

# Cuantificación de trazas de soja con *kits* de ELISA en galletitas y productos extrudidos

*Soya traces quantification in cookies and extruded products with ELISA kits*

*Quantificação de traços de soja com kits de ELISA em biscoitos e produtos extrusados*

► Maria Julieta Binaghi<sup>1a</sup>, Carola Beatriz Greco<sup>1a</sup>, María Eugenia Martín<sup>2a</sup>,  
Silvina Rosa Drago<sup>1b</sup>, Patricia Ana Ronayne de Ferrer<sup>1a</sup>, Laura Beatriz López<sup>1a</sup>

---

<sup>1</sup> Doctora en Bioquímica.

<sup>2</sup> Bioquímica.

Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Bromatología. Buenos Aires, Argentina.

Instituto de Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

El artículo 235 séptimo se publicó en el boletín oficial el 9/10/17 y será incorporado al capítulo V del CAA.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## Resumen

Se evaluó la detección de trazas de soja en sistemas modelo (SM) de galletitas y extrudidos que contenían 5000, 250, 100, 50, 25, 10, 5 y 0 ppm de concentrado de proteína de soja (CPS). Se analizaron, además, dos lotes diferentes de ocho clases de galletitas comerciales y dos tipos de extrudidos que declaraban la presencia de soja a través de la frase "Contiene ..." o a través de frases de advertencia. La determinación de proteínas de soja se realizó utilizando tres *kits* ELISA (R-Biopharm, Neogen-Veratox y Romer). Solo el *kit* de R-Biopharm permitió la cuantificación de soja a partir de 25 ppm de CPS en galletitas y a partir de 5 ppm de CPS en productos extrudidos. Los otros dos *kits* resultaron menos sensibles. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de los SM de galletitas y de productos extrudidos con diferentes *kits* comerciales se concluye que debe estudiarse el desempeño de cada *kit* para cada alérgeno y para cada matriz en particular. Esto permitiría establecer cuál es el método más adecuado para el control de los productos comerciales a los fines de evaluar la correcta declaración de alérgenos en los respectivos rótulos.

**Palabras claves:** alérgenos \* soja \* galletitas \* productos extrudidos \* ELISA

## Abstract

Detection of traces of soy was evaluated in cookies and extruded product model systems (MS) containing 5000, 250, 100, 50, 25, 10, 5 and 0 ppm of soy protein concentrate (SPC). Besides, two different batches of eight different types of commercial cookies and two types of extruded products declaring soy presence through either the statement: "Contains..." or precautionary phrases were analyzed. Soy protein determination was carried out using three different commercial ELISA kits (R-Biopharm, Neogen-Veratox and Romer). Only the R-Biopharm kit allowed quantification of soy from 25 ppm of SPC in cookies and from 5 ppm of SPC in the extruded products. The other two kits had lower sensitivity.

*According to the results obtained in the analysis of cookies and extruded product MS with different commercial kits, it can be concluded that the performance of every kit should be studied for all allergens and each particular food matrix. This would enable establishing the most suitable method for commercial products control, in order to assess the correct allergen labeling.*

**Keywords:** *allergens \* soy \* cookies \* extruded products \* ELISA*

## Resumo

*Avaliou-se a detecção de traços de soja em sistemas modelo (SM) de biscoitos e extrusados que continham 5000, 250, 100, 50, 25, 10, 5 e 0 ppm de concentrado de proteína de soja (CPS). Analisaram-se, também dois lotes diferentes de oito tipos de biscoitos comerciais e dois tipos de extrusados que declaravam a presença de soja através da frase "Contém... ou através de frases de advertência. A determinação de proteínas de soja foi realizada utilizando três kits ELISA (R-Biopharm, Neogen-Veratox e Romer). Apenas o kit de R-Biopharm permitiu a quantificação de soja a partir de 25 ppm de CPS em biscoitos e de a partir de 5 ppm de CPS em produtos extrusados. Os outros dois kits resultaram menos sensíveis. De acordo com os resultados obtidos na análise dos SM de biscoitos e de produtos extrusados com diferentes kits comerciais conclui-se que é preciso estudar o desempenho de cada kit para cada alérgeno e para cada matriz em particular. Isto permitiria estabelecer qual é o método mais adequado para o controle dos produtos comerciais viado avaliar a correta declaração de alérgenos nas respectivas etiquetas.*

**Palavras-chave:** *alérgenos \* soja \* biscoitos \* produtos extrusados \* ELISA*

## Introducción

Las alergias alimentarias constituyen un problema creciente, tanto en los países desarrollados como en los países emergentes. En las últimas décadas, la prevalencia de las alergias a alimentos ha aumentado considerablemente y este tema constituye un desafío, tanto desde el punto de vista clínico como para la industria de alimentos (1). Si bien en Argentina no existen estudios que permitan determinar su prevalencia se calcula que el 6% de los niños menores de 3 años y el 3% de la población general las padece. Existen 8 grupos de alimentos que son responsables del 90% de las alergias alimentarias. Estos alimentos son: leche, huevo, soja, trigo, maní, frutos secos, pescado y mariscos (2-4).

En Argentina en 2010 se incorporó en el artículo 235 séptimo del Código Alimentario Argentino (CAA) la Declaración obligatoria de los componentes alérgenos (los grandes ocho y sulfitos) en el rótulo de los alimentos (5). Sin embargo, en 2011 se suspendió dicho artículo hasta tanto la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) elaborase una propuesta de adecuación del artículo mencionado (6). En junio de 2016 el Instituto Nacional de Alimentos (INAL) presentó ante la CONAL un nuevo documento que estuvo en consulta pública hasta el 8 de julio del mismo año. Dicho documento fue modificado en función de los comentarios recibidos y actualmente se encuentra en trámite administrativo. Una vez publicado en el boletín oficial, la industria dispondrá de un año para adaptarse a la nueva reglamentación (7). Dicho documento contempla fundamentalmente a los grandes ocho, dióxido de azufre y sulfitos. Establece que dichas sustancias se deberán declarar a continuación de la frase "Contiene ... y/o Contiene

derivados de ...". Además, cuando una de estas sustancias no forme parte de los ingredientes del alimento, pero exista la posibilidad de contaminación accidental durante el proceso de elaboración, aun habiendo aplicado las buenas prácticas de manufactura (BPM) debe constar en el rótulo la expresión: "Puede contener: ... " seguido del nombre de la sustancia y/o "derivados de..." completando el espacio según corresponda, a continuación de la frase "Contiene: ...", si corresponde. Para autorizar el uso de la frase de advertencia la empresa deberá presentar ante la Autoridad Sanitaria una nota con carácter de declaración jurada que consigne la siguiente frase "que aun habiendo aplicado las BPM, existe la posibilidad de contaminación durante el proceso de elaboración debido a.... ", completando con la correspondiente justificación que demuestre tal condición, quedando a criterio de la Autoridad Sanitaria la aprobación de uso de la frase de advertencia de conformidad con el párrafo anterior.

La República Argentina es uno de los mayores productores de soja en el mundo, lo que contribuye al posible contacto cruzado con los demás granos producidos en el país. Además, en las últimas décadas la industria alimentaria aumentó considerablemente el uso de soja como ingrediente en la elaboración de diferentes alimentos: fiambres, embutidos, panificados, caramelos, helados, postres, salsas, entre otros. El CAA establece que, como información obligatoria, debe figurar en la rotulación de alimentos envasados la lista de ingredientes, los que deberán enumerarse en orden decreciente de peso inicial. Los aditivos alimentarios están incluidos dentro del concepto de ingredientes (8). Sin embargo, no todos los rótulos presentan completa su lista de ingredientes; en particular, en productos cárnicos muchas veces se ha detectado

la presencia de proteínas de soja no declaradas en la lista de ingredientes (9).

La mayor preocupación para los individuos alérgicos a la soja reside en la posibilidad de consumir alimentos que presenten soja por contacto cruzado. Este ocurre en el transporte o almacenamiento de la materia prima, pero también puede ocurrir cuando se comparten las maquinarias de elaboración y de envasado con productos con soja como ingredientes.

En Argentina los organismos de control y los productos de alimentos requieren metodologías accesibles para la identificación y cuantificación de materias primas proteicas alergénicas, en una amplia gama de alimentos que deberían ser controlados. Los *kits* comerciales de ELISA resultan sencillos para su utilización en laboratorios de control de alimentos. Sin embargo, su costo es muy elevado y es imprescindible recurrir a diversos *kits* para las distintas materias primas que se deben controlar (10). Por otra parte, es necesario establecer el desempeño de los diferentes *kits* para cada uno de los alérgenos en cuestión en diferentes matrices alimentarias (11) (12).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desempeño de tres *kits* de ELISA comerciales, disponibles en el mercado, para la detección/cuantificación de proteínas de soja. Para ello se eligieron como matrices dos productos que reciben en su proceso de elaboración un tratamiento térmico severo. Se analizaron sistemas modelo de galletitas y de productos extrudidos, con concentraciones bajas y conocidas de soja. Además, se analizaron productos comerciales correspondientes a galletitas y productos extrudidos, que declaraban la presencia de soja a través de la frase "Contiene ..." o a través de frases de advertencia, con el fin de verificar la correcta declaración de alérgenos de soja.

## Materiales y Métodos

Las muestras analizadas comprendían a sistemas modelos de galletitas de harina de arroz, libres de gluten, elaboradas en la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA y sistemas modelo de productos extrudidos de sémola de maíz, elaborados en el Instituto de Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional del Litoral.

Además, se analizaron diferentes tipos de productos comerciales, los cuales fueron adquiridos de manera aleatoria en supermercados de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. De cada uno de ellos se analizaron dos lotes diferentes.

### SISTEMAS MODELOS

**Galletitas:** las galletitas fueron elaboradas con los ingredientes detallados en la Tabla I. Se elaboraron dos clases de galletitas: G, sin agregado de alérgenos y GS 5000, con agregado de 5000 ppm de concentrado de proteína de soja. Ambas clases de galletitas fueron horneadas durante 9 min 30 s en un horno a 250–255 °C. La temperatura alcanzada en el interior de las galletitas fue 100 °C.

A partir de las mezclas de dichas galletitas en diferentes proporciones se prepararon los sistemas modelo.

**Productos Extrudidos:** los productos extrudidos fueron elaborados con los ingredientes detallados en la Tabla II. Se elaboraron dos clases de productos extrudidos: E, sin agregado de alérgenos y ES5000, con agregado de 5000 ppm de concentrado de proteína de soja. A continuación, se detallan las condiciones de extrusión: sémola humectada a 14% de humedad, Extrusor

Tabla I. Resultados del contenido de soja en sistemas modelo de galletitas utilizando tres kits comerciales de ELISA.

Sistemas Modelo	ppm concentrado de soja	ppm proteína de soja	Ingredientes	Resultados kit R-Biopharm (ppm proteínas de soja)	Resultados kit Veratox-Neogen (ppm aislado de proteína de soja)	Resultados kit Romer (ppm inhibidor de tripsina de soja)
GS 5000	5000	3414	Harina de arroz, almidón de mandioca, azúcar, goma xántica, bicarbonato de sodio, margarina, jugo de limón, esencia de vainilla, agua, concentrado de soja	>20,0	<10	NA
GS 250	250	171		16,6	<10	NA
GS 100	100	68		5,7	<10	NA
GS 50	50	34		4,1	<10	<40
GS 25	25	17		2,6	<10	<40
GS 10	10	7		<2,5	<10	<40
G	0	0	Harina de arroz, almidón de mandioca, azúcar, goma xántica, bicarbonato de sodio, margarina, jugo de limón, esencia de vainilla y agua.	<2,5	<10	< 40

NA: no analizado

Tabla II. Resultados del contenido de soja en sistemas modelo de productos extrudidos utilizando tres kits comerciales de ELISA.

Sistemas Modelo	ppm concentrado de soja	ppm proteína de soja	Ingredientes	Resultados kit R-Biopharm (ppm proteínas de soja)	Resultados kit Veratox-Neogen (ppm aislado de proteína de soja)	Resultados kit Romer (ppm inhibidor de tripsina de soja)
ES 5000	5000	3414	Sémola de maíz comercial, concentrado de soja	>20,0	<10	>1000,0
ES 250	250	171		>20,0	<10	NA
ES 100	100	68		>20,0	<10	NA
ES 50	50	34		>20,0	<10	46,3
ES 10	10	7		8,6	<10	44,5
ES 5	5	3		<b>7,5</b>	<10	<b>43,4</b>
E	0	0	Sémola de maíz comercial	<2,5	<10	<40,0

NA: no analizado.

Brabender 10 DN, tornillo con relación de compresión 3:1 y velocidad del tornillo 150 rpm; temperatura de extrusión 160 °C.

El concentrado de soja utilizado tanto en la elaboración de las galletitas así como de los productos extrudidos, contenía 68,3% de proteínas totales (método de Kjeldahl).

A partir de las mezclas de los productos elaborados, en diferentes proporciones, se prepararon los sistemas modelo. Los sistemas modelo de galletitas así como los sistemas modelo de productos extrudidos contenían 5000, 250, 100, 50, 10, 5 y 0 ppm de concentrado de proteína de soja.

#### PRODUCTOS COMERCIALES

Se analizaron seis tipos diferentes de galletitas dulces, galletitas tipo crackers, galletitas sin sal agregada, papas fritas y producto extrudido con harina de maíz. Se analizaron dos lotes diferentes de cada producto.

A continuación se detalla la lista de ingredientes de cada producto analizado.

**\*Galletitas dulces:** Harina de trigo enriquecida, azúcar, grasa vacuna refinada, almidón, harina de sorgo, jarabe de maíz de alta fructosa, sal, aceite de girasol alto oleico, leudantes químicos: bicarbonato de amonio (INS 503ii), bicarbonato de sodio (INS 500ii), emulsionante: lecitina de soja (INS 322); aromatizante artificial (ARO): vainilla, aromatizante idéntico al natural: almendra, aromatizante natural: limón, colorante: beta-caroteno (INS 160a(i)).

**\*Galletitas dulces sabor chocolate:** Harina de trigo enriquecida, azúcar, grasa vacuna refinada, cacao en polvo, jarabe de maíz de alta fructosa, sal, leudantes químicos: bicarbonato de amonio (INS 503ii), bicarbonato de sodio (INS 500ii), fosfato monocálcico (INS 341i), colorante: caramelo (INS 150c), aromatizante idéntico al natural: vainillina, emulsionante: lecitina de soja (INS 322).

**\*Galletitas dulces con dulce de membrillo:** Harina de trigo enriquecida; dulce de membrillo; azúcar; grasa bovina; huevo; jarabe de glucosa; sal; leudante químico: bicarbonato de amonio; emulsionante: lecitina de soja/soya; colorantes: cúrcuma (E100), carmín (E120), aromatizante artificial: vainillina.

**\*Galletitas con sabor vainilla fortificadas con vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, D, hierro, zinc para niños a partir de un año:** Harina de trigo enriquecida, jugo concentrado de uva, aceite de girasol alto oleico, almidón de maíz, pulpa de ciruela, sulfato ferroso, sulfato de zinc, vitaminas (A, D, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>), RAI: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, ARO: vainilla natural.

**\*Galletitas a base de harina de trigo y banana, con sabor banana fortificadas con vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, D, hierro, zinc, para niños en la primera infancia:** Harina de trigo enriquecida, jugo concentrado de uva, aceite de girasol alto oleico, almidón de maíz, puré de banana deshidratado, sulfato ferroso, sulfato de zinc, vitaminas (A, D, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>), RAI: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, ARO: banana natural.

**\*Galletitas con sabor manzana fortificadas con vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, D, hierro, zinc para niños a partir de un año de edad:** Harina de trigo enriquecida, jugo concentrado de uva, aceite de girasol alto oleico, almidón de maíz, pulpa de manzana, sulfato ferroso, sulfato de zinc, vitaminas (A, D, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>), RAI: bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio, ARO: manzana natural.

**\*Galletitas/ Crackers:** Harina de trigo enriquecida; grasa bovina; sal; jarabe de glucosa; levadura; leudante químico: bicarbonato de sodio; emulsionante: lecitina de soja/soya.

**\*Galletitas sin sal agregada:** Harina de trigo enriquecida; grasa bovina; extracto de malta; jarabe de glucosa; levadura; leudantes químicos: bicarbonato de potasio, bicarbonato de sodio; emulsionante: lecitina de soja/soya.

**\*Papas Fritas:** Papa, aceite vegetal, sal.

**\*Tubitos de harina de maíz con sabor a queso:** Tubitos de harina de maíz (harina de maíz, almidón modificado, azúcar, sal, regulador de acidez: INS 500ii, emulsionante: INS 471), aceite vegetal, saborizante queso (sal, resaltadores de sabor: INS 621, INS 631, INS 627, colorantes: INS 110 (Amarillo crepúsculo), INS 150a.

#### PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se realizó un muestreo de tipo estratificado de cada uno de los alimentos analizados. Todas las muestras fueron homogeneizadas en molino de cuchillas marca RetschR modelo Grindomix GM200 hasta una granulometría de 35 *mesh*.

#### MÉTODOS EMPLEADOS PARA EL ANÁLISIS

Se realizó la determinación de alérgenos de soja utilizando tres *kits* comerciales de ELISA. El *kit* R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Soya, el *kit* Neogen Veratox® For Soy Allergen y el *kit* Romer AgraQuant® Soy Assay. La extracción del alérgeno soja así como el procedimiento del ELISA se realizaron de acuerdo con los protocolos de trabajo de cada uno de los *kits* comerciales (13-15).

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

El *kit* R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Soya presenta un límite de detección de 0,31 ppm de proteína de soja y un límite de cuantificación de 2,5 ppm de proteína de soja. El resultado final se expresa en ppm de proteínas de soja.

El *kit* Neogen Veratox® For Soy Allergen presenta un límite de cuantificación de 10 ppm de aislado de proteína de soja. El resultado final se expresa en ppm de aislado de proteína de soja.

El *kit* Romer AgraQuant® Soy Assay presenta un límite de detección de 16 ppb de Inhibidor de Tripsina de soja y un límite de cuantificación de 40 ppb de Inhibidor de Tripsina de soja. El resultado final se expresa en ppb de inhibidor de tripsina de soja.

## Resultados

En la Tabla I se presentan los resultados del contenido de soja en los sistemas modelo de galletitas con agregado de concentrado de soja como alérgeno utilizando los *kits* de R-Biopharm, Veratox-Neogen y Romer. Se observa que solo el *kit* de R-Biopharm permite la cuantificación de soja a partir de 25 ppm de concentrado de soja agregada a galletitas. El *kit* Veratox-Neogen no permitió la detección/cuantificación de soja ni siquiera en la mayor concentración analizada (5000 ppm de concentrado de soja). El *kit* de Romer no permitió la detección/cuantificación en la mayor concentración ensayada con este *kit* (50 ppm concentrado de soja).

En la Tabla II se presentan los resultados del contenido de soja en los sistemas modelo de los productos extrudidos con agregado de concentrado de soja como alérgeno utilizando los *kits* de R-Biopharm, Veratox-Neogen y Romer. Se puede observar que los *kits* de R-Biopharm y de Romer permiten la cuantificación de soja a partir de 5 ppm de concentrado de soja agregado a producto extrudido mientras que el *kit* Veratox-Neogen ni siquiera la detecta en la mayor concentración analizada (5000 ppm de concentrado de soja).

En la Tabla III se presentan los resultados del contenido de soja obtenidos en las muestras comerciales con el *kit* de R-Biopharm. Los productos comerciales solo se analizaron con este *kit* ya que resultó el más sensible en las matrices analizadas.

Siete de las ocho muestras de galletitas presentaron trazas de soja en concentraciones que oscilaron entre 3,1 y 19,2 ppm de proteínas de soja. Solo un lote de galletitas dulces sabor chocolate presentó un valor por debajo del límite de cuantificación del *kit*. En los productos extrudidos se observó que las papas fritas (que no declaraban presencia de soja) presentaron en ambos lotes valores por debajo del límite de cuantificación del *kit*, mientras que en los tubitos de harina de maíz en ambos lotes se cuantificaron trazas de soja.

## Discusión y Conclusiones

Por ser las galletitas y los productos extrudidos alimentos sometidos a procesados que pueden implicar modificaciones en las proteínas alérgicas presentes, resulta necesario realizar el agregado del alérgeno en cuestión a los sistemas modelo antes de dicho tratamiento.

El procesamiento de los alimentos puede generar que el alérgeno sea desnaturalizado, hidrolizado, precipite o se agregue a otros componentes de alimento (16). Por este motivo su detección puede verse afectada.

Como se observó en las Tablas I y II se encontraron diferencias en la detección de las proteínas de soja al comparar las galletitas y los productos extrudidos con los diferentes *kits*. En ambos casos, el *kit* Veratox-Neogen fue incapaz de detectar/cuantificar soja incluso en la mayor concentración analizada (5000 ppm de concentrado de soja). En las galletitas, el *kit* de R-Biopharm resultó más sensible que el de Romer, ya que el primero permitió la cuantificación de soja a partir del SM de 25 ppm mientras que el de Romer la permitió a partir del SM de 50 ppm de concentrado de soja.

En los productos extrudidos tanto el *kit* de R-Biopharm como el de Romer permitieron la cuantificación de soja a partir de los SM de 5 ppm de concentrado de soja.

La diferencia observada en la sensibilidad de los *kits* en estas matrices podría deberse a que los tratamientos que sufren las galletitas en su cocción o los productos

Tabla III. Resultados del contenido de soja, en dos lotes de galletitas y productos extrudidos comerciales, utilizando un kit comercial de ELISA.

Denominación de venta	Declaración de alérgenos	Frases de advertencia	Resultados kit R-Biopharm (ppm proteínas de soja)
Galletitas dulces	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo y de soja.	Este producto se elabora en un equipo que procesa leche y huevo.	Lote 1: 6,6 Lote 2: 18,0
Galletitas dulces sabor chocolate	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo y de soja.	Este producto se elabora en un equipo que procesa leche y huevo.	Lote 1: <2,5 Lote 2: 5,4
Galletitas dulces con dulce de membrillo	Contiene: trigo, gluten, huevo, soja/soya.	Contiene trazas de almendra, avena, cebada, centeno, leche, maní/cacahuete/cacahuete y sésamo.	Lote 1: 9,8 Lote 2: 11,2
Galletitas con sabor vainilla fortificadas con vitaminas A, B1, B2, B3, B5, B6, B9, D, hierro, zinc para niños a partir de un año.	Contiene ingredientes de gluten.	Elaborado en una línea donde se procesan productos con ingredientes de leche, maní, soja, huevo y almendras.	Lote 1: 3,1 Lote 2: 4,6
Galletitas a base de harina de trigo y banana, con sabor banana fortificadas con vitaminas A, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, D, hierro, zinc, para niños en la primera infancia.	Contiene ingredientes de gluten.	Elaborado en una línea donde se procesan productos con ingredientes de leche, maní, soja, huevo y almendras.	Lote 1: 3,2 Lote 2: 3,2
Galletitas con sabor manzana fortificadas con vitaminas A, B1, B2, B3, B5, B6, B9, D, hierro, zinc para niños a partir de un año de edad.	Contiene ingredientes de gluten.	Elaborado en una línea donde se procesan productos con ingredientes de leche, maní, soja, huevo y almendras.	Lote 1: 3,6 Lote 2: 13,6
Galletitas / Crackers	Contiene: trigo, gluten, soja/soya.	Contiene trazas de almendra, avena, cebada, centeno, huevo, leche, maní/cacahuete/cacahuete y sésamo.	Lote 1: 19,2 Lote 2: 7,3
Galletitas sin sal agregada	Contiene: trigo, gluten, cebada, soja/soya.	Contiene trazas de almendra, avena, centeno, huevo, leche, maní/cacahuete/cacahuete y sésamo.	Lote 1: 8,2 Lote 2: 17,5
Papas fritas		Contiene trazas de gluten, maní y derivados lácteos.	Lote 1: <2,5 Lote 2: <2,5
Tubitos de harina de maíz con sabor a queso	Contiene derivados lácteos, soja.	Puede contener trazas de gluten, maní.	Lote 1: 7,4 Lote 2: 17,4

extrudidos en su elaboración afectarían de manera diferente a las proteínas de soja presentes. Los tratamientos producen cambios en la solubilidad proteica y también modificaciones en la estructura de las proteínas presentes. Esto puede afectar el reconocimiento de las proteínas por parte de los anticuerpos primarios utilizados, generando una deficiencia en su detección y/o cuantificación. Evidentemente esto ocurre con el *kit* Veratox-Neogen con el que no es posible la cuantificación de soja aún en la mayor concentración ensayada. Este mismo *kit* permite la cuantificación de proteínas de soja en sistemas modelo de productos cárnicos crudos y cocidos a partir de 250 ppm de aislado proteico de soja (17). Esto pone en evidencia que el tratamiento térmico y la matriz del alimento pueden afectar considerablemente el desempeño del *kit*.

Cuando se evalúan los resultados cuantitativos obtenidos con el *kit* de R-Biopharm tanto en galletitas como

en productos extrudidos, se observa que los mismos son muy diferentes a los valores reales agregados. Se observa una subcuantificación de la cantidad de proteína de soja en las galletitas y una sobrecuantificación de la cantidad de proteína de soja en los productos extrudidos. Lamentablemente, este análisis no se puede realizar con los resultados cuantitativos obtenidos con el *kit* de Romer ya que el mismo expresa sus resultados en ppb de inhibidor de tripsina de soja.

Como ya se mencionó, en alimentos procesados puede ocurrir que las proteínas se desnaturalicen, que se modifique la solubilidad de las mismas y que se altere la interacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, el método de ELISA es considerado adecuado para detectar soja en alimentos. Lo más importante a tener en cuenta es que los resultados de esta técnica no deben ser considerados cuantitativos, sino semi-cuantitativos o cualitativos en el caso de alimentos procesados (18).

Durante la elaboración de los alimentos la inmunorreactividad de las proteínas de los mismos puede verse disminuida o aumentada. Los cambios observados en la inmunorreactividad son: inactivación o destrucción de las estructuras de los epítopes, formación de nuevos epítopes o generación de un mejor acceso a los epítopes dado por la desnaturalización del alérgeno nativo (19). Todos estos cambios anteriormente descriptos producidos en un alimento procesado, tratado térmicamente, explican los diferentes resultados obtenidos.

En cuanto a los resultados obtenidos en los sistemas modelo con los *kits* comerciales, no se pueden comparar los diferentes valores hallados, ya que existen diversas variables que llevan a obtener resultados diferentes entre los distintos *kits* comerciales. Estas variables son: productos utilizados para obtener la curva estándar que varían entre *kits*, diferentes soluciones de extracción utilizadas que hacen que la extracción sea distinta entre los distintos *kits* (por ejemplo: buffer fosfato, agregado de mercaptoetanol, etc.), unidades informadas (ppm de proteína de soja, ppm aislado de proteína de soja, ppb de inhibidor de tripsina de soja), especificidad del anticuerpo, habilidad del anticuerpo a unirse a proteínas según el procesamiento que ha sufrido el alimento (20). Así, por ejemplo, en el caso de los sistemas modelo analizados, los resultados obtenidos con los *kits* utilizados se informan con diferentes unidades, por lo que no resulta posible comparar los resultados obtenidos. Sería conveniente que los fabricantes de los *kits* comerciales, en principio, unificaran las unidades de expresión para facilitar la comparación entre los resultados obtenidos con cada uno de ellos (21).

En las muestras comerciales se observa que casi todos los lotes analizados contienen trazas de soja. Solo las papas fritas presentaron valores por debajo del límite de cuantificación del *kit* en ambos lotes. Cabe recordar que dicha muestra no declaraba soja ni como ingrediente ni en una frase de advertencia.

Cinco de las muestras analizadas (galletitas dulces, galletitas dulces sabor chocolate, galletitas dulces con dulce de membrillo, galletitas/*Crackers* y galletitas sin sal agregada) declaraban lecitina de soja en sus listas de ingredientes y todas ellas declaraban "Contiene soja". Esta declaración resulta correcta puesto que la lecitina de soja no constituye una de las excepciones a los productos de soja de declaración obligatoria, y por lo tanto, todo alimento que contiene esta lecitina debe declarar "Contiene soja" en su declaración de alérgenos (7). Esto debe cumplirse aun cuando los valores de proteína de soja hallados sean muy bajos, como los obtenidos en el presente trabajo.

Otras tres galletitas (sabor a vainilla, con sabor banana, con sabor manzana) presentan una frase de advertencia. En ambos lotes de estas galletitas se detectaron trazas de soja lo que indicaría que es correcto el uso de la frase de advertencia, siempre y cuando la empresa

cuenta con un plan adecuado de control de alérgenos.

Por último, la muestra Tubitos de harina de maíz no declara ningún ingrediente de soja pero declara "Contiene soja" en su declaración de alérgenos. Se desconoce el origen de esta declaración pero podría deberse a la presencia del saborizante queso. Muchas veces los saborizantes utilizados contienen proteínas alérgicas en su composición, por ejemplo proteínas lácteas o proteínas de soja (Ing. Luisa Acosta, Comunicación personal)

Para realizar una correcta declaración de alérgenos en los rótulos es fundamental que las industrias implementen un plan eficaz de control de alérgenos en las plantas elaboradoras. Para llevar a cabo este plan es necesario tener en cuenta conceptos como los de gestión de alérgenos alimentarios y seguridad alimentaria.

El enfoque de la industria ha ido mejorando en relación a la existencia de las BPM asegurando la segregación de ingredientes alérgicos y la declaración sistemática de alérgenos en los rótulos. Sin embargo, aún queda mucho por hacer para minimizar el riesgo de contaminación y para proporcionar a los consumidores alérgicos mayor seguridad mediante la comunicación correcta en el etiquetado.

Ante la falta de conocimiento acerca de los niveles de alérgenos requeridos para provocar reacciones adversas, muchos fabricantes han adoptado un enfoque supuestamente "a prueba de fallos" mediante el etiquetado de precaución. Inicialmente acogido como útil por los consumidores alérgicos, el uso cada vez mayor e inconsistente de este tipo de advertencia ha disminuido considerablemente su impacto (22). Este problema ha llevado a los consumidores a que cada vez tomen menos en cuenta las declaraciones precautorias de los rótulos y de esa manera y en forma personal hagan las consultas a las empresas o directamente reduzcan ampliamente la variedad de su dieta.

La presentación de las frases de advertencia debe ser clara, inequívoca y consistente para los consumidores. Si el etiquetado precautorio se usa correctamente implica una reducción del riesgo muy importante y una gran herramienta de comunicación. Sin embargo, la experiencia indica que se enumera una larga lista de alérgenos como posibles contaminantes y muchos de ellos ni siquiera entran a las plantas. Si se realizara una declaración responsable se podría aumentar la cantidad de alimentos disponibles para las poblaciones afectadas (23).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de los sistemas modelo de galletitas y de productos extrudidos con diferentes *kits* comerciales se concluye que debe estudiarse el desempeño de cada *kit* para cada alérgeno y para cada matriz en particular. Esto permitiría establecer cuál es el método más adecuado para el control de los productos comerciales a los fines de controlar la correcta declaración de alérgenos en los respectivos rótulos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por UBACyT 20020120100175BA y UBACyT 20020130100520BA.

## CORRESPONDENCIA

Dra. MARÍA JULIETA BINAGHI.  
Cátedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica.  
Universidad de Buenos Aires.  
Junín 956. 2° piso. CP1113.  
Teléfono: 54 11 52874204.  
CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina.  
e-mail: jbinaghi@ffyb.uba.ar

## Referencias bibliográficas

- Besler M. Determination of allergens in foods. *TrAC* 2001; 20 (11): 662-72.
- Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam* 2004; 21 (1): 1-31.
- Tsuji H, Kimoto M, Natori Y. Allergens in major crops. *Nutr Res* 2001; 21: 925-34.
- Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Current understanding of Food Allergens. *Ann NY Acad Sci* 2002; 964: 69-85.
- Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_V.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf) (Fecha de acceso: 1 de diciembre de 2016).
- Resolución Conjunta N° 106-2011 y N° 297-2011 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_V.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf) (Fecha de acceso: 1 de diciembre de 2016).
- Acta N° 111 CONAL. 2016. Disponible en: [http://www.conal.gob.ar/actas/Acta\\_111.pdf](http://www.conal.gob.ar/actas/Acta_111.pdf) (Fecha de acceso: 1 de diciembre de 2016).
- Código Alimentario Argentino, actualizado, Capítulo V. 2016. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_V.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf) (Fecha de acceso: 1 de diciembre de 2016).
- López LB, Binaghi MJ, Greco CB, Mambrín MC, Cellierino K, Valencia ME. Salazones y chacinados embutidos secos: detección por electroforesis de especies cárnicas y de proteínas extrínsecas agregadas. *DIAETA* 2010; 28 131: 7-13.
- Cagnasso CE, Martín ME, Cellierino K, Audisio F, Docena G, Polenta G, *et al.* Método electroforético y métodos inmunoquímicos para la detección de proteínas de leche, soja y de huevo en premezclas comerciales. *Rev Chil Nutr* 2014; 41 (4): 412-9.
- Cellierino K, Binaghi MJ, Cagnasso CE, Docena G, López LB. Milk protein detection in raw and cooked meat products using immunochemical methods. *J Food Nutr Sci* 2014; 2 (5): 236-42.
- Cellierino K, Binaghi MJ, Cagnasso CE, Docena G, López LB. Detección de soja en sistemas modelo de fiambres cocidos con soja y en productos cárnicos comerciales utilizando métodos inmunoquímicos. IV Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos: libro de trabajos completos: análisis físicos, químicos y sensoriales. Córdoba 14-16 noviembre de 2012. María Verónica Varoni ... (*et al.*); edición literaria a cargo de María Verónica Varoni (*et al.*) – 1ª ed – Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, 2013. E-Book.
- RIDASCREEN® Fast Soya (Art. Nro.: R7102). R-Biopharm 2016. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/allergens/soya/item/ridascreenfast-soya>, (Fecha de acceso: 1 de diciembre de 2016).
- ELISA Veratox for soy allergen (Código: 8410). Neogen. 2015 Disponible en: <http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/V-Soy.pdf> (Fecha de acceso: 1 de diciembre de 2016).
- AgraQuant Soy Assay de Romer (COKAL 0448), 2016 Disponible en: <http://shop.romerlabs.com/en/AgraQuant-ELISA/AgraQuant-Allergens/AgraQuant-ELISA-Soy> (Fecha de acceso: 1 de diciembre de 2016).
- Díaz Amigo C, Popping B. Analytical Testing as a tool for the enforcement of future regulatory thresholds for food allergens. *J AOAC INT* 2010; 93 (2): 434-41.
- Cellierino K, Binaghi MJ, Cagnasso CE, Docena G, López LB. Comparación de SDS-PAGE y métodos inmunoquímicos para la detección de proteínas de soja en productos cárnicos crudos y cocidos. *Rev Chil Nutr* 2012; 39 (3): 52-7.
- Gatti M, Ferretti C. Soy Allergen Detection. En: Popping B, Diaz-Amigo C, Hoenicke K Editors. *Molecular Biological and immunological techniques and applications for food chemists*. Canadá: John Wiley & Sons, Inc; 2010; 335-48.
- Besler M, Steinhart H, Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed food. *J Chromatogr B Biomed* 2001; 756 (1-2): 207-28.
- Díaz Amigo C. Towards a comprehensive validation of ELISA kits for food allergens. Case2-Milk. *Food Anal Method* 2010; (3): 351-6.
- Díaz Amigo C. Towards a comprehensive validation of ELISA kits for food allergens. Case 1- Egg. *Food Anal Method* 2010; (3): 344-50.
- Sampson MA, Munoz-Furlong A, Sicherer SH. Risk-taking and coping strategies of adolescents and young adults with food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; (117): 1440-5.
- Ward R, Crevel R, Bell I, Khandke N, Ramsay C, Paine S. A vision for allergen management best practice in the food industry. *Trends Food Sci Tech* 2010; 21: 619-25.

**Recibido: 16 de enero de 2017**

**Aceptado: 18 de abril de 2017**