transgénico en condiciones similares a las que se usan en la industria alimentaria.

La nixtamalización es un método muy común en la preparación de maíz para hacer masa y tortillas en México, América Central y EE.UU. (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 2000; Bressani *et al.*, 2004). Este proceso consiste en calentar los granos de maíz en una solución de óxido de calcio. Los beneficios de la nixtamalización son una mejor calidad proteica y una mayor disponibilidad de niacina y lisina, además de un incremento en el contenido de calcio en la harina obtenida (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos en este trabajo para el maíz nixtamalizado indican que la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) es mayor cuando se trata la proteína a 85°C durante 60 minutos que a 100°C durante 5 minutos. Estos resultados sugieren que el tiempo de tratamiento tiene un efecto más marcado que la temperatura sobre la desnaturalización de la proteína Cry1A(b), debido probablemente a la penetración lenta del calor en el grano, como resultado del efecto protector del pericarpio. Debido a que el tratamiento de nixtamalización afecta al reconocimiento de la proteína Cry1A(b) por parte de los anticuerpos específicos, tanto las tortillas como las farinetas se elaboraron con harina de maíz procedente de granos que no habían sido sometidos a un proceso de nixtamalización.

Al comparar los resultados obtenidos durante la elaboración de las farinetas con los obtenidos al calentar el extracto de hojas, se observa que la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) es más rápida para la proteína tratada en la harina de maíz, debido probablemente a la agregación de la proteína Cry1A(b) con otras proteínas, lo cual enmascara epítomos que son reconocidos por los anticuerpos. Así, al tratar el extracto de hojas a 77°C, se necesitan 10 minutos para desnaturalizar el 90% de la proteína, mientras que en la harina, se obtuvo la misma disminución tras tres minutos a esa temperatura. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Van den Bulcke *et al.* (2007), quienes, utilizando un test comercial de inmunocromatografía, indicaron que la proteína Cry1A(b) se detectó después de tratar la harina durante 1 hora a 55°C, pero no tras un tratamiento a 80°C durante el mismo tiempo.

La desnaturalización de la proteína Cry1A(b) en las tortillas fue mucho más rápida que en las farinetas, debido a las altas temperaturas usadas en su preparación. El hecho de que la desnaturalización fuera mucho más rápida en las tortillas fritas, en comparación con las

tratadas a la plancha, a pesar de que la diferencia de temperatura fue de sólo 10°C, podría deberse a que el aceite favorece la penetración del calor en el producto durante la fritura.

Los resultados obtenidos al analizar los alimentos modelo mediante la técnica de inmunocromatografía fueron similares a los obtenidos con la técnica de ELISA tipo sándwich, salvo en el caso de los dos tiempos de tratamiento más prolongado de las farinetas que dieron un resultado negativo sólo por la técnica de inmunocromatografía.

Existen muy pocos trabajos acerca de la determinación de proteínas Cry mediante inmunoensayos (Díaz *et al.*, 2002; Margarit *et al.*, 2006) o PCR (Hupfer *et al.*, 1998; Lipp *et al.*, 2001) en productos procesados. Los resultados obtenidos por Lipp *et al.* (2001) mediante la técnica de PCR, basada en la detección del fragmento promotor 35s, mostraron que la técnica era adecuada para detectar maíz transgénico que había sufrido un tratamiento térmico severo, de 100°C durante 45 minutos y de 180°C durante 10 minutos. Un resultado similar fue observado por Hupfer *et al.* (1998), basados en la detección del fragmento promotor Cry03/04 en muestras de polenta, ya que éste fue detectado tras 105 minutos de calentamiento a 100°C.

Sin embargo, los resultados obtenidos en otros trabajos indican que las técnicas de PCR o inmunoquímicas pueden detectar el maíz transgénico en alimentos poco procesados, tales como polenta precocinado y piensos, mientras que no es posible detectarlo en alimentos altamente procesados, tales como tortillas o copos de maíz (Hurst *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2002; Greiner *et al.*, 2005; Margarit *et al.*, 2006; Van den Bulcke *et al.*, 2007).

Margarit *et al.* (2006) determinaron la proteína Cry1A(b) mediante una técnica de ELISA comercial, y el gen Cry1A(b) mediante una técnica de PCR en diferentes alimentos comerciales y piensos para alimentación animal. La presencia del gen Cry1A(b) se detectó en productos crudos o poco procesados, como piensos o polenta sin cocinar o precocinada. Sin embargo, no se pudo amplificar ni el gen de la Cry1A(b) ni el gen que codifica la zeína del maíz en el DNA aislado de productos muy procesados, como copos y sirope de maíz, debido probablemente a la presencia de inhibidores y a la poca cantidad de DNA presente tras el procesado. Excepto en un pienso, la proteína Cry1A(b) se detectó en todos los productos que dieron un resultado positivo por PCR, y no se detectó en los que dieron un resultado negativo por dicha técnica. La concentración de la proteína Cry1A(b) en los productos que dieron un resultado positivo fue muy baja en todos los casos, menor de 0,1 µg/g.

Díaz *et al.* (2002) determinaron la concentración de la proteína Cry9C en alimentos procesados elaborados con harina de maíz StarLink. Los autores indicaron que la cantidad de proteína Cry9C inmunorreactiva que quedaba en muestras de pan de maíz, muffins y polenta

fue de un 13%, 5% y 3% de la proteína presente en el grano, respectivamente. La proteína Cry1A(b) se detectó en 7 de las 10 muestras de alimentos muy procesados, como tortillas, puffs o copos de maíz, pero el porcentaje de proteína inmunorreactiva fue menor del 0,2%, a pesar de que esta proteína es más termorresistente que la proteína Cry1A(b) (Perferoen, 1998).

Es importante señalar que el proceso de elaboración típico de las farinetas conlleva el calentamiento de la harina de maíz en agua hirviendo durante 10 ó 15 minutos (Lee *et al.*, 2008), el procesado de tortillas a la plancha un tratamiento a 240°C durante 30 segundos por cada cara (Martínez-Bustos *et al.*, 2001) y el de tortillas fritas, un tratamiento a 190°C durante 60 segundos (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 2000). Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que el alto grado de desnaturalización sufrido por la proteína Cry1A(b) durante el procesado no permitiría su detección en los productos finales al usar técnicas inmunoquímicas.

El Reglamento 1829/2003/EC sobre etiquetado de alimentos y piensos transgénicos indica que todos los alimentos y piensos que contengan, estén compuestos o se hayan producido a partir de OGMs aprobados, en cantidades mayores de 0,9%, deben estar indicados en la etiqueta. El Reglamento exige también que se etiqueten los alimentos que contienen ingredientes libres de DNA o proteínas, como los aceites vegetales refinados o los jarabes de glucosa, producidos a partir de OGMs. Por ello, dada la baja concentración de proteína Cry1A(b) que se expresa en el maíz transgénico, y la baja termorresistencia de dicha proteína, el etiquetado de alimentos que contienen maíz transgénico debería realizarse en base a los resultados obtenidos en el análisis de los ingredientes utilizados para su elaboración, y con el seguimiento de los mismos mediante un adecuado sistema de trazabilidad.

Por otra parte, en este trabajo se ha estudiado el efecto que tiene la incubación con pepsina sobre la proteína Cry1A(b). Nuestro estudio se ha centrado únicamente en la utilización de este enzima, debido a que la proteína que se expresa en el maíz MON810 es la forma activa de la toxina, que es el núcleo de ésta resistente a la tripsina (Huber y Lüthy, 1981; Lee *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo este estudio, fue necesario aislar previamente la proteína Cry1A(b) expresada en el maíz transgénico. El aislamiento se realizó a partir de un extracto de hojas, por ser ésta, como se ha indicado anteriormente, la parte de la planta que contiene una mayor concentración de proteína Cry1A(b), unos 9,35 µg/g en la hoja fresca, frente a los 0,31

µg/g del grano (AGBIOS, 2004). La proteína se aisló por inmunoadsorción utilizando una columna que contenía anticuerpos anti-proteína Cry1A(b).

En la electroforesis de la proteína aislada por inmunoadsorción, además de la banda de 70 kDa, que corresponde al peso molecular de la proteína Cry1A(b) (Lee *et al.*, 1995), se observaron otras bandas de menor tamaño, que reaccionaban con los anticuerpos anti-proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis*. Los resultados obtenidos al analizar los fragmentos correspondientes a las bandas mayoritarias obtenidas en la electroforesis mediante la técnica de identificación de proteínas por huella peptídica por espectrometría de masas (MALDI-TOFF), indicaron un alto grado de homología con la proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis*. Por otra parte, la elevada reactividad cruzada (95%) observada entre la fracción aislada y la proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis* indicó que existe una identidad inmunológica entre ellas. Estos resultados indican que las bandas observadas por electroforesis en la fracción aislada corresponden a fragmentos de la proteína Cry1A(b), que son producidos por la acción de las proteasas endógenas del maíz. La presencia de varios fragmentos ha sido también observada por electroforesis y western-blotting en otros trabajos al analizar la proteína Cry1A(b) aislada de hojas de maíz transgénico (Lee *et al.*, 1995; AGBIOS, 2004; Batista *et al.*, 2005). Así, la proteína Cry1A(b), tal y como se aisló por inmunoadsorción se usó para llevar a cabo el estudio de proteólisis con pepsina.

Los resultados obtenidos al analizar por la técnica de ELISA tipo sándwich las muestras extraídas a lo largo de la incubación de la proteína Cry1A(b) con la pepsina porcina mostraron que todas ellas mantuvieron alrededor de un 27% de inmunoreactividad, lo que indica que los péptidos formados contienen algunos epítomos que son reconocidos por los anticuerpos usados en el ensayo. En la electroforesis realizada con las mismas muestras, se observó que la proteína era degradada en los primeros 30 minutos de incubación, dando lugar a fragmentos mayoritarios de entre 6 y 8 kDa, y a un péptido minoritario de 34 kDa. El perfil de bandas electroforéticas se mantuvo similar tras 2 y 4 horas de incubación con la pepsina, lo que indica que la hidrólisis se produce en los primeros 30 minutos de incubación, y que el enzima no es capaz de degradar los péptidos inicialmente formados. Los péptidos observados por electroforesis no se pudieron visualizar mediante la técnica de western-blotting al incubarlos con un antisuero anti-proteína Cry1A(b), lo que podría deberse a problemas en la transferencia de los fragmentos, a pesar de que se probaron tiempos e intensidades de corriente muy diferentes, o a problemas en la inmunodetección, a pesar de que se usaron diluciones muy bajas del antisuero específico, e incluso concentraciones altas de los anticuerpos específicos marcados con peroxidasa. Los resultados observados mediante

la técnica de espectrometría de masas coinciden con los obtenidos mediante electroforesis, ya que los péptidos detectados tienen una masa molecular menor de 8,5 kDa.

En otros trabajos en los que se ha estudiado la degradación *in vitro* de la proteína Cry1A(b) en presencia de fluidos gástricos simulados, que contienen pepsina (Okunuki *et al.*, 2002; AGBIOS, 2004; Nakajima *et al.*, 2007), se ha indicado que tanto la proteína Cry1A(b) producida por *E. coli* como la presente en la harina de maíz transgénico son degradadas rápidamente por la pepsina, de manera que no se puede detectar su presencia por western-blotting tras 30 y 60 segundos de incubación, respectivamente (Okunuki *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 2007). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro trabajo al utilizar dicha técnica, pero en ellos no se indican los resultados visualizados en la electroforesis, en la que nosotros hemos observado la presencia de péptidos de bajo peso molecular, que además coinciden con los resultados obtenidos por espectrometría de masas. El hecho de que no se detecten por western-blotting fragmentos de la proteína Cry1A(b) proteolizada puede deberse a las razones anteriormente indicadas, o a que en estos estudios se usó un anticuerpo monoclonal, en cuyo caso el epítipo que es reconocido por el anticuerpo podría haber sido destruido por la hidrólisis.

Por otra parte, diferentes estudios realizados con animales a los que se les administró harina de maíz transgénico han mostrado que la proteína Cry1A(b) es degradada en el tracto digestivo, aunque existe una amplia variabilidad en la intensidad de la degradación y en el perfil de los péptidos obtenidos en los distintos trabajos.

Algunos autores han estudiado exclusivamente la degradación de la proteína Cry1A(b) en el rumen, mediante la técnica de la bolsa de nylon ruminal *in situ*, en la que se introdujo la harina de maíz transgénico. En esas condiciones, Jacobs *et al.* (2005) observaron que, aproximadamente, un 85% y un 40% de proteína Cry1A(b) inmunorreactiva, determinada por la técnica de ELISA, permanecía sin degradar tras 16 y 24 horas de permanencia en el rumen, mientras que Wiedemann *et al.* (2006) observaron una degradación mucho mayor, ya que sólo un 27% y un 18% de la proteína podía ser detectada tras 2 y 4 horas de permanencia.

En estudios realizados con vacas, terneros y cerdos que habían sido alimentados con harina de maíz transgénico, y a los que tras el sacrificio se les había extraído el contenido de las distintas partes del tracto gastrointestinal, se ha indicado que más del 90% de la proteína Cry1A(b) ingerida se degrada a nivel del estómago (Chowdhury *et al.*, 2003b). Sin embargo, a pesar de la extensiva degradación, la proteína era detectada, aunque en baja concentración, en el contenido de los distintos tramos del tracto intestinal (abomaso, yeyuno y colon), e

incluso en las heces. Además, la concentración de proteína inmunorreactiva fue incluso mayor en las partes distales de intestino, y en ocasiones en heces, debido a la reducción del contenido en agua que tiene lugar a ese nivel (Chowdhury *et al.*, 2003a; Einspanier *et al.*, 2004; Lutz *et al.*, 2005). Estos resultados indican que, a pesar de la extensiva degradación sufrida por la proteína Cry1A(b), se mantienen algunos epítomos que son reconocidos por los anticuerpos usados en los ensayos, al igual que se ha observado en nuestro trabajo.

En el análisis por western-blotting de las muestras del contenido digestivo, los diversos trabajos muestran un perfil de fragmentación diferente. En el caso de terneros y de cerdos alimentados con maíz Bt11, se observó una única banda de 65 kDa, cuya intensidad disminuía a lo largo del tracto digestivo, siendo detectable incluso en las heces (Chowdhury *et al.*, 2003a y b). Sin embargo, en el caso de vacas alimentadas con maíz Bt176, no se observó la proteína de 65 kDa, sino un fragmento de 34 kDa, presente sólo en el rumen y en el yeyuno, y un fragmento de 17 kDa, presente en el rumen, intestino y heces (Lutz *et al.*, 2005; Wiedemann *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, que indican que la proteína Cry1A(b) es rápidamente degradada *in vitro* por la pepsina, aunque no totalmente, coinciden con la mayoría de los trabajos realizados *in vivo*, en los que también se observa una degradación, que es extensa a nivel ruminal, y que continúa a lo largo del tracto intestinal. Sin embargo, el perfil de bandas obtenido en nuestro trabajo al analizar las muestras por electroforesis y espectrometría de masas, indica que existe una diferente fragmentación de la proteína Cry1A(b) en las condiciones estudiadas, dando lugar fundamentalmente a fragmentos de peso molecular bajo, entre 6 y 8 kDa, menores que los indicados por otros autores. Las diferencias obtenidas entre los diversos trabajos se puede atribuir a la diferente metodología usada, al diferente metabolismo gastrointestinal entre cerdos o terneros y vacas adultas, y a la diferente expresión de la proteína Cry1A(b) en los diferentes tipos de maíz.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

Primera: El cambio de conformación que tiene lugar en la β -lactoglobulina por efecto del tratamiento térmico aumenta inicialmente la inmunorreactividad de la proteína cuando se usa un antisuero obtenido frente a ella en un formato de ELISA de tipo competitivo indirecto, y la disminuye cuando se usan anticuerpos aislados por inmunoadsorción en un formato de ELISA de tipo sándwich. Estas diferencias pueden atribuirse a que el antisuero contiene anticuerpos que reconocen tanto la forma nativa como la denaturalizada de la proteína, mientras que en el aislamiento por inmunoadsorción se han seleccionado preferentemente aquellos anticuerpos que reaccionan con la forma nativa.

Segunda: El cambio de conformación del ovomucoide por efecto del tratamiento térmico disminuye la inmunorreactividad de la proteína, tanto si se usa un antisuero obtenido frente a ella en un formato de ELISA de tipo competitivo indirecto, como si se usan anticuerpos aislados por inmunoadsorción en un formato de ELISA de tipo sándwich, lo que indica que la población de anticuerpos usada en ambos ensayos reconoce preferentemente la forma nativa de la proteína.

Tercera: La β -lactoglobulina y el ovomucoide mantienen, tras ser sometidos a tratamientos térmicos intensos, una cierta reactividad residual con los anticuerpos obtenidos frente a ellos, lo que permite detectar ambas proteínas desnaturalizadas utilizando técnicas inmunoquímicas.

Cuarta: Los tratamientos tecnológicos aplicados durante el procesado de los alimentos modelo que contienen como ingredientes leche y huevo disminuyen la cantidad de β -lactoglobulina y ovomucoide inmunorreactivos, siendo la disminución mayor cuanto mayor es la intensidad del tratamiento aplicado. Por ello, la cantidad de leche o huevo añadidos que da un resultado positivo por las técnicas de ELISA desarrolladas es menor en el producto pasteurizado (salchicha), seguida del horneado (pan) y del esterilizado (paté).

Quinta: De las dos técnicas de ELISA desarrolladas en este trabajo para la determinación de β -lactoglobulina, el formato de tipo sándwich resulta, por su mayor sensibilidad y especificidad, más adecuado que el de tipo competitivo indirecto para detectar la presencia de leche en alimentos procesados. Así, utilizando el formato de ELISA sándwich, se detectó la adición de 0,005, 0,05 y 0,25% de leche en polvo en salchichas, pan y paté, respectivamente. Sin embargo, con el formato competitivo, aunque se detectó el mismo porcentaje de leche en polvo en el paté, fue necesario añadir un porcentaje 10 y 5 veces mayor en la salchicha y en el pan para obtener un resultado positivo.

Sexta: De las dos técnicas de ELISA desarrolladas en este trabajo para la determinación de ovomucoide, el formato de tipo competitivo indirecto resulta más adecuado para detectar la presencia de huevo en alimentos procesados que el de tipo sándwich, ya que, aunque con ambos se detecta el mismo porcentaje de huevo añadido en dos de los productos analizados (0,005% en la salchicha y 0,05% en el pan), sólo utilizando el formato competitivo indirecto se puede detectar el ovomucoide en las muestras de paté, con un porcentaje de huevo en polvo de 0,25%.

Septima: La técnica de inmunocromatografía desarrollada, basada en la detección de β -lactoglobulina, es entre 2 y 20 veces menos sensible que las técnicas de ELISA en placa para detectar la presencia de leche en alimentos procesados. En cambio, la técnica de inmunocromatografía basada en la detección de ovomucoide tiene una sensibilidad similar o

sólo ligeramente inferior que la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto para detectar la presencia de huevo en alimentos procesados. La sencillez y rapidez de la técnica de inmunocromatografía hace que sea la técnica de elección para ser usada como “home test” o para el control “*in situ*” de contaminación de alérgenos en la industria alimentaria.

Octava: De los resultados obtenidos en este trabajo se deriva que la detección de proteínas alergénicas en alimentos procesados utilizando técnicas inmunoquímicas depende de las propiedades de la proteína diana, sobre todo de su termorresistencia, de la población de anticuerpos utilizada, de las características intrínsecas de la técnica usada y de la intensidad del tratamiento térmico al que ha sido sometido el alimento durante su elaboración.

Novena: El 14% de las muestras de alimentos comerciales analizados en este trabajo contiene proteínas lácteas sin declarar en la etiqueta. Sin embargo, no se ha detectado la presencia de huevo en ninguno de los alimentos comerciales analizados cuya etiqueta no incluía como ingredientes huevo o sus derivados. Por otra parte, no se ha detectado la presencia de leche o huevo en un 13% y un 33%, respectivamente, de los alimentos comerciales en los que la presencia de dichos ingredientes estaba indicada en la etiqueta, lo que supone una restricción en la gama de productos para el consumidor alérgico.

Décima: Los resultados obtenidos en el análisis de la proteína Cry1A(b) aislada del maíz transgénico mediante la técnica de identificación de péptidos por huella peptídica usando MALDI-TOFF, y los obtenidos al determinar la reactividad cruzada, indican que dicha proteína presenta una alta homología con la producida por *B. thuringiensis*.

Undécima: El proceso cinético de desnaturalización de la proteína Cry1A(b), entendido como la pérdida de la capacidad de la proteína de ser reconocida por sus anticuerpos específicos debido al tratamiento térmico, se ve favorecido al aumentar la temperatura y el tiempo de tratamiento, y el mejor ajuste se obtiene asumiendo un orden de reacción aparente de $n=1,5$ que a un orden de $n= 1$ ó 2 .

Duodécima: Los altos valores del incremento en la entalpía de activación y los valores positivos de la entropía de activación para los procesos de pérdida de inmuno reactividad de la proteína Cry1A(b), al ser tratada térmicamente, indican que, durante la desnaturalización,

dicha proteína sufre un cambio de conformación considerable, y que los procesos de desplegamiento predominan sobre los de agregación en el rango de temperaturas estudiado.

Decimotercera: La proteína Cry1A(b) se desnaturaliza rápidamente por los tratamientos tecnológicos que habitualmente se utilizan en la industria alimentaria, resultando en un marcado descenso en la concentración de proteína inmunorreactiva. Así, el alto grado de desnaturalización sufrido por la proteína Cry1A(b) durante la elaboración de productos tales como las farinetas, las tortillas fritas o a la plancha, no permitiría su detección en los productos finales cuando se usan técnicas inmunoquímicas. Por ello, el etiquetado de maíz transgénico debería realizarse en base a los resultados obtenidos en el análisis de los ingredientes utilizados para su elaboración, y el seguimiento de los mismos mediante un sistema adecuado de trazabilidad.

Decimocuarta: La proteína Cry1A(b) se degrada en 30 minutos por acción de la pepsina porcina, dando lugar mayoritariamente a péptidos de entre 6 y 8 kDa, que se mantienen tras 4 horas de incubación. La proteína hidrolizada mantiene alrededor de un 27% de su inmunoreactividad al analizarla por la técnica de ELISA, lo que indica que los péptidos formados contienen algunos epítomos que son reconocidos por los anticuerpos usados en el ensayo.

Decimoquinta: El conjunto de los resultados obtenidos en el estudio de la proteína Cry1A(b) aislada de maíz transgénico indican que es una proteína muy sensible al tratamiento térmico y a la degradación con pepsina, propiedades que no son compartidas por la mayoría de las proteínas alergénicas conocidas de alimentos.

VII. Bibliografía

- Aalberse, C., Akkerdaas, J., y van Ree, R. 2001. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*, 56, 478-490.
- AGBIOS: Agriculture and Biotechnology Strategies. 2004. GMO Database. <http://www.agbios.com/dbase.php>. 20 de noviembre de 2008.
- Ahmed, F.E. 2002. Detection of genetically modified organism in foods. *Trends in Biotechnology*, 20, 215-223.
- Allen, I.M., McAuliffe, A.G., y Donnelly, W.T. 1985. Simplified approaches to casein fractionation. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 9, 85.
- Andrews, C.D., Berger, R.G., Mageau, R.P., Shwab, B., y Johson, W. 1992. Detection of beef, sheep, deer and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists*, 75, 572-576.
- Anema, S.G., y McKenna, A.B. 1996. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44,422-428.
- Anguita, G., Martín, R., García, T., Morales, P., Haza, A.I., González, I., Sanz, B., y Hernández, P.E. 1995. Indirect ELISA for detection of cow's milk and goat's milk using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *Journal of Dairy Research*, 62, 655-659.
- Anguita, G., Martín, R., García, T., Morales, P., Haza, A.I., González, I., Danz, B., y Hernández, P.E. 1997. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *Journal of Food Protection*, 60, 64-66.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., y Van Den Eede, G. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214, 3-26.
- Aronson, J.N., Beckman, W., y Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. *Microbiological Reviews*, 50(1), 1-24.

Aschaffenburg, R., y Drewry, J. 1955. Occurrence of different β -lactoglobulins in cow's milk. *Nature*, 176, 218-219.

Asensio, L., González, I., García, T., y Martín, R. 2008. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19, 1-8.

Axelsson, I., Jakobsson, I., Lindberg, T., y Benediktsson, B. 1986. Bovine beta-lactoglobulin in the human milk. A longitudinal study during the whole lactation period. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 75, 702-707.

Batista, R., Nunes, B., Carmo, M., Cardoso, C., Lose, H.S., de Almeida, A.B., Manique, A., Bento, L., Richardo, C.P., y Oliveira, M.M. 2005. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(2), 403-410.

Baumgartner, S., Steiner, I., Kloiber, S., Hirman, D., Krska, R., y Yeung, J. 2002. Towards the development of a dipstick immunoassay for the detection of trace amounts of egg proteins in food. *European Food Research Technology*, 214, 168-170.

Bello, J. 2000. La calidad de los alimentos. En: *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*, págs. 249-278. Díaz de Santos (Ed.), Madrid, España.

Bernback, S., Hernell, O., y Blackberg, L. 1990. The complete digestion of human milk triacylglycerol "in vitro" requires gastric lipase, pancreatic colipase-dependent lipase and bile salt stimulated lipase. *Journal of Clinical Investigation*, 85, 1221-1226.

Bernhisel-Broadbent, J., Dintzis, H.M., Dintzis, R.Z., y Sampson, H.A. 1994. Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 93, 1047-1059.

Berrini, A., Tepedino, V., Borromeo, V., y Secchi, C. 2006. Identification of freshwater fish commercially labelled "perch" by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chemistry*, 96, 163-168.

- Besler, M., Eighenmann, P., y Schwartz, R.H. 2002. Allergen data collection- update: cow's milk (*Bos domesticus*). Internet symposium on food allergens, 4, 19-106. <http://www.food-allergens.de>
- Besler, M., Steinhart, H., y Paschke, A. 1997. Allergenicity of hen's egg-white proteins: IgE binding of native and deglycosylated ovomucoid. *Food Agriculture and Immunology*, 9, 277-288.
- Besler, M., Steinhart, H., y Paschke, A. 2001. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography*, 756, 207-228.
- Bietlot, H., Carey, P.R., Choma, C., Kaplan, H., Lessard, T., y Pozsgay, M. 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochemical Journal*, 260, 87-91.
- Blais, B.W., y Philippe, L.M. 2000. A cloth-based enzyme immunoassay for detection of peanut proteins in foods. *Food Agricultural Immunology*, 12, 243-248.
- Blanco, C. 2003. Latex-fruit syndrome. *Current Allergy and Asthma Reports*, 3, 47-53.
- Bleumink, E., y Young, E. 1968. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 34, 521-543.
- Bock, S.A., Lee, W.Y., Remigio, L.K., y May, C.D. 1978. Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 62, 327-334.
- 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.
- Bonnefoi, M., Benard, G., y Labie, C. 1986. Gel electrophoresis : a quantitative method for detection of duck and goose liver in canned foi-gras. *Journal of Food Science*, 51, 1362-1363.
- Bordoni, R., Germini, A., Mezzelani, A., Marchelli, R., y De Bellis, G. 2005. A microarray platform for parallel detection of five transgenic events in foods : a combined polymerase chain reaction-ligation reaction-universal array method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 912-818.

- Bordoni, R., Mezzelani, A., Consoladi, C., Frosini, A., Rizzi, E., Castiglioni, B., Salati, C., Marmiroli, N., Marchelli, R., Bernardi, L.R., Battagli, C., y De Bellis, G. 2004. Detection and quantization of genetically modified maize (Bt-176 transgenic maize) by applying ligation detection reaction and universal array technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1049-1054.
- Bottero, M.T., Civera, T., Anastasio, A., Turi, R.M., y Rosati, S. 2002. Identification of cow's milk in buffalo cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65, 362-366.
- Bouis, H.E., Chassy, B.M., y Ochanda, J.O. 2003. Genetically modified food crops and their contribution to human nutrition and food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 191-209.
- Bousoiio, C. 1999. Mesa redonda: Alergia e intolerancia alimentaria. Principales formas clínicas de presentación. *Boletín Pediátrico*, 39, 148-151.
- Bressani, R., Turcios, J.C., Colmenares de Ruiz, A.S., y de Palacios de Palomo, P. 2004. Effect of processing conditions on phytic acid, calcium, iron, and zinc contents of lime-cooked maize. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 1157-1162.
- Brew, K., y Grobler, J.A. 1992. α -Lactalbumin. En: *Advanced Dairy Chemistry-I. Proteins*, págs. 191-223. Fox, P.F. (Eds.), Elsevier, Oxford, Reino Unido.
- Burks, A.W., Williams, L.W., Helm, R.M., Connaughton, C., Cockrell, G., y O'Brien, T. 1991. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88, 172-179.
- Bush, R.K., y Hefle, S.L. 1996. Food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(s), S119-S163.
- Cant, A., Marsden, R.A., y Kilshaw, P.J. 1985. Egg and cow's milk hypersensitivity in exclusively breast fed infants with eczema, and detection of egg protein in breast milk. *British Medical Journal*, 291, 932-935.

- Carrera, E., García, T., Céspedes, A., González, I., Sanz, B., Hernández, P.E., y Martín, R. 1997. Immunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama raii*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 74, 547-550.
- Castañera, P. 1996. Plagas del maíz. IV Jornadas Técnicas sobre el Maíz. Lérida. Plagas, 1-24. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Catty, D., y Raykundalia, C. 1989. ELISA and related enzyme immunoassay. En: Antibodies: a practical approach, vol. II, p. 97-154. D. Catty (Ed.), IRL press. Oxford, Reino Unido.
- Cheftel, J.C. 2005. Food and nutrition labelling in the European Union. Food Chemistry, 93, 531-550.
- Chowdhury, E.H., Kuribara, H., Hino, A., Sultana, P., Mikami, O., Shimada, N., Guruge, K.S., Saito, M., y Nakajima, Y. 2003a. Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. Journal of Animal Science, 81, 2546-2551.
- Chowdhury, E.H., Shimada, N., Murata, H., Mikami, O., Sultana, P., Miyazaki, S., Yoshioka, M., Yamanaka, N., Hirai, N., y Nakajima, Y. 2003b. Detection Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. Veterinary and Human Toxicology, 45(2), 72-75.
- Clark, B.W., Phillips, T.A., y Coats, J.R. 2005. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4643-4653.
- Copin, M.P., Nau, F., Roignant, M., Audiot, V., y Painvin, A. 1994. Transformation, décontamination et stabilisation en: L'œuf et les ovoproduits, págs. 133-190. J.L. Thapon & C.M. Bourgeois (Eds.), Technique and Documentation Lavoisier, Paris, Francia.
- Cotterill, O.J. 1977. Freezing egg products. En: Egg Science and Technology, págs. 145-160. W.J. Stadelman & O.J. Cotterill (Eds.), AVI, Westport, EE.UU.

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., y Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sept, 807-813.

Dannenbergh, F., y Kessler, H.G. 1988. Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, 53, 258-263.

de Maagd, R.A., Bosch, D., y Stiekema, W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 4(1), 9-13.

de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., y Schepf, H.E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37, 409-433.

de Maagd, R.A., Bravo, A., y Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect World. *Trends in Genetics*, 17(4), 193-199.

de Wit, J.N. 1989. The use of whey protein products. En: *Developments of Dairy Chemistry*, 4, págs. 323-346. Fox, P.F. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido.

de Wit, J.N., Klarenbeek, G., y De Boer, R. 1978. A simple method for the clarification of whey. En: *Brief Communications, Proceedings of the International Dairy Congress*, págs. 919-920. Congrilait (Ed.), Paris, Francia.

Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.J., Chen, X.J., Alcantara, E., y Hussain, S.R. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis- a minireview. *Gene*, 179, 111-117.

Decisión de la Comisión 98/294/CE, de 22 de abril de 1998, relativa a la comercialización de maíz (*Zea mays* L. línea MON 810) modificado genéticamente con arreglo a la Directiva 90/220/CEE del Consejo. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 131, 5 de mayo de 1998, 32-33.

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(4), 436-441.

Díaz, C., Fernandez, C., McDonald, R., y Yeung, J.M. 2002. Determination of Cry9C protein in processed foods made with starLink corn. *Journal of AOAC International*, 85,1070-1076.

Directiva 2000/13/EC, de 20 de marzo de 2000, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 109, de 6 de mayo de 2000, 29-42. Real Decreto 2220/2004.

Directiva 2001/18/EC, de 12 de marzo de 2001, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 106, 17 de abril de 2001, 1-38. Real Decreto 178/2004.

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.

Directiva 2007/68/CE, de 27 de noviembre de 2007, que modifica el anexo III *bis* de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a

- determinados ingredientes alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 310, 28 de noviembre de 2007, 11-14. Real Decreto 1245/2008.
- Directiva 97/4/CE, de 27 de enero de 1997, por la que se modifica la Directiva 79/112/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios destinados al consumidor final. Diario Oficial de la Unión Europea, L 43, 14 de febrero de 1997, 21-23. Real Decreto 1334/1999.
- Docena, A., Rozenfeld, G., Fernández, R., y Fossati, C.A. 2002. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by *in vitro* tests. *Allergy*, 57, 83-91.
- Docena, G.H., Fernández, R., Chirido, F.G., y Fossati, C.A. 1996. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*, 51, 412-416.
- Dombrink-Kurtzman, M.A., Dvorak, T.J., Barron, M.E., y Rooney, L.W. 2000. Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5781-5786.
- Domínguez, E., Pérez, M.D., Puyol, P., Sánchez, L., y Calvo, M. 2001. Effect of pH on antigen-binding activity of IgG from bovine colostrum upon heating. *Journal of Dairy Research*, 68, 511-518.
- Dulmage, H.T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. En: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, págs. 193-222. Burgess, H.D. (Eds.), Academic Press, Nueva York, EE.UU.
- E**FSA, European Food Safety Authority. 2004. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *The EFSA Journal*, 1-94. www.efsa.europa.eu
- Einspanier, R., Lutz, B., Rief, S., Berezina, O., Zverlov, V., Schwarz, W., y Mayer, J. 2004. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *European Food Research and Technology*, 218(3), 269-273.

- Ellman, L.K., Chatchatee, P., Sicherer, S.H., y Sampson, H.A. 2002. Food hypersensitivity in two groups of children and young adults with atopic dermatitis evaluated a decade apart. *Paediatric Allergy and Immunology*, 13, 295-298.
- English, L., y Slatin. S.L. 1992. Mini-review. Mode of action of Delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(1), 1-7.
- Ermolli, M., Fantozzi, A., Marini, M., Scotti, D., Balla, B., Hoffman, S., Querci, M., Paoletti, C., y Van den Eede, G. 2006a. Food safety: screening tests used to detect and quantify GMO proteins. *Accreditation and Quality Assurance*, 11, 55-57.
- Ermolli, M., Prospero, A., Balla, B., Querci, M., Mazzeo, A., y Van den Eede, G. 2006b. Development of an innovative immunoassay for CP4EPSPS and Cry1AB genetically modified protein detection and quantification. *Food Additives and Contaminants*, 23(9), 876-882.
- Fantozzi, A., Ermolli, M., Marini, M., Scotti, D., Balla, B., Querci, M., Langrell, S.R.H., y Van den Eede, G. 2007. First application of a microsphere-based immunoassay to the detection of genetically modified organisms (GMOs): Quantification of Cry1Ab protein in genetically modified maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1071-1076.
- FAO/WHO, 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Rome, Italy, January, 22-25.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995. Report of the FAO Technical Committee on Food Allergies. Rome, Italy, November, 13-14.
- Fast, P.G. 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. En: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, págs. 223-248. Burgus, H.D. & Hussey, N.W. (Eds.), Academic Press, Nueva York, EE.UU.

Fernandes, J., Reshef, A., Patton, L., Ayuso, R., Reese, G., y Lehrer, S.B. 2003. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clinical and Experimental Allergy*, 33, 956-961.

Fernández-Anero, J., Novillo, C., y Costa, J. 1999. MaisGard, protección contra taladros en toda la planta, durante toda la campaña. Resultados en España 1997-1998. 6º Symposium Nacional de Sanidad Vegetal. Colección Congresos y Jornadas 48/98, págs. 447-455. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca.

Fox, P.F., y Mulvihill, D.M. 1983. Functional properties of caseins, caseinates and coprecipitates en: *Physic-chemical Aspects of Dehydrated Protein-Rich Milk Products*, págs. 188-259. Proceedings of IDF Symposium, Helsingor, Denmark, International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.

Frapin, D., Dufour, E., y Haertle, T. 1993. Probing the fatty acid binding site of β -lactoglobulins. *Journal of Protein Chemistry*, 12, 443-449.

Frémont, S., Kanny, G., Bieber, S., Nicolas, J.P., y Moneret-Vautrin, D.A. 1996. Identification of a masked allergen, alpha-lactalbumin, in a baby-food cereal flour guaranteed free of cow's milk protein. *Allergy*, 51, 749-754.

<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>

Fukal, L. 1991. Modern immunoassays in meat-product analysis. *Nahrung*, 35, 431-448.

Futterman, S., y Heller, J. 1972. The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin, β -lactoglobulin and the retinol-binding protein of human plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 247(16), 5168-5172.

García, B.E., Gómez, B., Arroabarren, S., Garrido, S., Lasa, E., y Anda, M. 2003. Food allergy in the XXI century. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26.

García, M.C., Marina, M.L., y Torre, M. 1998. Ultrarapid detection of bovine whey proteins in powdered soybean milk by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 822, 225-232.

- Gazzar, S.S., Rasco, B.A., y Dong, F.M. 1992. Application of immunochemical assay to food analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 197-229.
- Gern, J.E., Yang, E., Evrard, H.M., y Sampson, H.A. 1991. Allergic reactions to milk-contaminated "non-dairy" products. *New England Journal of Medicine*, 324, 976-979.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., y Pietrantonio, P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Reviews of Entomology*, 37, 615-636.
- Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J.L., y Demeulester, C. 2004. Species identification of meat products by ELISA. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 863-867.
- Godovac-Zimmerman, J. y Brautnizer, G. 1987. Modern aspects of the primary structure and function of β -lactoglobulins. *Milchwissenschaft*, 42, 294-297.
- González, I., Martín, R., García, T., Morales, P., Sanz, B., y Hernández, P.E. 1993. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Pseudomonas fluorescens* and related psychrotrophic bacteria in refrigerated milk. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 394-401.
- Gordon, W.G., Basch, J.J., y Kallan, E.B. 1961. Amino acid composition of β -lactoglobulins A,B and AB. *Journal of Biological Chemistry*, 236, 2908-2911.
- Greiner, R., Konietzny, U., y Villavicencio, A.L.C.H. 2005. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 16, 753-759.
- Gu, J., Matsuda, T., Nakamura, R., Ishiguro, H., Ohkubo, I., Saaki, N., y Takahashi, N. 1989. Chemical deglycosylation of hen ovomucoid: Protective effect of carbohydrate moiety on tryptic hydrolysis and heat denaturation. *Journal of Biochemistry*, 106, 66-70.
- Gu, J., Matsuda, T., y Nakamura, R. 1986. Antigenicity of ovomucoid remaining in boiled shell eggs. *Journal of Food Science*, 51, 1448-1450.

- Haasnot, W., Olieman, K., Cazemier, G., y Verheijen, R. 2001. Direct biosensor immunoassays for the detection of nonmilk proteins in milk powder. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5201-5206.
- Hambling, S .G., McAlpine, A. S., y Sawyer, L. 1992. β -Lactoglobulin. En: *Advances Dairy Chemistry. Proteins, I*, págs. 141-190. Fox, P.F. (Ed.), Elsevier Applied Science Publisher, Londres, Reino Unido.
- Hefle, S.L., Folgert, J.P., Bush, R.K., y Chu, F.S. 1992. A monoclonal antibody-based ELISA for selected peanut allergens in foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 89, 195.
- Hefle, S.L., Jeanniton, E., y Taylor, S.L. 2001. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of egg residues in processed foods. *Journal of Food Protection*, 64, 1812-1816.
- Hefle, S.L., y Koppelman, S. 2006. Conclusions. En: *Detecting allergens in foods*, págs. 403-412. Koppelman, S.J. & Hefle, S.L. (Eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- Hefle, S.L., y Lambrecht, D.M. 2004. Validated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for casein and its application to retail and milk-allergic complaint foods. *Journal of Food Protection*, 67, 1933-1938.
- Hefle, S.L., y Taylor, S.L. 2002. How much food is too much? Threshold doses for allergenic foods. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2, 63-66.
- Hefle, S.L., Yeung, J., y Helm, R. 2006. Antibodies. En: *Detecting allergens in foods*, págs. 65-78. Koppelman, S.J. & Hefle, S.L. (Eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- Hirose, J., Ito, S., Hirata, N., Kido, S., Kitabatake, N., y Narita, H. 2001. Occurrence of the major food allergen, ovomucoid, in human breast milk as an immune complex. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(6), 1438-1440.
- Hirose, J., Kitabatake, N., Kimura, A., y Narita, H. 2004. Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human

- IgE and Mouse monoclonal antibodies. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(12), 2490-2497.
- 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(5), 796-806. <http://www.allergen.org>
- Hoffman, D.R. 1983. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 71, 265-268.
- Hofmann, C., Luethy, P., Huetter, R., y Pliska, V. 1988a. Binding of the Delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*, 173(1), 85-91.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H.V., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., y Van Mellaert, H. 1988b. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midgut. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 7844-7848.
- Höfte, H., y Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242-255.
- Hohensinner, V., Maier, I., y Pittner, F. 2007. A “gold cluster-linked immunosorbent assay”: Optical near-field biosensor chip for the detection of allergenic β -lactoglobulin in processed milk matrices. *Journal of Biotechnology*, 130, 385-388.
- Holen, E., y Elsayed, S. 1990. Characterization of four major allergens of hen egg white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 91, 136-141.
- Hori, H., Takahashi, M., y Wada, Y. 2000. Detection of the *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui protexin with enzyme-linked immunosorbent assay and its application to detection of the protoxin in soil. *Applied Entomology and Zoology*, 35(3), 401-411.
- Høst, A. 1997. Cow's milk allergy. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 90(S30), 31-39.

Høst, A., y Samuelsson, E.G. 1988. Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. A double-blind placebo-controlled study in milk allergic children. *Allergy*, 43, 113-118.

http://biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt

http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_print_en.efm, 16/10/2008.

<http://www.agrodigital.com>. “Posición común del Consejo sobre la indicación de componentes causantes de alergias en el etiquetado de los alimentos”.15/11/2002

<http://www.institutohuevo.com>

<http://www.matrixscience.com>

Huber, H.E., y Lüthy, P. 1981. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: composition and activation. En: *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, págs. 209-234. Davidson, E.W. (Ed.), Allanheld, Osmun Publishers, Totowa, Nueva Jersey, EE. UU.

Hupfer, C., Hoztel, H., Sachse, K., y Engel, K. 1997. Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. *Food Research and Technology*, 205, 442-445.

Hupfer, C., Hoztel, H., Sachse, K., y Engel, K.H. 1998. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Food Research and Technology*, 206, 203-207.

Hurley, I.P., Coleman, R.C., Ireland, H.E., y Williams, J.H.H. 2004. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration *Journal of Dairy Science*, 87, 215-221.

Hurst, C.D., Knight, A., y Bruce, I.J. 1999. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding*, 5, 579-586.

Husband, F.A., Garrood, M.J., Mackie, A.R., Burnett, G., y Wilde, P.J. 2001. Adsorbed protein secondary and tertiary structure by circular dichroism and infrared spectroscopy with refractive matched emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 859-666.

- Ibrahim, H.R. 1997. Insights into the structure-function relationships of ovalbumin, ovomucoid, and lysozyme. En: Hen eggs. Their basic and applied science, págs. 37-56. Yamamoto, T., Juneja, L.R., Hatta, H., & Kim, M. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EE. UU.
- Immer, U. 2006. Factors affecting the effectiveness of allergen detection. En: Detecting Allergens in Foods, págs. 330-346. Koppelman, S.J. & Hefle, S.L. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- Immer, U., Dupont, A., Giovannacci, I, Guizard, C., Demeulemester, C., y Dreher, R.M. 2003. Détection des protéines d'œuf dans les produits alimentaires. Bulletin de Liaison du CTSCCV, 13(4), 17-20.
- Jacobs, J.L., Diez-Gonzalez, F., Stern, M.D., y Phillips, R.L. 2005. Detection of transgenic maize Cry1Ab protein subjected to ruminal digestión. Journal of Animal and Feed Sciences, 14(4), 655-664.
- James, C. 2006. Situación global de los cultivos transgénicos /GM comercializados: 2006. ISAAA (Ithaca) Briefs 35. <http://www.isaaa.org/>
- James, C. 2007. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2007. ISAAA (Ithaca) Briefs 37. <http://www.isaaa.org/>
- Jedrychowski, L. 1999. Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic acid fermentation. Food and Agricultural Immunology, 11, 91-99.
- Jennes, R. 1985. Biochemical and nutritional aspects of milk and colostrums. En: Lactation, págs. 78-94. Larson, B.L. (Ed.), University of Iowa Press, Ames, EE. UU.
- Jonsson, H., Eriksson, A., y Malmheden Yman, I. 2006. Detecting food allergens with a surface plasmon resonance immunoassay. En: Detecting Allergens in Foods, págs. 330-347. Koppelman, S.J. & Hefle, S.L. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.

Jonsson, H., y Hellenäs, K.E. 2001. Optimizing assay conditions in the detection of food allergens with Biacore's SPR technology. *Biacore Journal*, 1(2), 16-18.

Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G., y Giband, M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*, 131, 1-11.

Julià, S., Sánchez, L., Pérez, M.D., Lavilla, M., Conesa, C., y Calvo, M. 2007. Effect of heat treatment on hen's egg ovomucoid: An immunochemical and calorimetric study. *Food Research International*, 40, 603-612.

Kang'ethe, E.K., Gathuma, J.M. y Lindqvist, K.J. 1986. Identification of species of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermoestable muscle antigens by Ouchterlony's diffusion test. *Journal of Science and Food Agriculture*, 37, 157-164.

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.

Karamonova, L., Fukal, L., Kodicek, M., Rauch, P., Mills, E.N.C., y Morgan, M.R.A. 2003. Immunoprobes for thermally-induced alterations in whey protein structure and their application to the analysis of thermally-treated milks. *Food and Agricultural Immunology*, 15, 77-91.

Kato, I., Schrode, J., Kohr, W.J., y Laskowski, M. 1987. Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry*, 26, 193-201.

Kella, N.K.D., y Kinsella, J.E. 1988. Structural stability of β -lactoglobulin in the presence of kosmotropic salts. *Journal of Peptide and Protein Research*, 32, 396-405.

Kilshaw, P.J., y Cant, A.J. 1984. The passage of maternal dietary proteins into human breast milk. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 75, 8-15.

- 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.
- Kleter, A.G., y Kuiper, H.A. 2002. Considerations for the assessment of the safety of genetically modified animals used for human food or animal feed. *Livestock Production Science*, 74, 275-285.
- Lack, G. 2002. Clinical risk assessment of GM foods. *Toxicology Letters*, 127, 337-340.
- Langeland, T. 1982. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. III. Allergens in hen's egg white studied by crossed radio-immunoelectrophoresis (CRIE). *Allergy*, 37, 521-530.
- Langeland, T., y Harbitz, O. 1983. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg. V. Purification and identification of a major allergen (antigen 22) in hen's egg white. *Allergy*, 38, 131-139.
- Laoprasert, N., Wallen, N.D., Jones, R.T., Hefle, S.L., Taylor, S.L., y Yunginger, J.W. 1998. Anaphylaxis in a milk-allergic child following ingestion of lemon sorbet containing trace quantities of milk. *Journal of Food Protection*, 61, 1522-1524.
- Laurent, D. 1996. L'industrie des ovoproduits. En: De la poule au gateau...L'œuf et les ovoproduits, págs. 31-35. Nau, F. (Ed.), ENSAR, Rennes, Francia.
- Leduc, V., Demeulemester, C., Polack, B., Guizard, C., Le Guern, L., y Peltre, G. 1999. Immunochemical detection of egg-white antigens and allergens in meat products. *Allergy*, 54, 464-472.
- Leduc, V., Polack, B., Peltre, G., Huneau, J.F., y Demeulemester, C. 1996. Antigénicité et allergénicité des ingrédients (lait, œuf, soja) dans les produits carnés. *Viandes et Produits Carnés*, 17, 359-360.
- Lee, J.W., Kim, J.H., Oh, S.H., Byun, E.H., Yook, H.S., Kim, M.R., Kim, K.S., y Byun, M.W. 2008. Effect of gamma irradiation on viscosity reduction of cereal porridges for improving energy density. *Radiation Physics and Chemistry*, 77, 352-356.

- Lee, T.C., Bailey, M.R., Sims, S.R., Zeng, J., Smith, C.E., Shariff, A., Holden, L.R., y Sanders, P.R. 1995. Assessment of the equivalence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 protein produced in *Escherichia coli* and European corn borer resistant corn. Monsanto Technical Report MSL-13864, St. Louis. Study Number 94-01-39-09.
- Levieux, D. 1980. Heat denaturation of whey proteins comparative studies with physical and immunological methods. *Annals of Veterinary Research*, 11, 89-97.
- Lineweaver, H., y Murray, C.W. 1947. Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid. *Biological Chemistry Journal*, 171, 565-581.
- Lipp, M., Anklam, E., Brodmann, P., Pietsch, K., y Pauwels, J. 1999a. Results of an interlaboratory assesment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize. *Food Control*, 10, 379-383.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G., y Anklam, E. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology*, 212, 497-504.
- Lipp, M., Brodman, P., Pietsch, K., Pauwels, J., y Anklam, E. 1999b. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, 82(4), 923-928.
- Liu, L.H., Chen, F.C., Dorsey, J.L., y Hsieh, Y.H.P. 2006. Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products. *Journal of Food Science*, 71, M1-M6.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Rodríguez, M.A., Hernández, P.E., García, T., y Martín, R. 2004. Rapid detection of cow's milk in sheep's' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. *Journal of Dairy Science*, 87, 2839-2845.
- Losey, J. E., Rayor, L. S., y Carter, M. E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399, 214.
- Lutz, B., Wiedemann, S., Einspanier, R., Mayer, J., y Albrecht, C. 2005. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1453-1456.

Lyster, R.L.J. 1970. The denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk. *Journal of Dairy Research*, 37, 233-243.

MacKenzie, D., y McLean, M. 2002. Who's afraid of GM feed? *Feed Mix*, 10(3), 16-19.

Mackie, I.M., Craig, A., Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Jessen, F., Smelt, A., Kruijt, A., Malmheden-Yman, I., Ferm, M., Martínez, I., Pérez-Martín, R., Piñeiro, C., Rehbein, H., y Kündiger, R. 2000. Species identification of smoked and gravad fish products by sodium dodecylsulphate polyacrilamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelectric focusing: A collaborative study. *Food Chemistry*, 71, 1-7.

Mainer, G., Sánchez, L., Ena, J.M., y Calvo, M. 1997. Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. *Journal of Food Science*, 62, 1034-1038.

Mäkinen-Kiljunen, S., y Palosuo, T. 1992. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine beta-lactoglobulin in infant formulas and in human milk. *Allergy*, 47, 347-352.

Malmheden Yman, I., Eriksson, A., Everitt, G., Yman, L., y Karlsson, T. 1994. Analysis of food proteins for verification of contamination or mislabelling. *Food and Agricultural Immunology*, 6, 167-172.

Malmheden Yman, I., Kruse, B., y Demeulemester, C. 2002. Une étude interlaboratoire du NMKL : Détection de lait, de blanc d'œuf, d'arachide et de noisette dans les produits alimentaires. *Bulletin de Liaison du CTSCCV*, 12(1), 3-7.

Margarit, E., Reggiardo, M.I., Vallejos, R.H., y Permingeat, H.R. 2006. Detection of BT transgenic maize in foodstuffs. *Food Research International*, 39, 250-255.

Mariager, B., Solve, M., Eriksen, H., y Brogren, C.H. 1994. Bovine β -lactoglobulin in hypoallergenic and ordinary infant formulas measured by an indirect competitive ELISA using monoclonal and polyclonal antibodies. *Food and Agricultural Immunology*, 6, 73-83.

- Marshall, K.R. 1982. Industrial isolation of milk proteins: whey protein. En: *Developments in Dairy Chemistry, I*, págs. 339-373. Fox, P.F. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido.
- Martín Esteban, M., García Ara, M.C., y Pascual Marcos, C. 1999. Alergia inmediata en el niño: aspectos etiológicos, patogénicos y diagnósticos. *Boletín Pediátrico*, 39, 140-147.
- Martín Esteban, M., y Polanco, I. 2002. Actualización en alergia alimentaria. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 9(4), 96-108.
- Martínez-Bustos, F., Martínez-Flores, H.E., Sanmartín-Martínez, E., Sánchez-Sinencio, F., Chang, Y.K., Barrera-Arellano, D., y Ríos, E. 2001. Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalisation process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1455-1462.
- Masson, P.L., y Heremans, J.F. 1971. Lactoferrin in milk from different species. *Comparative Biochemical Physiology*, 39B, 119-129.
- Matsuda, R., Yoshioka, Y., Akiyama, H., Aburatani, K., Watanabe, Y., Matsumoto, T., Morishita, N., Sato, H., Mishima, T., Gamo, R., Kira, Y., y Maitani, T. 2006. Interlaboratory evaluation of two-linked immunosorbent assays kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat and peanuts in foods. *Journal of AOAC International*, 89, 1600-1608.
- Matsuda, Y., Watanabe, K., y Nakamura, R. 1982. Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 707, 121-128.
- Matsumura, T., Kuroume, T., Oguri, M., Iwasaki, I., Kanbe, Y., Yamada, T., Kawabe, S., y Negishi, K. 1975. Egg sensitivity and eczematous manifestation in breast-fed newborns with particular reference to intrauterine sensitisation. *Annals of Allergy*, 35, 221-229.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., y Shinmura, Y. 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143-148.
- Mayer, H.K. 2005. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, 15, 595-604.
- McKenzie, H. A., y W. H. Sawyer. 1967. Effect of pH on β -lactoglobulins. *Nature*, 214, 1110.

- Metcalf, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L., y Fuchs, R.L. 1996. Assesment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(S), S165-S186.
- Mine, Y. 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 225-232.
- Miraglia, M., Berdal, K.G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Jok, E.J., Marvin, H.J.P., Schimmel, H., Rentsch, J., van Rie, J.P.P.F., y Zagon, J. 2004. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42,1157-1180.
- Mohammed, I., Mullet, W.M., Lai, E.P.C., y Yeung, J.M. 2001. Is biosensor a viable method for food allergen detection?. *Analytica Chimica Acta*, 444, 97-102.
- Molina, E., Amigo, L., y Ramos, M. 1998. Detection of bovine milk proteins in soymilk by Western blotting. *Journal of Food Protection*, 61, 1691-1694.
- Monaci, L., Tregoat, 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.
- Morisset, M., Moneret-Vautrin, D.A., Kanny, G., Guénard, L., Beaudouin, E., Flabéee, J, y Hatahet, R. 2003. Threshold of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-bind placebo-controlled oral challenges. *Clinical and Experimental Allergy*, 33, 1046-1051.
- Morr, C.V. 1984. Production and use of milk proteins in food. *Food Technology*, 7, 39-48.
- Moseley, B.E.B. 1999. The safety and social acceptance of novel foods. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 25-31.
- Muller, L.L. 1982. Manufacture of caseins, caseinates and co-precipates. En: *Developments of Dairy Chemistry, I. Proteins*, págs. 315-337. Fox, P.F. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido.
- Mulvihill, D.M. 1992. Production, functional properties and utilization of milk protein products. En: *Advanced Dairy Chemistry, I. Proteins*, págs. 369-404. Fox, P.F. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido.

Mulvihill, D.M., y Ennis, M.P. 2003. Functional milk proteins: production and utilization. En: *Advanced Dairy Chemistry, I. Proteins*, págs. 1175-1228. Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (Eds.), Kluwer Academic Plenum Publishers, Nueva York, EE. UU.

Nakajima, O., Teshima, R., Takagi, K., Okunuki, H., y Sawada, J. 2007. ELISA method for monitoring human serum IgE specific for Cry1Ab introduced into genetically modified corn. *Regulatory, Toxicology and Pharmacology*, 47, 90-95.

Negróni, L., Bernard, H., Clement, G., Chatel, J.M., Brune, P., Frobert, Y., Wal, J.M., y Grassi, J. 1998. Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured β -lactoglobulin. *Journal of Immunological Methods*, 220, 25-37.

Nelson, H.S., Lahr, J., Rule, R., Bock, S.A., y Leung, D.Y.M. 1997. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99, 744-751.

Nickerson, K.W. 1980. Structure and function of the *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(7), 1305-1335.

Niggemann, B., Binder, C., Klettke, U., y Wahn, U. 1999. In vivo and in vitro studies on the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulae. *Acta Paediatrica*, 88, 394-398.

Nordlee, J., Taylor, S.L., Townsend, J.A., Thomas, L., y Bush, R.K. 1996. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *New England Journal of Medicine*, 334, 688-692.

Nordlee, J.A., y Taylor, S.L. 1995. Immunological analysis of food allergens and other food proteins. *Food Technology*, 2, 129-132.

Nowak-Węgrzyn, A. 2003. Future approaches to food allergy. *Pediatrics*, 111, 1672-1680.

- Okunuki, H., Teshima, R., Shigeta, T., Sakushima, J., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., y Sawada, J. 2002. Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 43(2), 68-73.
- Ouchterlony, O. 1948. In vitro method for testing toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 25, 186-191.
- Pérez, M.D., Aranda, P., Sánchez, L., Ena, J.M., Oria, O., y Calvo, M. 1990. Synthesis and evolution of concentration of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cow and sheep colostrum and milk throughout early lactation. *Cellular and Molecular Biology*, 36, 205-212.
- Pérez, M.D., Puyol, P., Ena, J.M., y Calvo, M. 1993. Comparison of the ability to bind lipids of β -lactoglobulin and serum albumin of milk from ruminant and non-ruminant species. *Journal of Dairy Research*, 60, 55-63.
- Pérez, M.D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J.M., Oria, O., y Calvo, M. 1991. Effect of beta-lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1123, 151-155.
- Pérez, M.D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J.M., Oria, R., y Calvo, M. 1992a. Effect of β -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A positive role for this protein in ruminant milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1123, 151-155.
- Pérez, M.D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J.M., y Calvo, M. 1992b. Use of an immunoassay method to detect adulteration of ewe's milk. En: *Food Safety and Quality Assurance*, págs. 41-48. Morgan, M.R.A., Smith, C.J. & Williams, P.A. (Eds.), Elsevier Applied Science Publisher, Londres, Reino Unido.
- Pérez, M.D., y Calvo, M. 1995. Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 978-988.

- Perferoen M. 1998. EPA Data Evaluation Report. In vitro digestibility and heat stability of the endotoxin Cry 9C of *Bacillus thuringiensis*. <http://www.epa.gov/oppbppd1/pesticides/biopesticides/pips/old/cry9c/der44258108a.htm>, 20/5/2008
- Piez, K.A., Davie, E.W., Folk, J.E., y Gladner, J.A. 1961. β -lactoglobulins A and B. Chromatographic separation and amino acid composition. *Journal of Biological Chemistry*, 236, 2912-2916.
- Plath, A., Krause, I., y Einspanier, R. 1997. Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 205, 437-441.
- Plebani, A., Restani, P., Naselli, A., Galli, C.L., Meini, A., Cavagni, G., Ugazio, A.G., y Poesi, C. 1997. Monoclonal and polyclonal antibodies against casein components of cow milk for evaluation of residual antigenic activity in hypoallergenic infant formulas. *Clinical and Experimental Allergy*, 27, 949-956.
- Poms, R. 2006. Reference material and method validation in allergen detection. En: *Detecting Allergens in Foods*, págs. 348-355. Koppelman, S.J. & Hefle, S.L. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- Poms, R.E., Agazzi, M.E., Bau, A., Brohee, M., Capelletti, C., Norgaard, J.V., y 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, 104-112.
- Poms, R.E., Klein, C.L., y Anklam, E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1-31.
- Potekhin, S.A., Loseva, O.I., Tiktopulo, E.I., y Dobritsa, A.P. 1999. Transition state of the rate-limiting step of heat denaturation of Cry3A δ -endotoxin. *Biochemistry*, 38,4121-4127.
- Powrie, W.D. 1997. Chemistry of eggs and egg products en: *Egg Science and Technology*, págs. 65-91. W.J. Stadelman & O.J. Cotterill (Eds.), AVI, Westport, EE. UU.

Pressi, G., Curioni, A., Peruffo, A.D.B.L., Furegon, L., y Zamorani, A., 1994. Determination of egg content in egg pasta by an indirect ELISA procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64, 163-169.

Puyol, P., Pérez, M.D., Ena, J.M. y Calvo, M. 1991. Interaction of β -lactoglobulin and other bovine and human whey proteins with retinol and fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry*, 10, 2515-2520.

Puyol, P., Pérez, M.D., Peiró, J.M., y Calvo, M. 1994. Effect of retinol and fatty acid binding to bovine β -lactoglobulin on its resistance to thermal denaturation. *Journal of Dairy Science*, 77, 1494-1502.

Rasooly, A. 2001. Surface plasmon resonance analysis of staphylococcal enterotoxin B in food. *Journal of Food Protection*, 64, 37-43.

Reglamento 1829/2003/EC, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 268, 18 de octubre de 2003, 1-23.

Reglamento 1830/2003/EC, de 22 de septiembre de 2003, relativa a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de estos, y por el que se modifica la Directiva 2001/187/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 268, 18 de octubre de 2003, 24-28.

Reglamento 2002/178/EC, de 28 de enero de 2002, que establece los principios generales y los requerimientos de la legislación alimentaria, estableciendo la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y estableciendo los procedimientos en materia de seguridad alimentaria. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 31, 1 de febrero de 2002, 1-24.

Reglamento 2004/641/EC, de 6 de abril de 2004, acerca de las normas detalladas para la implementación del Reglamento 2003/1829/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 102, 7 de abril de 2004, 14-26.

Reglamento 2004/65/EC, de 14 de enero de 2004, que establece un sistema para el desarrollo y asignación de identificadores únicos para los organismos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 10, 16 de enero de 2004, 5-10.

Reglamento 97/258/EC de 27 de enero de 1997, relativa a los nuevos alimentos y a los nuevos ingredientes alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 43, 14 de febrero de 1997, 1-6.

Relkin, P., y Launay, B. 1990. Concentration effects on the kinetics of β -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. *Food Hydrocolloids*, 4, 19-32.

Rittenburg, J.H. 1990. Fundamentals of immunoassay. En: *Development and Application of Immunoassays for Food Analysis*, págs. 29-57. Rittenburg, J.H. (Ed.), Elsevier Applied Science, Londres-Nueva York.

Roda, A., Mirasoli, M., Guardigli, M., Michelini, E., Simoni, P., y Magliulo, M. 2006. Development and validation of a sensitive and fast chemiluminiscent enzyme immunoassay for the detection of genetically modified maize. *Annals of Bioanalytical Chemistry*, 384, 1269-1275.

Rolland, J.M., Apostolou, E., de Leon, M.P., Stockley, C.S., y O'Heir, R.E. 2008. Specific and sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for analysis of residual allergenic food proteins in commercial bottled wine fined with egg white, milk, and nongrape-derived tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 349-354.

Saarinen, K.M., Juntunen-Backman, K., Jarvenpaa, A.L., Klemetti, P., Kuitunen, P., Lope, L., Renlund, M., Siivola, M., Vaarala, O., y Savilahti, E. 2000. Breast-feeding and the development of cow's milk protein allergy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 478, 121-130.

Samarajeewa, U., Wei, C.I., Huang, T.S., y Marshall, M.R. 1991. Application of immunoassay in the food industry. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 29, 403-434.

Sampson, H.A. 1990. Food allergy. *Current Opinion in Immunology*, 2, 542-547.

Sampson, H.A., y McCaskill, C.C. 1985. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *Journal of Paediatrics*, 107, 669-675.

Sampson, H.A., y Metcalfe, D.D. 1992. Food allergies. *Journal of American Medical Association*, 268, 2840-2844.

- Sánchez, L., Aranda, P., Pérez, M.D., y Calvo, M. 1988. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Journal of Biological Chemistry*, 369, 1005-1008.
- Sánchez, L., Peiró, J.M., Castillo, H., Pérez, M.D., Ena, J.M., y Calvo, M. 1992. Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin. *Journal of Food Science*, 54(4), 873-879.
- Sánchez, L., Pérez, M.D., Puyol, P., Calvo, M., y Brett, G. 2002. Determination of vegetal proteins in milk powder by enzyme-linked immunosorbent assay: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 85(6), 1390-1397.
- Sanders, P.R., Lee, T.C., Groth, M.E., Astwood, J.D., y Fuchs, R.L. 1998. Safety assessment of insect-protected corn. En: *Biotechnology and Safety Assessment*, págs. 241-256. Thomas, J.A. (Ed.) Taylor and Francis, Londres, Reino Unido.
- Schnepf, H.E., y Whiteley, H.R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 2893-2897.
- Schwartz, R.H. 1992. Allergy, intolerance, and other adverse reactions in foods. *Paediatric Annals*, 21, 654-674.
- Sechi, S., y Chait, B.T. 1998. Modification of cystein residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Analytical Chemistry*, 70, 5150-5158.
- Sims, S.R., y Berberich, S.A. 1996. *Bacillus thuringiensis* CryIA protein levels in raw and processed seed of transgenic cotton: determination using insect bioassay and ELISA. *Journal of Economical Entomology*, 89(1), 247-251.
- Singh, H., y Creamer, L.K. 1991. Denaturation, aggregation and heat stability of milk protein during the manufacture of skim milk powder. *Journal of Dairy Research*, 58, 269-283.
- Skerrit, J.H. 2000. Genetically-modified plants: developing countries and the public acceptance debate. *AgBiotechNet*, 2, February, 1-8.

- Slack, A.W., Amundson, C.H., y Hill, C.G. 1986. Nitrogen solubilities of β -lactoglobulin and α -lactalbumin enriched fractions derived from ultrafiltered cheese whey retentate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 10, 19-29.
- Sørensen, I.H. 2008. Spray drying and pre-treatment of dried egg products. Niro A/S. http://www.niro.com/nuk/cmsresources.nsf/filenames/F_286_Egg_Products.pdf, 21/7/2008.
- Spector, A.A., y J.E. Fletcher. 1970. Binding of long-chain fatty acids to β -lactoglobulin. *Lipids*, 5, 403.
- Spreer, E. 1998. Whey and whey utilization. En: *Milk and dairy product technology*, págs. 407-420. Dekker, M. (Ed.), Marcel Dekker Inc., Nueva York, EE.UU.
- Stadelman, W.J., y Cotterill, Q. 1977. Chemistry of eggs and egg products. En: *Egg Science and Technology*, págs. 65-91. Stadelman, W.J. & Cotterill, O.J. (Eds.), AVI, Westport, EE. UU.
- Standing Committee for Foodstuffs. 1997. Report Co-ordinated programme for the official control of foodstuffs for 1997. European Commission, Brussels.
- Stanley-Horn, D., Dively, G.P., Hellmich, R.L., Heather R., Mattila, H.R., Sears, M.K., Rose, R., Jesse, L.C.H., Loseyi, J.E., Obrycki, J.J., y Lewis, L. 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 11931-11936.
- Stave, J.W. 1999. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. *Food Control*, 10, 367-374.
- Stave, J.W. 2002. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations and practical considerations. *Journal of AOAC International*, 85, 780-786.
- Strobel, S., y Hourihane, J. 2001. Gastrointestinal allergy: clinical symptoms and immunological mechanisms. *Pediatric Allergy and Immunology*, 12(14), 43-46.
- Syvanen, M. 1999. In search of horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, 17(9), 833.

- Takahashi, Y., Hori, H., Furuno, H., Kawano, T., Takahashi, M., y Wada, Y. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assays for rapid and quantitative detection of insecticidal crystal proteins of bt pesticides. *Journal of Pesticide Science*, 23, 386-391.
- Tapp, H., y Stotzky, G. 1995. Dot blot enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 602-609.
- Taylor, S.L. 1986. Food allergies. *Food Technology*, 39, 98-105.
- Taylor, S.L., Hefle, S.L., Bindslev-Jensen, Atkins, F.M., André, C., Bruijnzeel-Koomen, C., Burks, A.W., Bush, R.K., Ebisawa, M., Eigenmann, P.A., Høst, A., Hourihane, J.O., Isolauri, E., Hill, D.J., Knulst, A., Lack, G., Sampson, H.A., Moneret-Vautrin, D.A., Rancé, F., Vadas, P.A., Yunginger, J.W., Zeiger, R.S., Salminen, J.W., Madsen, C., y Abbott, P. 2004. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much?. *Clinical and Experimental Allergy*, 34, 689-695.
- Taylor, S.L., Hefle, S.L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S.A., Burks, A.W. Jr., Christie, L., Hill, D.J., Høst, A., Hourihane, J.O., Lack, G., Metcalfe, D.D., Moneret-Vautrin, D.A., Vadas, P.A., Rancé, F., Skrypec, D.J., Trautman, T.A., Yman, I.M., y Zeiger, R.S. 2002. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much?. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109, 24-30.
- Taylor, S.L., Lemanske, R.F., Bush, R.K., y Busse, W.W. 1987. Food allergens: structure and immunologic properties. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 59, 93-99.
- Taylor, S.L., y Hefle, S.L. 2001. Will genetically modified foods be allergenic? *Current Reviews of Allergy and Clinical Immunology*, 107, 765-771.
- 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.
- Terry, C.F., Harris, N., y Parkes, H.C. 2002. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC International*, 85(3), 768-774.

Terzy, V., Morcia, C., Gorrini, A., Stanca, A.M., Cegrí, P.R., y Faccioli, P. 2005. DNA-based methods for identification and quantification of small grain cereal mixtures and fingerprinting of varieties. *Journal of Cereal Science*, 41, 213-220.

Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., y Kawase, K. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, 74(12), 4137-4142.

Urisu, A., Ando, H., Morita, Y., Wada, E., Yakasi, T., Yamada, K., Komada, K., Torii, S., Goto, M., y Wakamatsu, T. 1997. Allergenic activity of heated and ovomucoid depleted egg white. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100, 171-176.

Van den Bulcke, M., De Schrijver, A., De Bernardi, D., Devos, Y., MbongoMbella, G., Casi, A.L., Monees, W., y Sneyers, M. 2007. Detection of genetically modified products by protein strip testing: an evaluation of real-life samples. *European Food Research and Technology*, 225, 49-57.

Van Hengel, A.J., Capelletti, C., Brohee, M., y Anklam, E. 2006. Validation of two commercial lateral flow devices for the detection of peanut proteins in cookies: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 89(2), 462-468.

Van Herwijnen, R. 2006. The use of lateral flow devices to detect food allergens. En: *Detecting Allergens in Foods*, págs. 175-181. Koppelman, S.J & Hefle, S.L. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.

Van Regenmortel, M.H.V. 1992. Molecular dissection of protein antigens. En: *Structure of antigens. I*, págs. 1-28. Van Regenmortel, M.H.V. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EE. UU.

Varnam, A.H., y Sutherland, J.P. 1994. Dairy protein products. En: *Milk and milk products. Technology, chemistry and microbiology*, págs. 159-182. Chapman, E. & Hall, W. (Eds.), Londres, Reino Unido.

- Vázquez, R.I., Prieto, D., de la Riva, G.A., y Selman-Housein, G. 1996. Development of an immunoradiometric assay for the quantitative determination of Cry1A(b) protein in transgenic sugarcane plants. *Journal of Immunological Methods*, 196, 33-39.
- Venien, A., D. Levieux, C. Astier, L. Briand, J.M. Chobert, y T. Haertle. 1997. Production and epitopic characterization of monoclonal antibodies against β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 80, 1977-1987.
- Vieths, S., Scheurer, S., y Ballmer-Weber, B. 2002. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964, 47-68.
- Volpe, G., Ammid, N.H., Moscone, D., Occhigrossi, L., y Palleschi, G. 2006. Development of an immunomagnetic electrochemical sensor for detection of Bt-Cry1Ab/Cry1Ac proteins in genetically modified corn samples. *Analytical Letters*, 39(8), 1599-1609.
- Wal, J.M. 1998. Cow's milk allergens. *Allergy*, 53, 1013-1022.
- Walschus, U., Witt, S., y Wittmann, C. 2002. Development of monoclonal antibodies against Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* and their application in an ELISA for detection of transgenic Bt-maize. *Food and Agricultural Immunology*, 14, 231-240.
- Walsh, B.J., Elliott, C., Baker, R.S., Barnett, D., Burley, R.W., Hill, D.J., y Howden, M.E. 1987. Allergenic cross-reactivity of egg-white and egg-yolk proteins. An *in vitro* study. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 84, 228-232.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., y van Boekel, M.A.J.S. 2001. Componentes de la leche: Proteínas. En: *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*, págs. 73-95. Acribia (Ed.), Zaragoza, España.
- Wang, C., y Shelef, L.A. 1991. Factors contributing to antilysterial effects of raw egg albumen. *Journal of Food Science*, 56, 1251-1254.
- Watanabe, H., Kai, S., Mitani, T., Yokoyama, H., y Kishi, M. 2005a. Study of detection of allergenic substances (egg and milk) in processed meat products and frozen foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 46(4), 139-147.

- Watanabe, Y., Aburatani, K., Mizumura, T., Sakai, M., Muraoka, S., Mamegosi, S., y Honjoh, T. 2005b. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. *Journal of Immunological Methods*, 300, 115-123.
- Wehbi, Z., M.D. Pérez, L. Sánchez., C. Pocoví, C. Barbana, and M. Calvo. 2005. Effect of heat treatment on denaturation of bovine alpha-lactalbumin: determination of kinetic and thermodynamic parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9730-9736.
- Wen, H.W., Borejsza-Wysocki, W., DeCory, T.R., y Durst, R.A. 2005. Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1. *Annals of Bioanalytical Chemistry*, 382, 1217-1226.
- Wiedemann, S., Lutz, B., Kurtz, H., Schwarz, F.J., y Albrecht, C. 2006. *In situ* studies on the time-dependent degradation of recombinant corn DNA and protein in the bovine rumen. *Journal of Animal Science*, 84, 135-144.
- Winiarska-Mieczan, A., y Kwiecién, M. 2007. Avian's egg white ovomucoid as food-allergen for human. *Postepy Biochemi*, 53(3), 212-217.
- Yamasaki, M., Takashashi, N., y Hirose, M. 2003. Cristal structure of S-ovalbumin as a Non-loop-inserted thermostabilized serpin form. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (37), 35524-35530.
- Yeung, J. 2006. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs) for detecting allergens in foods. En: *Detecting Allergens in Foods*, págs. 109-124. Koppelman, S.J. Hefle, & S.L. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- Yeung, J., Newsome, H., y Abbott, M. 2000. Determination of egg proteins in food products by enzyme immunoassay. *Journal of AOAC International*, 83, 139-143.
- Ylitalo, L., Mäkinen-Kiljunen, S., Turjanmaa, K., Palosuo, T, y Reunala, T. 1999. Cow's milk casein, a hidden allergen in natural rubber latex gloves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, 177-180.

Zarkadas, M., Scott, F.W., Slaminene, J., y Pong, A.H. 1999. Common allergenic foods and their labelling in Canada. A review. *Canadian Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 4(3), 118-141.

Zeiger, R.S. 1985. Atopy in infancy and early childhood: Natural history and role of skin testing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 75, 633-639.

